

376
1977
37

50376
1977
37

MEMOIRE

présenté pour l'obtention du titre de Docteur ès Sciences
Naturelles de l'Université des Sciences et Techniques de Lille 1

par

Daniel CHARLES

ETUDE DE L'ABSORPTION ET DE LA DESTINEE
DE DNA EXOGENES
CHEZ LES ALGUES UNICELLULAIRES
NORMALES ET IRRADIEES



Présenté le 23 juin 1977 devant la commission d'examen

MM. J. MONTREUIL	Président
L. LEDOUX	Rapporteur
M. ERRERA	Examineur
J. KREMBEL	Examineur
J.R. MAISIN	Examineur

Nous exprimons notre reconnaissance au Professeur J. MONTREUIL de la confiance qu'il nous a témoignée, de l'intérêt et de l'encouragement qu'il nous a prodigué.

Nous remercions le Professeur L. LEDOUX pour l'intérêt qu'il a marqué pour notre travail et pour les critiques constructives qu'il a formulé.

Nos remerciements s'adressent également au Professeur M. ERRERA et aux Docteurs J.R. MAISIN et J. KREMBEL qui ont bien voulu examiner et critiquer ce mémoire.

J'exprime toute ma gratitude à mon père, Docteur P. CHARLES, qui, tout au long de ce travail, m'a constamment encouragé et avec qui j'ai eu de nombreuses discussions fructueuses.

Nous tenons à remercier le Docteur J.R. MAISIN, Chef du Département de Radiobiologie du C.E.N., qui a accepté qu'une partie du travail s'accomplisse à Mol.

Nous remercions aussi les Docteurs B.P. EYDEN, B. FOURNET, M. JANOWSKI, A. LEONARD, P.F. LURQUIN et M. MERGEAY pour leurs conseils et leur aide.

Nous adressons nos remerciements aux membres des laboratoires de Radiobiologie (Mol) et de Chimie Biologique (Lille), et particulièrement à MM. J. REMY, R. HUART et J. GERITS pour l'accueil qu'ils nous ont réservé et l'aide qu'ils nous ont apporté.

Nous remercions aussi Mr A. GEUSENS pour la reproduction minutieuse des graphiques et Mme L. STEYLEMANS qui s'est acquittée avec un soin parfait de la dactylographie.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide financière de la Commission des Communautés Européennes, sous forme d'une bourse d'étude. Nous exprimons notre reconnaissance à cet organisme.

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.

**Présidents Honoraires de l'Université
des Sciences et Techniques de LILLE**

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

**Président de l'Université
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. BKOUCHE, 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
Mle 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

Maîtres de Conférences (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. BOSCOQ, 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
Mlle LEGRAND, Denise	Algèbre
Mlle 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
Mlle SPIK, Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ, François	Sciences Economiques
M. STERBOUL, François	Informatique
M. TAILLEZ, Roger	Biologie
M. THERY, Pierre	Electronique
M. TOP, Gérard	Sciences Economiques
M. TOULOTTE, Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON, Jean-René	Sociologie
M. VANDORPE, Bernard	Chimie Minérale
M. VILLETTE, Michel	Mécanique
M. WALLART, Francis	Chimie
M. WERNER, Georges	Informatique
Mme ZIN-JUSTIN, Nicole	Algèbre

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction	1
Matériel et méthodes	9
I. Produits	9
II. Souches bactériennes	9
III. Souches d'Algues	10
IV. Solutions "standard"	11
V. Milieu et conditions de culture	12
VI. Acide désoxyribonucléique	20
A. Estimation du poids moléculaire par viscosimétrie	20
B. Isolement et purification des DNA	21
VII. Comptage des cellules	25
VIII. Centrifugation en gradient de densité de CsCl	25
IX. Recherche rapide de mycoplasme et de virus	27
X. Recherche de DNA circulaires	28
XI. Procédés de transformation	29
XII. Etude biochimique de la prise de DNA bactériens radioactifs	31
XIII. Etude biochimique du sort de DNA bactériens radioactifs après plusieurs divisions cellulaires	32
XIV. Irradiation de <i>Scenedesmus obliquus</i>	33
XV. Autoradiographie	34
XVI. Microscopie électronique de <i>Scenedesmus obliquus</i>	36
XVII. Analyse par réassociation moléculaire et thermo-chromatographie sur hydroxylapatite	39
Résultats expérimentaux	41
I. Etude et caractérisation de l'acide désoxyribonucléique bactérien	41
A. Estimation du poids moléculaire	41
B. Recherche de DNA circulaires	44
C. Etude génétique	53
D. Conclusions	63

II. Caractérisation du DNA des différentes souches d'algues utilisées	65
A. <i>Anacystis nidulans</i>	65
B. <i>Euglena gracilis</i>	77
C. <i>Ochromonas danica</i>	78
D. <i>Polyedriella helvetica</i>	82
E. <i>Porphyridium cruentum</i>	84
F. <i>Scenedesmus obliquus</i>	86
G. Conclusions	89
III. Prise et sort de DNA radioactif bactérien chez les algues	92
A. <i>Anacystis nidulans</i>	92
1. Choix d'un milieu d'incubation	92
2. Prise de DNA bactérien en fonction de la croissance	92
3. Recherche des conditions de prise optimale	97
4. Essais de transformations induites par du DNA homologue ou hétérologue	103
5. Etude biochimique de l'absorption de DNA exogène	104
6. Conclusions	116
B. <i>Euglena gracilis</i>	119
1. Choix d'un milieu d'incubation avec le DNA bactérien	119
2. Prise de DNA radioactif bactérien en fonction de la croissance	120
3. Sort d'un DNA radioactif bactérien	123
4. Conclusions	133
C. <i>Ochromonas danica</i>	134
1. Choix d'un milieu d'incubation	134
2. Prise de DNA ³ H bactérien en fonction de la courbe de croissance	134
3. Sort du DNA radioactif bactérien	135
4. Conclusions	146
D. <i>Polyedriella helvetica</i>	148
1. Choix d'un milieu d'incubation	148
2. Prise de DNA radioactif bactérien en fonction de la croissance	148
3. Sort d'un DNA radioactif bactérien	149
4. Conclusions	161

E. <i>Porphyridium cruentum</i>	162
1. Choix d'un milieu d'incubation	162
2. Prise de DNA bactérien en fonction du cycle cellulaire	162
3. Etude de la prise et du sort d'un DNA bactérien par les cellules	163
4. Conclusions	177
F. <i>Scenedesmus obliquus</i>	179
1. Choix d'un milieu d'incubation avec le DNA bactérien	179
2. Prise de DNA ³ H bactérien à différents moments de la croissance	179
3. Etude de la prise et du sort d'un DNA bactérien	184
4. Etude par autoradiographie et par hybridation moléculaire	195
5. Prise et sort de DNA ³ H de <i>B. subtilis</i>	204
6. Action de la DNase	208
7. Recherche de contaminants éventuels	210
8. Effet de l'irradiation aux R.X.	219
9. Essais d'incubation avec du DNA bactérien complexé	220
10. Conclusions	224
Conclusions générales	226
Résumé général	234
Bibliographie	236

INTRODUCTION

MIESCHER découvrit vers 1869 les "nucléines", macromolécules dont on sait maintenant qu'elles constituent le matériel génétique des cellules.

ALTMANN (1889) proposa le terme "acides nucléiques" et découvrit une méthode commode de préparation qui devait amener, après l'identification des bases azotées qui composent ces molécules (LEVENE et JACOBS, 1909), à la mise en évidence vers 1930 par LEVENE et BASS (1931) de deux types d'acides nucléiques : l'acide désoxyribonucléique et l'acide ribonucléique. BRACHET (1933) put démontrer, grâce au test à la ribonucléase, que les acides ribonucléiques étaient localisés principalement dans le cytoplasme et en petite quantité seulement dans le noyau.

Par des techniques mises au point par FEULGEN et ROSSENBECK (1924), les acides désoxyribonucléiques furent localisés par coloration spécifique dans le noyau des cellules et plus particulièrement dans les chromosomes (LESSLER, 1953 ; LEUCHTENBERGER, 1954 ; SWIFT, 1955 ; KURNICK, 1955).

La correspondance entre acide désoxyribonucléique et matériel génétique fut proposée à partir de plusieurs constatations : les acides désoxyribonucléiques étaient situés dans le noyau des cellules animales et végétales, tous les noyaux en contenaient (FEULGEN, BEHRENS et MAHDIAASSAN, 1937) des quantités constantes et caractéristiques des types de cellules (BOIVIN, VENDRELY et VENDRELY, 1948), l'acide désoxyribonucléique se répartissait d'une manière égale dans les cellules filles.

Déjà, en 1928, GRIFFITH réalisa des expériences qui furent à l'origine de la découverte du processus de transformation et permirent de confirmer le DNA comme matériel héréditaire. Il réussit à infecter des souris avec un mélange de *Diplococcus pneumoniae* R (rough) non virulents et S (smooth) virulents mais préalablement tués par la chaleur. Comme il découvrit que ces souris étaient atteintes de pneumonie et que leur sang contenait des bactéries R vivantes, il conclut que les bactéries S tuées par la chaleur devaient contenir un facteur transformant capable de changer les R en S.

La transformation des pneumocoques R en S fut plus tard réalisée "in vitro" (DAWSON et SIA, 1931) et ALLOWAY en 1933 démontra que le facteur transformant pouvait être obtenu en lysant des cellules S et en le précipitant à l'alcool. Ce n'est qu'en 1944 qu'AVERY, MAC LEOD et Mc CARTY, par une analyse systématique de la nature chimique du principe transformant, établirent l'équivalence : DNA - principe transformant. Ni la RNase ni les enzymes protéolytiques ne modifiaient l'activité biologique du principe transformant, détruit cependant par la DNase. Il subsistait néanmoins des doutes. En effet, les préparations de DNA obtenues à l'époque n'étaient pas très pures et on ne pouvait exclure l'intervention de contaminants protéiques dans l'activité transformante.

Il fallut attendre la mise au point de méthodes plus élaborées de préparation de DNA pour pouvoir observer que plus pur était le DNA, plus grande était l'activité transformante et que l'élimination des protéines et des RNA de la préparation ne diminuait en rien son potentiel transformant (HOTCHKISS, 1949 ; HOTCHKISS, 1952 ; ZAMMENHOF, ALEXANDER et LEIDY, 1953).

Le phénomène de transformation ne fut pas limité aux seuls pneumocoques. Il s'avéra être d'une grande importance pour l'analyse génétique de différentes espèces bactériennes et pour l'établissement des relations entre intégrité de la structure et fonction du DNA. Les phénomènes de prise de DNA et de transformation furent alors étudiés au niveau moléculaire et quelques années plus tard, des expériences analogues furent tentées sur des cellules eucaryotiques (BORENFREUND, ROSENKRANZ et BENDICH, 1959 ; KRAUS, 1961 ; WILCZOCK, 1961; ...).

Depuis lors, des études ont été entreprises sur un nombre considérable de cellules et d'organismes différents, dont les résultats ont été passés en revue notamment par LEDOUX (1965), par P. CHARLES (1967) et plus récemment par BHARGAVA et SHANMUGAM (1971). Cependant, beaucoup de difficultés ont été rencontrées lors des expériences effectuées avec des organismes supérieurs, difficultés dues en grande partie à la complexité physiologique des organismes étudiés. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier le sort moléculaire de DNA exogènes chez quelques algues unicellulaires, organismes qui se placent tout au bas de l'échelle de l'évolution et sont intermédiaires entre organismes pro- et eu-caryotes.

En 1962, des phénomènes de transformation, comparables à ceux obtenus chez les bactéries, étaient décrits chez une algue bleue unicellulaire procaryote : *Anacystis nidulans*. KUMAR (1962) isola deux souches résistantes à la streptomycine ou à la pénicilline. Ayant mélangé des cultures de ces deux mutants et transféré des aliquotes dans un milieu sélectif contenant les deux antibiotiques, il observa une croissance d'algues dans 10 fioles sur 36, après un temps d'éclipse de 8 à 14 jours. Il suggéra l'existence d'un phénomène de recombinaison génétique qui serait obtenu avec une fréquence d'environ 1 recombinant pour 10^8 cellules.

La difficulté majeure à cette époque résidait dans le fait qu'on ne parvenait à cultiver *Anacystis* que dans des milieux liquides et qu'il n'était pas possible d'isoler les recombinants.

PIKALEK (1967) mit en doute les conclusions de KUMAR, en observant une inactivation de la pénicilline pendant la longue période de repos (dite d'éclipse). D'après lui, les recombinants étaient en fait des mutants streptomycine résistants ayant résisté à l'action de la pénicilline pendant 6 jours au moins. En effet, ses recombinants provenaient de cultures en phase stationnaire, donc de cellules métaboliquement inactives qui, de ce fait, pouvaient survivre dans un milieu contenant de la pénicilline. Cependant, cette objection ne fut pas retenue car selon FOGG (1973), les recombinants de KUMAR se montraient à la fois streptomycine et pénicilline-résistants dans des tests séparés (KUMAR, communication personnelle à FOGG).

SINGH et SINHA (1965) suggérèrent également un phénomène de recombinaison génétique lors d'expériences en milieu liquide avec l'algue bleue filamenteuse *Cylindrospermum majus*.

Cependant, c'est en 1968 que BAZIN apporta une preuve formelle de l'existence du processus de recombinaison chez *Anacystis nidulans*. Utilisant le milieu de KRATZ et MYERS (1955) modifié par VAN BAALEN (1965), il lui fut possible d'étaler sur boîte, quantitativement, *Anacystis nidulans*. Ayant isolé deux mutants stables, l'un résistant à la polymyxine B et l'autre à la streptomycine, il les incuba ensemble pendant 1 nuit dans de l'eau stérile. Après étalement sur boîtes contenant les deux antibiotiques, il constata après deux semaines environ l'apparition de quelques colonies, tandis que les contrôles restaient négatifs. Ces recombinants, stables

après sous-cultures, furent obtenus avec une fréquence assez basse, variant de 4,5 à 491 par 10^9 cellules viables.

La transformation après incorporation de DNA exogène fut obtenue chez *Anacystis nidulans* par SHESTAKOV et KHYEN en 1970. Ils montrèrent que du DNA isolé à partir de souches mutées, érythromycine R, streptomycine R ou filamenteuses, pouvait transformer le type sauvage ou d'autres récepteurs, à une fréquence variant de 0,004 à 0,08, c'est-à-dire, plus de 10^4 fois celui de la mutation spontanée.

D'autre part, SHESTAKOV et KHYEN déterminèrent quelques conditions qui favorisent la transformation chez cette algue. Ils observèrent que le pourcentage de transformation le plus élevé était obtenu avec une concentration cellulaire de 4 à 6×10^7 cellules viables par ml, avec une concentration en DNA variant entre 20 et 30 μg par ml et un temps d'incubation en présence du DNA d'environ 5 heures. Comme le phénomène semble être sensible à des variations de l'intensité lumineuse, les auteurs conclurent que la prise de DNA était directement dépendante de l'énergie de photosynthèse.

HERDMAN et CARR (1971), également avec *Anacystis nidulans*, obtinrent des recombinants en utilisant le surnageant acellulaire de cultures d'un mutant d'*Anacystis*. Ils analysèrent ce surnageant et déterminèrent qu'il contenait un complexe DNA/RNA dans le rapport 1/6. L'efficacité de ce complexe est réduite de 60 % après incubation en présence de DNase ou/et de RNase, mais reste inchangée après incubation en présence de pronase.

Poursuivant ces recherches, HERDMAN (1973 a,b) observa l'apparition de mutations chez les récepteurs, aussi bien lors de transformations

réalisées à l'aide de DNA extrait chimiquement des cellules qu'à l'aide du complexe a-cellulaire DNA/RNA. Cependant, le complexe DNA/RNA permet une étude de marqueurs plus distants les uns des autres, ce qui amena HERDMAN à conclure qu'avec les acides nucléiques extracellulaires, de plus grands segments du génome donneur sont transférés dans les cellules réceptrices.

ORKWISZEWSKI et KANEY (1974) utilisèrent d'autres mutants d'*Anacystis*, un auxotrophe pour la phénylalanine et un auxotrophe pour l'ornithine et un streptomycine R. Ils confirmèrent les résultats des autres chercheurs ainsi que les conditions de transformation décrites par SHESTAKOV et KHYEN (1970). De plus, ils observèrent un pic de transformation ressemblant à la phase de compétence décrite chez certaines bactéries.

Dernièrement, des phénomènes de recombinaison génétique ont également été observés chez l'algue bleue *Nostoc muscorum*. En effet, un transfert de gène *nif* de la souche sauvage (*nif*⁺ St-S) à un mutant (*nif*⁻ St-R) a été obtenu par STEWART et SINGH (1975).

Tout récemment, ASTIER et ESPARDELLIER (1976) ont obtenu des transformations à l'aide d'un mélange d'acides nucléiques chez une autre algue bleue unicellulaire *Aphanocapsa* 6714. Elles observent également l'apparition d'une phase de compétence.

LURQUIN et BEHKI (1975) ont étudié au point de vue biochimique la prise de DNA bactérien par l'algue verte eucaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. Ils aboutirent à la conclusion que le DNA bactérien était pris en petite quantité par les cellules et était ensuite dégradé et

réutilisé pour la synthèse du DNA endogène.

Etant donné ces résultats tantôt positifs (*Anacystis*, *Cylindrospermum*, *Nostoc* et *Aphanocapsa*), tantôt négatifs (*Chlamydomonas*), il nous a semblé intéressant d'étudier la prise et le sort de DNA bactérien chez quelques algues unicellulaires.

Nous avons choisi l'algue bleue procaryote *Anacystis nidulans* comme matériel de référence car il avait été démontré que ces cellules absorbaient du DNA exogène. De plus, nous savions que la transformation hétérologue et l'analyse biochimique des phénomènes de prise de DNA homologue et hétérologue n'avait pas encore été réalisées chez cette algue. Les autres algues sélectionnées sont des organismes eucaryotiques unicellulaires. Elles sont représentatives des grandes familles telles les algues jaunes ou Chrysophyceae (*Ochromonas* et *Polyedriella*), les algues rouges ou Rhodophyceae (*Porphyridium*), les algues vertes ou Chlorophyceae (*Scenedesmus*) et les Euglenophyceae (*Euglena*). En outre, certaines présentaient un intérêt particulier, telle *Scenedesmus* devenue de nos jours une algue potentiellement importante au point de vue économique.

Dans une première partie du travail, nous avons caractérisé le matériel bactérien et plus particulièrement *Sarcina flava* et *Micrococcus lysodeikticus*. Une seconde partie de notre travail a été consacré à la mise au point de méthodes de préparation quantitative des DNA des algues en vue de leur caractérisation physicochimique, par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium. Dans une troisième partie, nous nous sommes attachés à l'étude de la prise et du sort moléculaire de DNA bactériens chez les algues en utilisant principalement la technique de centrifugation

en gradient de chlorure de césium. Dans la dernière partie et pour une algue avec laquelle nous avons obtenu des résultats encourageants, nous avons étudié l'influence de l'irradiation sur la prise des DNA étrangers.

MATERIEL et METHODES

I. PRODUITS

A. Produits non-radioactifs

Les produits minéraux et organiques utilisés sont de marque MERCK, U.C.B., B.D.H., GEIGY... et sont "purs pour analyse". Les enzymes sont de marque CALBIOCHEM, SIGMA, KAKEN CHEMICAL ou SERAVAC. Pour la préparation de certains milieux de culture pour algues ou pour bactéries, nous avons utilisé des produits DIFCO ou OXOID.

B. Produits radioactifs

Nature	Activité spécifique	Origine
1. Thymidine-6- ³ H	15 Ci/mM	C.E.N.
2. Adénine-2- ³ H	15 Ci/mM	C.E.A.
3. Uracile-6- ³ H	26 Ci/mM	C.E.A.
4. Adénine-8- ¹⁴ C(chlorhydrate)	2 mCi/mM	C.E.A.

II. SOUCHES BACTERIENNES

Souche	Génotype	Exigences
1. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 (<i>M. lysodeikticus</i>)	sauvage	-
2. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 (<i>M. lysodeikticus</i>)	trp C23	Tryptophane

3. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 (<i>M. lysodeikticus</i>)	trp E16	Tryptophane
4. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 (<i>M. lysodeikticus</i>)	his 25	Histidine
5. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 540 (<i>Sarcina flava</i>)	ade 540	Adénine
6. <i>Bacillus subtilis</i> 168	sauvage	-
7. <i>Escherichia coli</i> K12-P4X-JEX8	Hfr-metB-car B8	Méthionine, arginine, pyrimidines
8. <i>Escherichia coli</i> K12-CR34	F ⁻ -thre-leu-thi-thy	Thréonine, leucine, thiamine, thymine

Les souches 2 à 5 nous ont été aimablement envoyées par le Dr KLOOS
(Raleigh University, USA).

III. SOUCHES D'ALGUES

Souche	N°	Génotype	Origine
1. <i>Anacystis nidulans</i>	625	sauvage	I.U.C.C. (U.S.A.)
2. <i>Anacystis nidulans</i>	1172	met-4	
3. <i>Anacystis nidulans</i>	2112	nit-A _I , met-I	
4. <i>Euglena gracilis</i>	Klebs	sauvage	I.M.T. (Belgique)
5. <i>Ochromonas danica</i>	933/2	sauvage	C.C.A.P. (U.K.)
6. <i>Polyedriella helvetica</i>	861/1	sauvage	C.C.A.P. (U.K.)
7. <i>Porphyridium cruentum</i>	161	sauvage	I.U.C.C. (U.S.A.)
8. <i>Scenedesmus obliquus</i>	276/3a	sauvage	C.C.A.P. (U.K.)

Les souches 1, 2 et 3 nous ont été aimablement fournies par le

Dr N.G. CARR (Liverpool University, U.K.), la souche 4 par le Dr J. JADIN (I.M.T. Anvers) et les souches 5, 6 et 7 par le Dr V. DEMOULIN (Université de Liège).

IV. SOLUTIONS "STANDARD"

1. **Saline - EDTA** : 0,14 M NaCl et 0,1 M EDTA, pH 8,0.
2. **Saline - citrate** :
 - solution concentrée : 1,5 M NaCl et 0,15 M Na₃ citrate, pH 7,5
 - solution normale : dilution 10⁻¹
 - solution diluée : dilution 10⁻².
3. **Pronase** : solution à 20 mg/ml dans NaCl 0,01 M, incubée à 37° pendant 90 minutes pour digérer les nucléases éventuelles. La solution est ensuite centrifugée et stérilisée par filtration. Solution conservée au froid à 4 °C.
4. **Ribonucléase** : solution à 0,2 % dans NaCl 0,14 M, incubée à 80 °C pendant 10 minutes pour inactiver les désoxyribonucléases éventuelles. La solution est ensuite stérilisée par filtration et conservée au froid à 4 °C.
5. **Lauryl sulfate de sodium** : solution à 20 % dans l'eau.
6. **Tampon de dialyse** (après centrifugation en gradient de CsCl en présence de bromure d'éthidium) : 0,1 M NaCl/0,05 M Tris/0,01 M EDTA, pH 7,6.
7. **Tampon T N E** : Tris-HCl 0,01 M/ NaCl 0,1 M/ EDTA 0,002 M.
8. **Tampon T E** : 0,05 M Tris/ 0,02 M EDTA, pH 8,0.
9. **Tampon T E S** : 0,05 M Tris/ 0,05 M NaCl/ 0,005 M EDTA, pH 8,0.

10. Bouillon de transformation pour *Micrococcus* (Kane et Kloos, 1970) :

0,05 M Tris/ 0,01 M SrCl_2 , pH 7,0.

11. Sarkosyl : solution à 10 % dans l'eau distillée.

12. Protéinase K : solution à 1 mg/ml dans NaCl 0,01 M.

13. Tampon cacodylate 0,2 M : 21,4 g cacodylate $\text{Na}_3\text{H}_2\text{O}$ (BDH), 63 ml HCl

0,1 N, 437 ml H_2O bidistillée, pH 7,2.

14. Résine Spurr - standard (Spurr, 1969) :

ERC-VCD (Ladd) 10 g

Vinyl cyclohexene dioxyde

DER (Polysciences) 6 g

Diglycidyl ether of polypropylène glycol

NSA (Taab Laboratories) 26 g

Nonenylsuccinic anhydride

S-1 (Polysciences) 0,4 g

Diméthylaminoéthanol

Mélanger au mélangeur magnétique pendant 60 min environ (à manipuler sous hotte).

15. Solution de Bleu de Toluidine : 1 % dans de l'eau distillée, amener le

pH à 9,0 avec une solution de Na_2CO_3 à 25 % dans l'eau. Filtrer avant l'emploi.

V. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

A. Pour *Micrococcus* (Kloos et Schultes, 1969)

1. Milieu liquide

K ₂ HPO ₄	2,0 g/l
NH ₄ Cl	1,0
Glutamate monosodique	10,0
L-phenylalanine	0,4
L-tyrosine	0,5
L-proline	0,9
L-iso-leucine	0,5
L-cystéine	0,48
L-méthionine	0,27
L-arginine	0,656

Ajouter 1 l d'eau distillée, 0,1 ml FeSO₄, 7H₂O à 1 % et 0,1 ml MnCl₂, 4H₂O à 0,5 %. Ajuster à pH 7,2 et stériliser.

Après la stérilisation, ajouter : 0,1 ml biotine 0,01 %
 1,5 ml MgSO₄, 7H₂O M/5
 28,0 ml glucose à 25 %.

Exigences (pour 1 litre) :

pour la souche ade⁻ : 20 ml sol. adénine à 0,25 %
 trp⁻ : 12 ml sol. tryp. à 0,25 %
 his⁻ : 4 ml sol. histidine à 0,5 %.

2. Milieu solide

Il faut ajouter 15 g d'agar-agar 1614 (Merck) par litre de milieu liquide.

3. Culture

La culture se fait à 27 °C, avec agitation.

B. Pour *Anacystis nidulans*

1. Milieu liquide DM (milieu de Kratz et Myers, 1955 ; modifié par Van Baalen, 1965)

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,25 g/l
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	1,40
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	0,025
NaNO ₃	1,00
Na ₂ EDTA	0,031
Fe ₂ (SO ₄) ₃ , 6H ₂ O	0,004
Microéléments H 5	0,6 ml
(microéléments H 5 :	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,82 g/l
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄ , 5H ₂ O	1,57
Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	0,49).

Il faut utiliser de l'eau bidistillée pour la préparation de toutes les solutions.

Exigences : D-L-méthionine 0,03 g/l

NH₄Cl 0,375.

2. Milieu solide G - 11 (milieu de Hughes et al, 1958 ; modifié par Allen, 1968)

a. NaNO ₃	3,0 g/l
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0,11
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,145

Na_2CO_3	0,04		
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,074		
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,116		
Na_2EDTA	0,002		
Acide citrique	0,012		
Citrate de Fe	0,012		
Microéléments B 5 2,0 ml	(B 5 : H_3BO_3		2,86 g/l
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		1,81
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,222
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0,391
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0,079
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0,0494).

b. Agar à 3 %

c. Mode opératoire : stériliser séparément le même volume de milieu minéral et de Bacto agar DIFCO (dans l'eau bidistillée). Après stérilisation, refroidir les flacons jusqu'à 48 °C et mélanger.

3. Culture

Les fioles de culture sont agitées à 32 °C sous 2500 lux, sans passage d'un mélange air/ CO_2 , selon ASATO et FOLSOME (1970).

C. Pour *Euglena gracilis*

1. Milieu liquide (CRAMER et MYERS, 1952)

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1 g/l

KH_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,4
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7, 2\text{H}_2\text{O}$	0,53
$\text{CaCl}_2, \text{H}_2\text{O}$	0,023
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3, 6\text{H}_2\text{O}$	0,003
$\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	0,0018
$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,0014
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,0004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,0003
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,00002

Après la stérilisation, ajouter :

Thiamine	0,1 mg/ℓ
Cyanocobalamine	0,0005

pH : 6,9.

2. Milieu solide (EDMUNDS, 1965)

Le milieu solide se prépare avec de l'agar-agar 1614 (Merck), à 1 %.

3. Culture

Les fioles de culture sont agitées à 21,5 °C sous 3500 lux.

D. Pour *Ochromonas danica*

1. Milieu liquide

C'est le milieu utilisé par l'algothèque de Cambridge (1971)

Infusion de foie	0,1 %
Glucose	0,1 %

Bacto-tryptone 0,1 %

pH : 6,1.

2. Culture

Les fioles de culture sont agitées à 25 °C sous 4500 lux.

E. Pour *Polyedriella helvetica*

1. Milieu liquide

C'est le milieu utilisé par l'algorithme de Cambridge (1971)

Proteose peptone	0,1 %
KNO ₃	0,02 %
KH ₂ PO ₄	0,002 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,002 %

pH : 6,5

2. Milieu solide

Le milieu solide se prépare avec de l'agar-agar 1614 (Merck), à 1 %.

3. Culture

Les fioles de culture sont agitées à 25 °C sous 4500 lux.

F. Pour *Porphyridium cruentum*

1. Milieu liquide

C'est le milieu à l'eau de mer artificiel (ASW) de JONES, SPEER et KURY (1963)

solution A : NaCl 27 g
 MgSO₄, 7H₂O 6,6
 MgCl₂, 6H₂O 5,6
 CaCl₂, H₂O 1,3
 KNO₃ 1,0
 KH₂PO₄ 0,07
 NaHCO₃ 0,04 , amener à 1 l avec eau dist. et ajouter
 20 ml Tris-HCl 1 M, pH 7,6

solution B : ZnCl₂ 4,0 mg
 H₃BO₃ 60,0
 CoCl₂, 6H₂O 1,5
 MnCl₂, 4H₂O 40,0
 CuCl₂, 2H₂O 4,0
 (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4H₂O 37,0 mg, amener à 100 ml avec eau dist.

solution C : FeCl₃, 6H₂O 270,0 mg dissous dans 100 ml sol. Na₂EDTA 0,05 M.

Après la stérilisation, il faut mélanger 1000 ml de A, 1 ml de B et 1 ml C.

2. Milieu solide

Le milieu solide se prépare avec de l'agar-agar 1614 (Merck), à 1 %.

3. Culture

Les fioles de culture sont agitées à 25 °C sous 4500 lux.

G. Pour *Scenedesmus obliquus*

1. Milieu liquide (MULLER, 1961)

KNO ₃	(114 g dans 1000 ml (pH : 6,0))	10 ml/l
KH ₂ PO ₄	(28 g dans 200 ml)	2

MgSO ₄ , 7H ₂ O	(18 g dans 100 ml)	1
H ₃ BO ₃	(286 mg dans 100 ml)	1
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	(22,2 mg ---)	1
CuSO ₄ , 5H ₂ O	(7,9 mg ---)	1
MnSO ₄ , 4H ₂ O	(370,0 mg ---)	1
CoCl ₂ , 6H ₂ O	(5,8 mg ---)	1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	(1,6 mg ---)	1
CaCl ₂ , H ₂ O	(258,0 mg ---)	1
Fe citrate, 5H ₂ O	(530,0 mg ---)	1
Acide citrique	(530,0 mg ---)	1

pH final : 6,0

2. Milieu solide

Le milieu solide se prépare avec de l'agar-agar 1614 (Merck), à 1,5 %.

3. Culture

Les fioles de culture sont agitées à 25 °C sous 4500 lux.

H. Milieux riches pour "infections"

1. Pour bactéries : - TBAB ; tryptose blood agar base (B 232 - Difco)

ou - n° 856 : bacto trytone	10 g
extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
glucose	1 g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	2,34 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g

amener à 1 litre, ajouter 15 g d'agar.

2. Pour Champignons : Czapek solution agar (B 339 - Difco)

VI. ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE

A. Estimation du poids moléculaire par viscosimétrie

Appareil : viscosimètre de Couette selon ZIMM et CROTHERS (1962) fabriqué par Beckman (viscosimètre rotatif).

Principe : le viscosimètre est constitué d'un rotor à base métallique qui flotte dans le liquide à analyser placé dans le stator. Le volume de la solution à analyser est ajusté de telle façon que le repaire tracé sur le rotor coïncide avec celui tracé sur le stator ; à ce moment la distance entre le rotor et le stator est égale en tous points. Un moteur actionnant un aimant est alors mis en marche ce qui entraîne le rotor. Le temps de rotation du rotor est mesuré pour le solvant et pour les solutions de DNA à différentes concentrations. Les mesures se font à 25 °C, le stator étant relié à un bain thermostatique à circulation.

si, t_s = le temps mis par le rotor pour effectuer 1 révolution dans le solvant

t_{DNA} = le temps mis par le rotor pour effectuer 1 révolution dans la solution de DNA

il est possible de calculer la viscosité relative (EIGNER, 1968)

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{DNA}}{\eta_s} = \frac{t_{DNA}}{t_s}$$

d'où on déduit la viscosité spécifique : $\eta_{sp} = \eta_{rel}^{-1}$.

La viscosité réduite est donnée par la relation : $\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{c}$

c étant égal à la concentration en DNA de la solution examinée, concentration exprimée conventionnellement en dl par g.

La valeur de la viscosité intrinsèque peut alors être obtenue graphiquement :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{\text{sp}}}{c} \right) .$$

A partir d'un graphique où les valeurs de la viscosité réduite sont portées en ordonnée par rapport aux valeurs de la concentration portées en abscisse, la valeur de la viscosité intrinsèque est donnée par l'intersection de la droite reliant les différents points à l'ordonnée (c = 0).

A partir de la formule : $\log ([\eta] + 5) + 2,863 = 0,665 \log P_M$ de CROTHERS et ZIMM (1965), connaissant $[\eta]$ on peut estimer avec une bonne approximation la valeur du poids moléculaire du DNA analysé.

B. Isolement et purification des DNA

1. DNA bactériens (*B. subtilis*, *E. coli*, *M. lysodiecticus*, *S. flava*)

(MARMUR, 1961 et P. CHARLES, 1972)

pour 1 g de culot humide : le culot de bactéries est remis en suspension dans 10 ml de saline-EDTA, on ajoute 4 mg de lysozyme et le mélange est incubé à 37 °C pendant 60 min (pour *S. flava*, on ajoute 8 mg de lysozyme et l'incubation est prolongée pendant 5 heures à 37 °C - KLOOS, 1970), la lyse des cellules est obtenue par addition de détergent - SDS - concentration finale 2 %. Le mélange est ensuite incubé en présence de pronase (concentration finale 2 mg/ml) pendant 2 heures à 37 °C ; après addition de RNase

(concentration finale 100 µg/ml), l'incubation à 37 °C est poursuivie pendant 2 heures. Les acides nucléiques sont ensuite précipités par addition de 2 volumes d'alcool dénaturé. Les fibres sont enroulées sur une baguette de verre et redissoutes dans 5 ml de SSC dilué. Lorsque les fibres sont bien dissoutes, ce qui prend en général une nuit, on fait agir de nouveau la RNase (concentration finale 50 µg/ml) pendant 1 heure à 37 °C. On ajoute alors de la protéinase K (autre enzyme protéolytique à large spectre) (concentration finale 100 µg/ml) et la digestion est poursuivie pendant 2 à 3 heures à 37 °C.

La purification se fait par centrifugation préparative en gradient de CsCl (FLAMM et al., 1969). A l'équilibre, le RNA sédimente dans le fond du tube, le DNA se concentre à son point d'isodensité tandis que les protéines flottent. Après centrifugation, les tubes sont fractionnés par le fond et le DNA est visualisé soit par la modification de viscosité que sa présence entraîne soit par son absorption U.V.. Il est recueilli et après dilution pour amener la concentration en CsCl à environ 1 M (dilution 5 fois environ), il est précipité par addition de deux volumes d'alcool à 94 ° dénaturé. Les fibres sont recueillies sur une baguette de verre, sont lavées plusieurs fois dans l'alcool 70 % pour éliminer les dernières traces de CsCl et sont mises à dissoudre dans du NaCl 0,01 M stérile.

Le DNA est conservé à une concentration d'environ 1 mg/ml au froid à 4 °C en présence de quelques gouttes de chloroforme.

2. DNA des Algues (D. CHARLES, 1977 a)

a. Lyse des cellules

1. *Anacystis nidulans*, *Polyedriella helvetica* et *Scenedesmus obliquus*

Le culot est traité successivement par l'acétone, de l'alcool et enfin par de l'éther. La plupart des pigments et lipides sont extraits par ces traitements qui fragilisent également les parois cellulaires. Le culot est séché et broyé dans un mortier en présence d'azote liquide. Il est ensuite repris dans du Saline-EDTA et incubé après addition d'SDS à 37 °C pendant 10 minutes. La suspension est alors congelée et décongelée 3 fois successivement.

Second procédé d'extraction du DNA d'*A. nidulans*, avec lequel nous avons obtenu une lyse quantitative : après le traitement successif par l'acétone, l'alcool et l'éther, les cellules sont remises en suspension dans une solution de Saline-EDTA contenant 25 % de sucrose. La suspension est incubée à 37 °C avec 0,1 % d'enzyme lytique pendant 90 min, ensuite avec 1 mg/ml de lysozyme pendant 90 min et finalement avec 2 mg/ml de pronase pendant 2 h. La lyse complète des cellules est obtenue après addition de 2 % de SDS.

2. *Euglena gracilis*

Le culot de cellules est resuspendu dans du Saline-EDTA, la lyse des cellules est obtenue en ajoutant du SDS (concentration finale 2 %). (MARMUR, 1961).

3. *Ochromonas danica*

Les cellules sont resuspendues dans du Saline-EDTA et lysées par addition de SDS (concentration finale 2 %). Les acides nucléiques sont immédiatement précipités par addition de 2 volumes d'alcool froid afin de prévenir l'action des nucléases relâchées dans le milieu, nucléases très actives chez cette algue. Le précipité est ensuite dissous dans du SSC dilué.

4. *Porphyridium cruentum*

Les cellules en suspension dans du Saline-EDTA sont incubées à 37 °C pendant 2 heures en présence de cellulysine (concentration finale 2 %) et la lyse complète est obtenue par addition de SDS (concentration finale 2 %).

b. Traitement enzymatique

Les lysats sont incubés à 37 °C pendant 2 heures avec de la pronase (concentration finale 2 mg/ml), puis pendant 1 heure en présence de RNase (concentration finale 100 µg/ml). Les acides nucléiques sont ensuite précipités par addition de 2 volumes d'alcool à 94 ° dénaturé froid. Les fibres sont enroulées sur une baguette de verre, pressées sur les parois du tube pour expulser l'excès d'alcool et redissoutes dans du SSC dilué.

c. Purification

Lorsque les fibres sont parfaitement dissoutes, la solution est rendue 2 M en NaCl par addition de cristaux de NaCl et la purification s'effectue par filtration moléculaire sur gel d'agarose à la température du laboratoire. La colonne (0,9 × 15 cm ou 1,5 × 30 cm suivant la concentration présumée en DNA) est d'abord équilibrée pendant 1 nuit avec une solution de NaCl 2 M. Le volume mort de la colonne est estimé à l'aide d'une solution de Bleu Dextran 2.000.

Avant d'être déposées au sommet de la colonne, les solutions sont centrifugées afin de sédimenter le matériel insoluble qui pourrait freiner l'élution. Celle-ci s'effectue à l'aide d'une solution de NaCl 2 M filtrée. Des fractions de 10 gouttes (0,4 ml - colonne de 0,9 × 15 cm)

ou de 60 gouttes (2 ml - colonne de 1,5 × 30 cm) sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions ISCO (Lincoln - USA). L'absorption U.V. à 254 nm est enregistrée automatiquement sur un "Isco absorbance monitor UA-5". Des aliquotes de chaque fraction sont prélevées, diluées à 1 ml avec de l'eau distillée et après addition de 7,5 ml de mélange scintillant contenant du triton X100 (C.E.N./S.C.K., Mol, Belg.), la radioactivité est estimée dans un compteur à scintillation liquide Packard. Les fractions correspondant aux différents pics (en absorption U.V. et en radioactivité) sont rassemblées et gardées à 4 °C en attendant leur analyse par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.

VII. COMPTAGE DES CELLULES

Les mesures s'effectuent soit à l'aide d'une chambre de comptage Neubauer soit à l'aide d'un "Coulter counter" modèle ZF.

VIII. CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE DE CsCl

(MESELSON et al., 1957 ; VINOGRAD et HEARST, 1962 ; LEDOUX et CHARLES, 1972)

A. Centrifugation préparative (FLAMM et al., 1969)

La solution de DNA à purifier est centrifugée dans un rotor à angle fixe soit : rotor 40 Martin-Christ, les tubes pouvant contenir

jusqu'à 10 ml de solution ;

soit : rotor 65 Ti M-C ou 40 Spinco, les tubes pouvant contenir

5 ml de solution.

L'équilibre est obtenu après 63 heures de centrifugation à 33 000 tours à 20 °C.

B. Centrifugation analytique

1. A pH neutre

Afin d'en préciser la densité, les DNA obtenus sont centrifugés en gradient de CsCl en présence de DNA marqueurs de densité connue, dans un rotor basculant.

Pour obtenir une meilleure séparation de DNA de densité voisine, les solutions sont centrifugées dans un rotor à angle fixe (FLAMM et al., 1972).

Les tubes sont fractionnés par le bas en poussant la solution à l'aide de paraffine liquide (LEDOUX et CHARLES, 1972) et des fractions de 3 gouttes sont recueillies. Après avoir ajouté 1 ml d'eau distillée l'absorption U.V. à 260 nm est estimée au Cary 14 et la radioactivité est déterminée en scintillation liquide.

Lorsque nous avons pu disposer de l'appareillage "Isco", les tubes ont été fractionnés après centrifugation par le haut, la solution étant poussée à l'aide de fluorochemical (FC-43, 3 M). Des fractions de 3 ou 4 gouttes sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions et l'absorption U.V. à 254 nm est enregistrée automatiquement.

La densité du DNA a été quelquefois estimée par centrifugation à l'équilibre en gradient de chlorure de césium dans l'ultracentrifugeuse analytique Beckman modèle E, selon la technique de MESELSON et al. (1957).

Dans ce cas, l'équilibre est obtenu après 20 heures de centrifugation à 44.000 tours et à 20 °C.

2. A pH alcalin

A 2,0 ml de la solution de DNA, on ajoute 2,8 g de CsCl, 0,1 ml de NaOH 1 N et 0,03 ml de Sarkosyl 2 % (indice de réfraction de la solution : 1,4052). Les solutions sont centrifugées pendant 63 heures à 20 °C et à 33 000 tours dans des tubes en polypropylène préalablement lavés par NaOH 1 N.

IX. RECHERCHE RAPIDE DE MYCOPLASME ET DE VIRUS (TODARO et al., 1971)

Les cultures sont centrifugées à 8000 tours pendant 20 minutes à 4 °C. Le culot contenant les cellules et débris est écarté. Le surnageant est ensuite centrifugé à 18 000 tours pendant 3 heures à 4 °C. Le culot resuspendu dans du tampon T N E est déposé sur un gradient préformé de saccharose 15-65 %. Les tubes sont centrifugés dans un rotor basculant SW 41 à 25 000 tours pendant 16 heures et à 4 °C. Ils sont ensuite fractionnés par le haut et l'absorption U.V. à 254 nm est enregistrée automatiquement à l'aide de l'Isco absorbance monitor UA-5. Des fractions de 10 gouttes sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions Isco.

En vue de l'estimation de la radioactivité acido-précipitable, des aliquotes de 25 ou 50 µl sont prélevées de chaque fraction et déposées sur une bande de papier Whatman 3 M. Les bandes sont ensuite séchées

puis plongées dans une solution d'acide trichloroacétique à 10 % glacé pendant 30 minutes. Elles sont rincées 2 fois dans de l'alcool à 94° dénaturé froid puis séchées à l'étuve à 60 °C pendant 60 minutes. Les bandes sont ensuite découpées et les différents petits carrés de papier correspondant à chaque fraction sont placés dans des fioles à scintillation en vue de l'estimation de la radioactivité après addition de milieu scintillant (7,5 ml).

X. RECHERCHE DE DNA CIRCULAIRES

(ZAENEN et al., 1974)

Les bactéries sont cultivées en présence de thymine-6-³H (0,1 mCi/ml) et de 0,025 % (ou 1,00 mM) désoxyadénosine (BOYCE et SETLOW, 1962 ; MUNCK-PETERSEN, 1967). En fin de phase logarithmique, les cultures sont centrifugées et le culot est lavé 2 fois par du tampon TE froid puis resuspendu dans du tampon TE.

Les membranes sont fragilisées par action du lysozyme à 37 °C (1 mg/ml) pendant 5 heures pour *S. flava* ATCC 540, (0,5 mg/ml) pendant 1 heure pour les autres bactéries. On ajoute ensuite du Sarkosyl (1 %, concentration finale), de la pronase (500 µg/ml, concentration finale) et l'incubation à 37 °C est poursuivie pendant 90 minutes. A ce moment la solution devient translucide. Le lysat est agité à la vitesse maximum d'un Vortex (Springfield - U.S.A.) pendant 30 secondes afin de réduire la longueur des chaînes de DNA chromosomique non circulaire, plus fragile que le DNA circulaire.

La séparation des molécules de DNA circulaires et linéaires est faite par centrifugation en gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium.

A 2 ml du lysat obtenu, on ajoute 6,55 g de CsCl, 2 ml de tampon TES contenant 1,25 g/ml de bromure d'éthidium (B.E.) et 2,8 ml de tampon TES et l'indice de réfraction est ajusté à 1,3925 (HUMPHREYS et al., 1975). 6 ml de la solution sont centrifugés dans un rotor à angle fixe pendant 63 heures à 25 °C. Les tubes sont ensuite fractionnés selon la technique de LEDOUX et CHARLES (1972). On recueille des fractions de 4 gouttes et la radioactivité totale ou acido-précipitable est estimée comme décrit précédemment, sur des aliquotes de chaque fraction.

Les fractions qui correspondent aux différents pics sont rassemblées et diluées avec de l'eau distillées, elles sont ensuite agitées avec un même volume de butanol saturé en H₂O (LE PECQ, 1971). Le B.E. passe en solution dans la phase butanol qui se colore en rouge. Le traitement est répété jusqu'à ce que la solution contenant le DNA soit incolore. Celle-ci est ensuite dialysée au froid pendant 40 heures contre 2 fois 2 litres (pour 1 ml de solution) de tampon NaCl, Tris, EDTA pH 7,6.

XI. PROCÉDES DE TRANSFORMATION

A. *Micrococcus* (KLOOS, 1969b ; KANE et KLOOS, 1970)

A la densité cellulaire choisie, les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 3500 tours. Le culot est remis en suspension dans

du "bouillon de transformation" (KANE et KLOOS, 1970). On ajoute le DNA (concentration finale 10 µg/ml) et le mélange est agité à 230 agitations par min (position 8 d'un Köttermann "va-et-vient") pendant 60 min. L'exposition au DNA est arrêtée par addition de DNase (5 µg/ml, 5 mM MgSO₄), et incubation à 37 °C pendant 15 minutes.

Les cellules sont centrifugées, lavées puis resuspendues dans du NaCl 0,14 M. Elles sont ensuite diluées et étalées sur les boîtes de Petri contenant le milieu 9 de *micrococcus* avec ou sans tryptophane.

Lorsque le point maximum de transformation a été déterminé, les cellules peuvent être conservées en vue de leur traitement ultérieur à -80 °C en présence de glycérol (10 %) (DUBNAU et al., 1967) dans de petits tubes en plastique stériles.

Nous avons suivi le même mode opératoire lors de l'étude de la prise de DNA radioactif homologue ou hétérologue, la radioactivité acido-insoluble fixée par les cellules étant estimée sur une aliquote de la suspension après traitement par la DNase et lavages par du NaCl 0,14 M.

A 1 ml de la suspension, on ajoute 1 ml de TCA 10 % et le mélange est incubé pendant 30 minutes dans un bain glacé. Il est ensuite filtré (filtre GF-C Whatmann) et après deux lavages par du TCA à 5 % froid, le filtre est séché sous une lampe Infra-rouge de 500 W pendant 30 min. Lorsque le filtre est parfaitement sec, la radioactivité est estimée par scintillation liquide après addition de 7,5 ml de milieu scintillant approprié.

B. *Anacystis*

La méthode est basée sur celles de SHESTAKOV et KHYEN (1970) et de ORKWISZEWSKI et KANEY (1974).

Lorsque la concentration cellulaire est comprise entre 4 et 6×10^7 cellules par ml, les cellules sont centrifugées dans un tube cylindro-conique. Le culot est remis en suspension dans du tampon phosphate pH 8,0. On ajoute alors le DNA (de 20 à 50 $\mu\text{g/ml}$, concentration finale) et le mélange est incubé pendant 4 heures, sous 2500 lux à 32 °C en agitant de temps à autre. Les cellules sont ensuite traitées par la DNase (concentration finale 20 $\mu\text{g/ml}$ en présence de MgSO_4 5 mM) pendant 15 minutes à 37 °C. Elles sont centrifugées, lavées deux fois avec une solution de NaCl 0,14 M et remises en suspension dans du NaCl 0,14 M. Après différentes dilutions, elles sont étalées sur boîtes de Petri contenant du milieu G-11 (pour les transformants) supplémenté avec les exigences (pour les comptes viables).

XII. ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA PRISE DE DNA BACTERIENS RADIOACTIFS

A différents moments de la courbe de croissance ou après synchronisation

Au moment choisi, les cellules sont centrifugées (20 minutes à 3500 tpm) puis remises en suspension dans le milieu d'incubation adéquat :

tampon phosphate pH 8,0 pour *A. nidulans*

pH 7,0 pour *E. gracilis*

pH 6,2 pour *O. danica* et *P. helvetica*

pH 7,3 pour *P. cruentum*

pH 6,0 pour *S. obliquus*.

On ajoute le DNA bactérien radioactif (concentration finale 30 µg/ml) et l'incubation s'effectue en agitant doucement dans les conditions de température et de lumière identiques à celles décrites pour la culture de chaque algue. Le temps d'incubation est de 2 heures pour *A. nidulans* et *S. obliquus* ; il est de 4 heures pour *O. danica*, *P. helvetica*, *E. gracilis* et *P. cruentum*.

La suspension est alors centrifugée, les cellules sont lavées par du NaCl 0,14 M et resuspendues dans du NaCl 0,14 M.

On ajoute de la DNase (concentration finale 20 µg/ml) et du MgSO₄ (concentration finale 5 mM). La suspension est incubée à 37 °C pendant 15 minutes. Les cellules sont centrifugées et lavées 1 fois par du NaCl 0,14 M.

Le culot est extrait par du PCA à 5 % pendant 30 minutes à 0 °C. Après centrifugation, il est lavé 1 fois par du PCA 5 % froid. Il est finalement extrait par du PCA 5 % à 70 °C pendant 20 minutes. Les surnageants, lavages et extraits sont conservés au froid (-40 °C) en vue de l'estimation ultérieure de la radioactivité acido-soluble et acido-précipitable.

XIII. ETUDE BIOCHIMIQUE DU SORT DE DNA BACTERIENS RADIOACTIFS APRES PLUSIEURS DIVISIONS CELLULAIRES

Après la période d'incubation en présence de DNA bactérien radioactif (comme en XII), les cellules sont centrifugées puis lavées 2 fois

dans du NaCl 0,14 M. Elles sont ensuite resuspendues dans du milieu de culture frais de telle sorte que la concentration cellulaire soit comparable à la concentration cellulaire du milieu de culture avant l'incubation avec le DNA radioactif. On ajoute alors du DNA (concentration finale 30 $\mu\text{g/ml}$) identique à celui qui a servi à l'expérimentation mais non radioactif, et la culture est poursuivie dans les conditions normales de température et d'éclairage pendant 48 heures pour *O. danica* et *P. cruentum* et pendant 72 heures pour *E. gracilis*, *P. helvetica* et *S. obliquus*. Les cellules sont ensuite centrifugées et conservées à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'extraction et la purification du DNA.

XIV. IRRADIATION DE *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

Les conditions d'irradiation ont été établies en fonction des travaux de OZENDA (1965).

La culture d'algues (25 ml) contenue dans une fiole de 125 ml est irradiée par le fond et par des rayons X à l'aide d'un appareil Philips RT 250. Nous avons utilisé un filtre en cuivre de 0,35 mm d'épaisseur, l'appareil étant placé sous une tension de 250 kV et un ampérage de 14,5 mA.

Dans ces conditions, à 20 cm de la source d'émission, nous avons obtenu une irradiation de 720 R par minute et une couche de demi-absorption de 125 mm de Cu.

Doses utilisées :

	Dose (R)	Temps (min)
A :	1000	1,39/100
B :	2000	2,78/100
C :	4000	5,55/100

XV. AUTORADIOGRAPHIE (GUDE, 1968)

A. Sur frottis

Après incubation avec les DNA radioactifs, les cellules sont lavées, resuspendues dans du NaCl 0,14 M et étalées sur des lames de microscope gélatinées. Après séchage à température ordinaire, le matériel est fixé pendant 1 nuit au froid par le fixateur de CLARKE (1851) : alcool-acide acétique, 3 : 1.

Les lames sont conservées dans de l'alcool à 70 % à 4 °C jusqu'à application de l'émulsion. Nous avons suivi la méthode dite de "dipping" de JOFTES et WARREN (1955). Les lames sont séchées à température ordinaire. L'émulsion sous forme de gel (L4-Ilford) est diluée par une même quantité en poids d'eau distillée. Elle est placée dans un bain-marie à 49 °C dans l'obscurité, est ensuite filtrée sur gaze pour éliminer les agrégats et les bulles d'air en suspension.

Les lames sont plongées dans cette émulsion, mises à sécher sur un portoir pendant 1 heure environ à température ambiante, puis rangées dans une boîte à lames de microscope contenant un dessicatif (Drierite).

La boîte est scellée par une bande adhésive et placée en chambre froide à 4 °C.

Après une période d'exposition adéquate, les lames sont plongées pendant 7 min à 18 °C dans un révélateur D 19 (Kodak), ensuite pendant 30 secondes dans un bain d'arrêt d'acide acétique à 1 %. L'émulsion est alors fixée pendant 2 min à 20 °C (acid-fixeur Kodak). Les préparations sont lavées à l'eau courante pendant 30 min, puis séchées à température ambiante.

Coloration. Les cellules sont colorées suivant la technique de JOHANSEN (1940), adaptée à notre matériel particulier. Toutes les opérations s'effectuent à température ordinaire :

1. Les lames sont plongées dans une solution de Safranin O (Gurr) à 1 % dans de l'alcool à 50 %, pendant 1 jour.
2. Elles sont ensuite lavées à l'eau courante pendant 5 minutes.
3. Elles sont plongées dans une solution aqueuse fraîchement préparée de crystal violet (Chroma) à 1 %, pendant 4 heures.
4. Elles sont lavées dans de l'eau courante pendant quelques minutes.
5. Elles sont ensuite plongées dans une solution saturée aqueuse d'Orange G (Merck) pendant 5 minutes.
6. Elles sont rincées rapidement pendant quelques secondes avec de l'eau, de l'alcool à 95 % et enfin de l'alcool absolu.

B. Sur coupes

Pour obtenir une localisation plus précise des grains d'argent, une étude autoradiographique a également été faite sur coupes semi-fines

de 2 μm préparées suivant la méthode décrite au chapitre suivant (microscopie électronique, technique par filtration sur filtre Millipore). Les coupes sont déposées séparément sur une goutte d'eau bidistillée placée sur une lame de microscope gelatinée ; les lames sont mises à sécher puis l'émulsion est appliquée comme décrit ci-dessus.

L'exposition et le traitement de l'émulsion se faisant comme pour les frottis, les cellules sont colorées à l'aide d'une solution aqueuse de Toluidine Bleu (Gurr) à 1 %, pendant 15 min.

XVI. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

Deux méthodes nous ont donné des résultats satisfaisants :

A. Technique en tube à essai

Fixation. Les cellules sont mises en suspension dans une solution de glutaraldéhyde (Serva) à 1 % dans du tampon cacodylate 0,1 M. La durée de la fixation peut varier entre 1h30 et 18h (le plus souvent) (NILSHAMMAR et WALLEES, 1974).

La suspension est alors centrifugée pendant 10 min, et le culot de cellules est lavé pendant 30 min, 2 fois avec du tampon cacodylate 0,1 M. Le culot est ensuite remis en suspension dans une solution de OsO_4 à 1 % dans l'eau bidistillée, pendant 2h. Après centrifugation, le culot est lavé pendant 2 fois 20 min par de l'eau bidistillée. Une première coloration est alors effectuée en incubant les cellules pendant 4h dans une solution aqueuse d'acétate d'uranyl (Merck), à 0,5 %. Les cellules sont lavées

pendant 15 min par de l'eau bidistillée, elles sont ensuite déshydratées par passages successifs dans des solutions alcooliques de plus en plus concentrées :

- pendant 15 min dans l'éthanol 30 % (2 fois)
- pendant 15 min dans l'éthanol 50 % (2 fois)
- pendant 1 nuit dans l'éthanol 70 % (à 4 °C)
- pendant 20 min dans l'éthanol 90 % (2 fois)
- pendant 30 min dans l'éthanol 100 % (4 fois).

Les cellules (culot) sont ensuite traitées pendant 2 fois 30 min par de l'oxyde de propylène (Fluka). A ce moment, le culot est retiré délicatement du fond du tube à l'aide d'une spatule et déposé dans une petite fiole contenant de la résine SPURR (1969) à 10 % dans de l'oxyde de propylène, où il est fractionné mécaniquement en petits morceaux qui sont traités successivement à température ambiante par :

- du Spurr à 10 % dans de l'oxyde de propylène pendant 1h, 2 fois
- du Spurr à 20 % dans de l'oxyde de propylène pendant 1h, 4 fois
- du Spurr à 30 % dans de l'oxyde de propylène pendant 1 nuit (sous hotte).

L'oxyde de propylène s'évapore et le matériel se trouve finalement en suspension dans du Spurr à 100 %. Les fragments sont prélevés, déposés dans des gelules contenant du Spurr à 100 % et mis au dessicateur pendant 1 journée, ce qui permet aux petits morceaux de sédimenter lentement jusqu'au fond de la gelule. La polymérisation s'effectue alors à 60 °C pendant 18h au moins.

Des coupes ultrafines de 40 à 80 nm sont obtenues à l'aide d'un microtome "Ultratome III" (LKB), elles sont déposées sur des grilles

en cuivre pour microscope électronique.

Ces coupes sont colorées par de l'acétate d'uranyl (Merck) à 5 % aqueux pendant 10 à 20 min. Elles sont lavées à l'eau bidistillée puis colorées au citrate de plomb (REYNOLDS, 1963) à 1 % pendant 3-4 min.

L'examen des coupes a été fait au microscope électronique Philips E.M. 300.

B. Technique par filtration sur filtre Millipore

Le procédé est le même que pour la technique ci-dessus sauf que les algues au lieu d'être mises en culot par centrifugation, sont filtrées sur filtre Millipore de 0,10 μm , après la fixation par le glutaraldéhyde à 1 %.

De cette façon, on obtient une couche de même épaisseur dans laquelle les algues sont toutes accessibles de la même manière aux réactifs qui sont déposés délicatement sur le filtre et qui sont ensuite aspirés au travers du filtre, après le temps d'incubation nécessaire.

Le filtre se dissout lorsqu'il est déposé dans l'oxyde de propylène et il ne reste qu'une fine pellicule composée d'algues.

XVII. ANALYSE PAR REASSOCIATION MOLECULAIRE ET THERMO-CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE

Le DNA à analyser est dépolymérisé par l'action des ultra-sons pendant 10 min avec un "Mullard Ultrasonic Power Unit" (U.K.) et dénaturé à 100 °C pendant 15 min en présence de DNA non-radioactif (dépolymérisé par action des ultra-sons) de *M. lysodeikticus*, dans une solution 0,4 M en NaCl, 0,01 M en Tris (pH 7,4), 1 % en SDS et 50 % en formamide.

L'échantillon est ensuite incubé à 51 °C. La réaction de réassociation est poursuivie de façon à obtenir une valeur de Cot^* égale à 100 par rapport au DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*. Elle est ensuite arrêtée par dilution de l'échantillon avec du tampon phosphate (TP) 0,01 M.

L'échantillon est ensuite fractionné sur une colonne d'hydroxylapatite (HAP) suivant la méthode décrite par BRITTEN et KOHNE (1968) et par BRITTEN et al. (1974).

La solution diluée, contenant le DNA réassocié, est déposée sur une colonne (0,3 ml, volume tassé) chauffée à 60 °C. La colonne est lavée trois fois par 2 ml de TP 0,01 M.

Le DNA monocaténaire est ensuite élué avec trois fois 1 ml de TP 0,12 M.

La thermo-chromatographie du DNA réassocié est ensuite réalisée selon MIYAZAWA et THOMAS (1965). La température de la colonne est augmentée par incréments de 5 °C. A chaque pallier thermique, le DNA dénaturé est

* Cot : le produit de la concentration en DNA (exprimée en moles de nucléotides par litre) par le temps d'incubation exprimé en secondes

élué par deux fois 1 ml de TP 0,12 M préchauffé à la température de la colonne.

La radioactivité des fractions éluées est déterminée par comptage en scintillation liquide en présence de liquide scintillant (CEN/SCK, Mol).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Etude et caractérisation de l'acide désoxyribonucléique (DNA) bactérien

Pour pouvoir étudier la prise et suivre le sort de DNA exogène dans un organisme, il est nécessaire de pouvoir le différencier du DNA endogène.

A cet égard, les DNA bactériens sont des matériaux de choix. En effet, ils peuvent être choisis en fonction de leur densité en gradient de CsCl de telle sorte que celle-ci soit différente de celle du DNA de l'organisme récepteur. De plus, les DNA bactériens peuvent aisément être obtenus radioactifs.

A. ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE

Nous allons donner un exemple d'estimation du poids moléculaire d'un DNA extrait d'un culot de *S. flava* ATCC 540. Les résultats sont rassemblés dans le tableau I (p. 42).

Le graphique obtenu en portant en ordonnée les valeurs de la viscosité réduite (en dl/g) et en abscisse les concentrations correspondantes (en g/dl) est illustré par la figure 1 (p.43).

L'intersection de la droite de régression la plus probable avec l'axe des ordonnées (extrapolation à la concentration égale à zéro), nous donne une estimation de la valeur de la viscosité intrinsèque $[\eta]$. Sur la figure 1, nous obtenons une valeur pour $[\eta]$ égale à 180 dl/g.

TABLEAU I

Estimation de la viscosité réduite. Résultats des mesures des temps de rotation dans le viscosimètre de Couette

N° exp.	C _{DNA} [µg/ml]	t _s rot. [s]	t _{DNA} rot. [s]	η _{rel}	η _{sp}	η _{sp} = $\frac{\eta_{sp}}{C}$ [dl/g]
1	73,35	26,66	232,4	8,717	7,717	1052,1
2	36,45		82,5	3,095	2,095	574,8
3	18,9		46,3	1,737	0,737	389,9
4	12,6		38,2	1,433	0,433	343,7



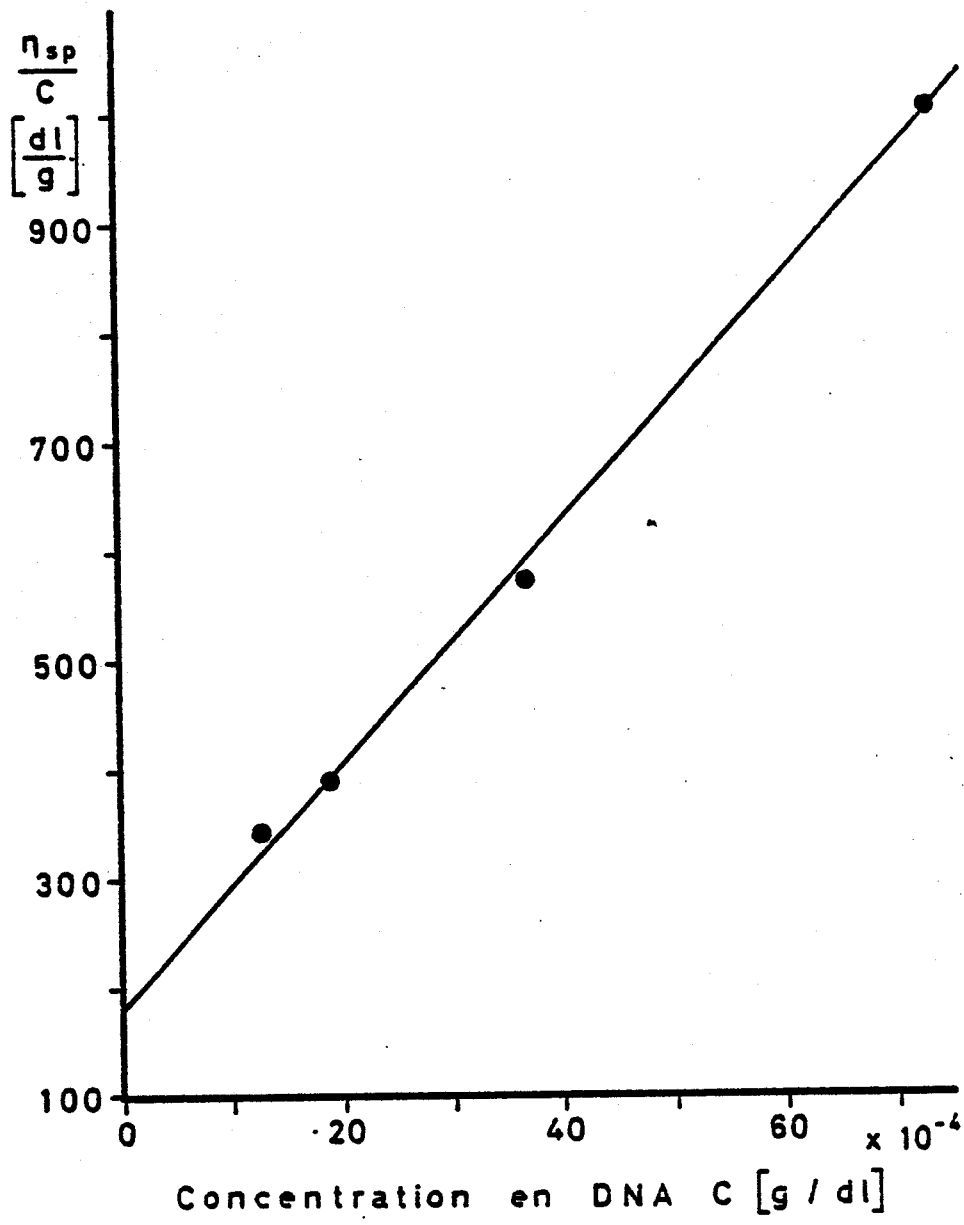


Fig. 1

Détermination du poids moléculaire du DNA de *S. flava* (EIGNER, 1968)

Soit à l'aide de l'abaque dessinée par EIGNER et DOTY (1965), soit à l'aide de la formule de CROTHERS et ZIMM (1965) (voir matériel et méthodes), nous obtenons pour cette valeur de $[\eta]$, un poids moléculaire de 52×10^6 daltons.

Le poids moléculaire des différentes préparations de DNA que nous avons utilisé pour nos expériences varient de 10 à 60×10^6 daltons.

Nos préparations de DNA bactériens, purifiées par centrifugation préparative en gradient de CsCl (FLAMM et al., 1969), contiennent moins de 1 % de RNA et moins de 2 % de protéines ou acides aminés (P. CHARLES, 1975).

Les activités spécifiques des DNA radioactifs sont égales ou supérieures à 1×10^6 dpm/ μ g.

B. RECHERCHE DE DNA CIRCULAIRES

Le génome bactérien est constitué en général d'un seul chromosome formé d'une longue double chaîne circulaire d'acide désoxyribonucléique.

Chez certaines espèces, on a signalé la présence d'éléments génétiques extrachromosomiaux (facteurs de fertilité, facteur de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds, ...). Ces éléments, pouvant être acquis ou perdus, ne sont pas essentiels à la survie des cellules (CLOWES, 1972).

Nous avons recherché la présence éventuelle de ces éléments extrachromosomiaux (plasmides - LEDERBERG, 1952) chez les différentes souches bactériennes que nous avons utilisées.

Cette recherche a été faite selon la technique de centrifugation en gradient de CsCl à pH neutre en présence de bromure d'éthidium (B.E.) (RADLOFF et al., 1967 ; ZAENEN et al., 1974).

Le B.E. est un agent trypanocide qui forme un complexe avec le DNA double-chaîne (WARING, 1965) ; il s'intercale entre les paires de bases du DNA, ce qui provoque un déroulement de la molécule de DNA, effet représenté schématiquement par CRAWFORD et WARING (1967).

Le B.E. permet parfois de séparer des molécules de DNA possédant des densités identiques, mais des conformations différentes. En effet, pour une molécule de DNA circulaire fermée, la quantité maximum de molécules de B.E. pouvant s'intercaler sera moindre que pour une molécule de DNA linéaire ou circulaire possédant une cassure. De ce fait, la diminution de la densité sera moindre pour une molécule circulaire que pour une molécule linéaire.

Pour la préparation des culots bactériens radioactifs, nous avons ajouté au milieu de culture normal de la thymine-6-³H et de la désoxyadénosine (voir matériel et méthodes). La comparaison des courbes de croissance de cultures radioactives (figure 2, p. 46) et non-radioactives (figure 3, p. 46), montre que le temps de génération est augmenté assez significativement en présence du précurseur radioactif. Les résultats sont rassemblés dans le tableau II (p. 47) et comme on peut le constater, le temps de dégénération est augmenté pour chacune des souches étudiées et cette augmentation est plus importante pour les souches mutées auxotrophes.

Les résultats de l'analyse des différents lysats par ultra-

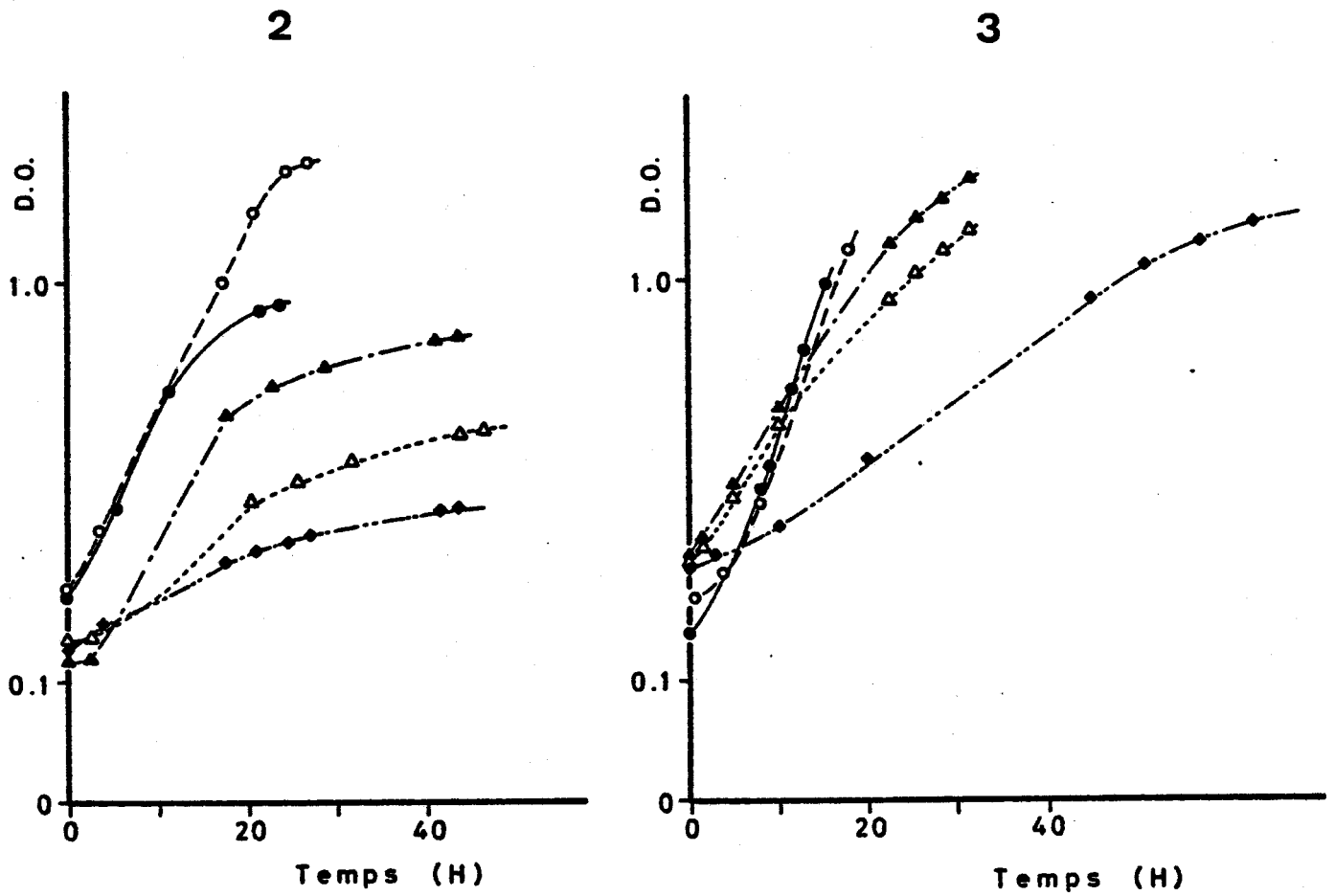


Fig. 2 et 3

Courbes de croissance de *S. flava* 540 (○—○), *M. lysodeikticus* 4698 (●—●), *M. lysodeikticus* trp C23 (▲—▲), *M. lysodeikticus* trp E16 (△—△), *M. lysodeikticus* his 25 (◆—◆) en absence (3) ou en présence (2) de précurseur radioactif



TABLEAU II

Valeurs des temps de génération pour quelques souches de *Micrococcus*
dans deux milieux différents

Souche	g dans milieu 9 non-radioactif	g dans milieu radioactif
<i>S. flava</i> ATCC 540	5h00	6h00
<i>M. l.</i> ATCC 4698	5h30	6h00
<i>M. l.</i> trp C 23	8h30	9h30
<i>M. l.</i> trp E 16	12h00	15h00
<i>M. l.</i> his 25	19h00	36h00

TABLEAU III

Densités en CsCl des DNA circulaires (I) et linéaires (II) de quelques
souches de *Micrococcus* et *Sarcina*

Souche	Densité en CsCl g/cm^3	
	I	II
<i>M. lysodeikticus</i> ATCC 4698	1,725	1,731
<i>S. flava</i> ATCC 540	1,726	1,727
<i>M. lysodeikticus</i> trp C 23	1,725	1,727
<i>M. lysodeikticus</i> trp E 16	1,726	1,727
<i>M. lysodeikticus</i> his 25	1,726	1,728



centrifugation en gradient de CsCl en présence de B.E. sont illustrés par les figures 4, 5, 6, 7 et 8 (p. 49).

Dans chaque cas, la distribution de la radioactivité dans le gradient est hétérogène : à côté d'un pic principal (II) correspondant au DNA chromosomique, nous observons un pic moins important (I).

Les fractions correspondant aux différents pics ont été rassemblées en vue de leur analyse par ultracentrifugation en gradient de CsCl en absence de B.E. cette fois. Les résultats, illustrés par les figures 9 et 10 (p.50) (*M. lysodeikticus* ATCC 4698), 11 et 12 (p.50) (*S. flava* ATCC 540), 13 et 14 (p.51) (*M. lysodeikticus* trp C23), 15 et 16 (p.51) (*M. lysodeikticus* trp E16), 17 et 18 (p.52) (*M. lysodeikticus* his 25), sont rassemblés dans le tableau III (p. 47).

Les pics "satellites" (I) représentent de 1 à 3 % de la radioactivité totale.

L'examen du tableau III (p. 47) montre que les molécules radioactives du pic I ont pratiquement la même densité en gradient de CsCl et que cette densité est très voisine de celle des molécules du pic II correspondant au DNA chromosomique sauf dans le cas de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 où une différence de 6 mg/cm^3 est observée.

Ces observations suggèrent la présence dans les différentes souches d'éléments circulaires extrachromosomiaux (plasmides).

Le rôle de ces plasmides n'est pas connu et leur étude génétique sort du cadre de notre travail.

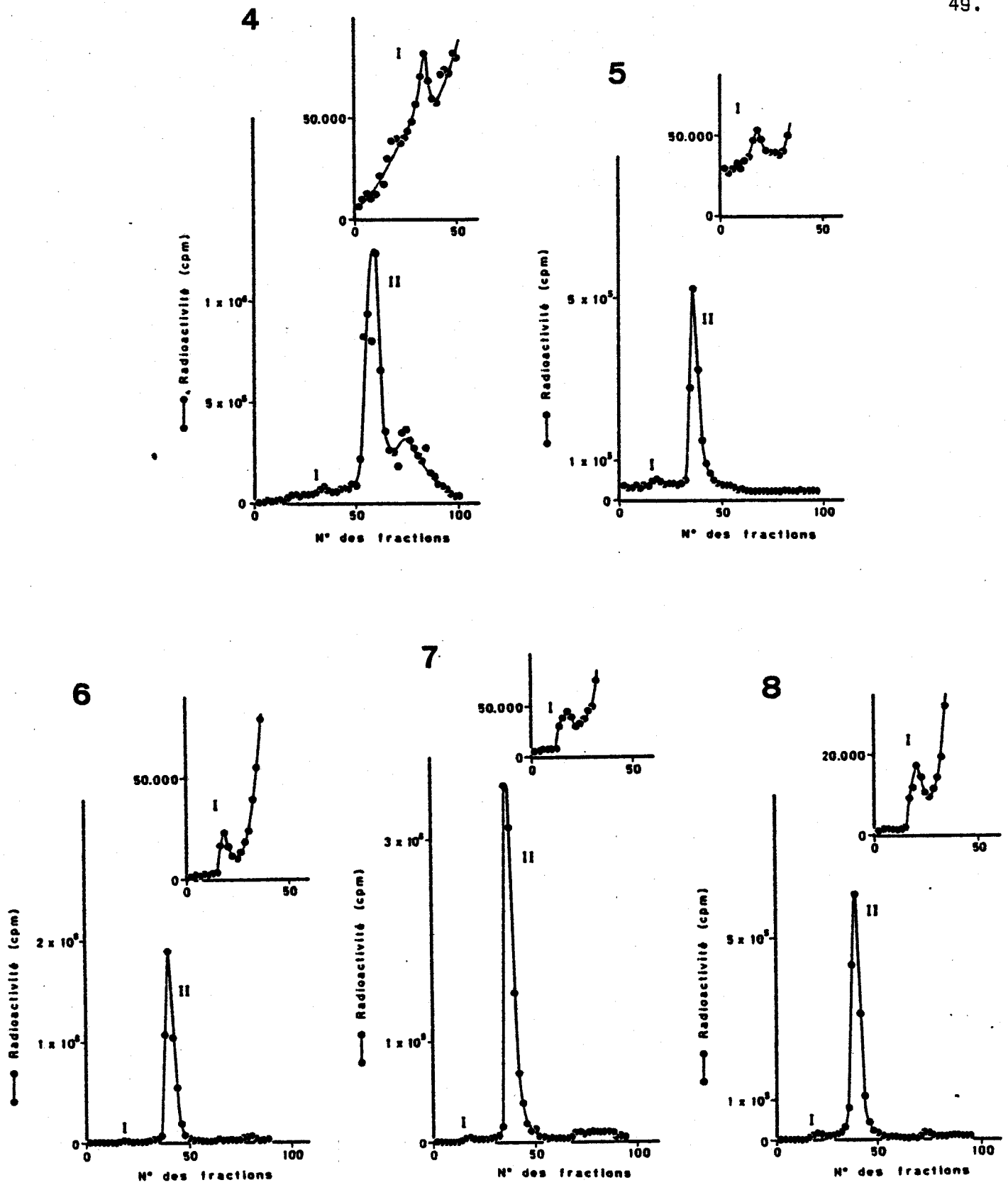


Fig. 4, 5, 6, 7 et 8

Analyse en gradient de CsCl en présence de B.E. de DNA de *M. lysodeikticus* 4698 (4), *S. flava* (5), *M. lysodeikticus trp C23* (6), *M. lysodeikticus trp E16* (7), *M. lysodeikticus his 25* (8).

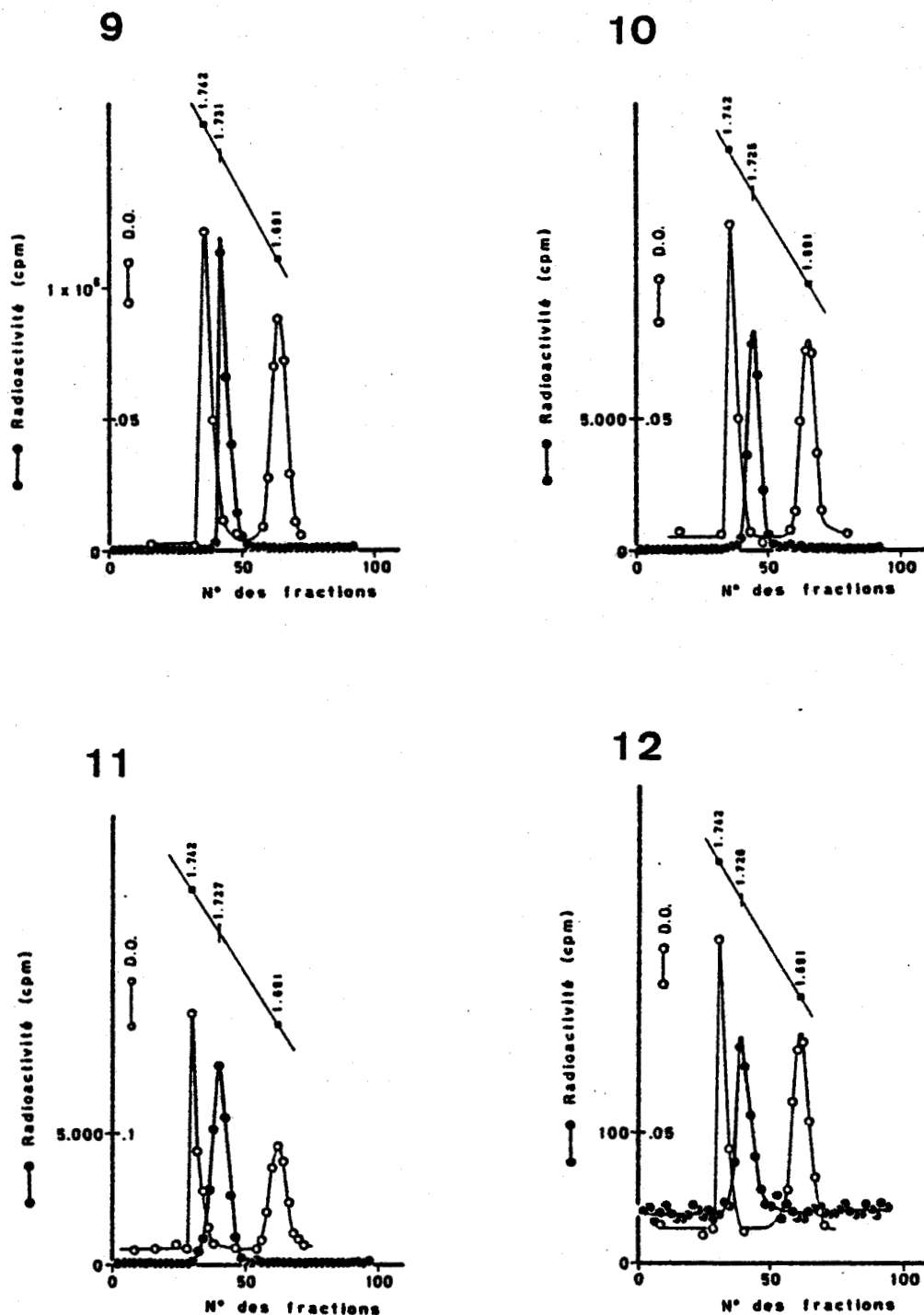


Fig. 9, 10, 11 et 12

Analyse en gradient de CsCl.

Fig. 9 : pic II de la Fig. 4

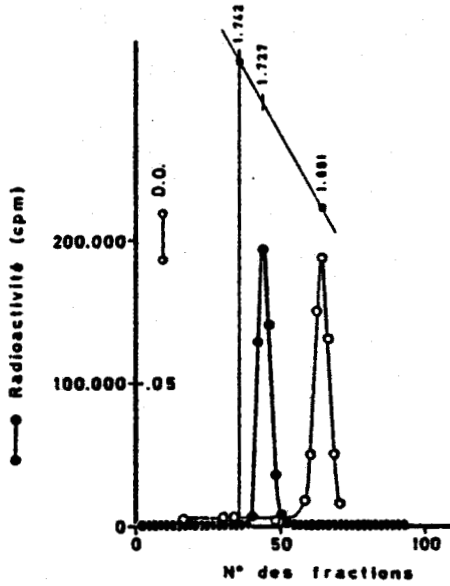
Fig. 10 : pic I de la Fig. 4

Fig. 11 : pic II de la Fig. 5

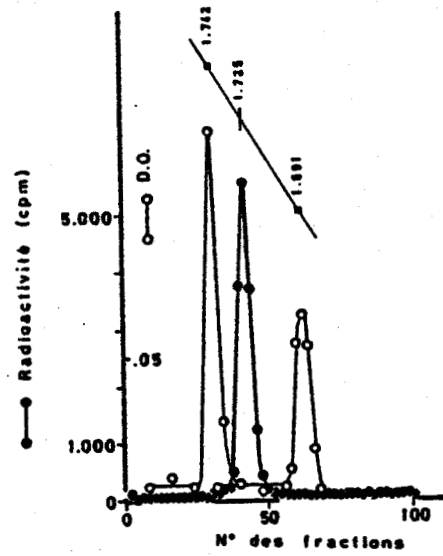
Fig. 12 : pic I de la Fig. 5

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³)

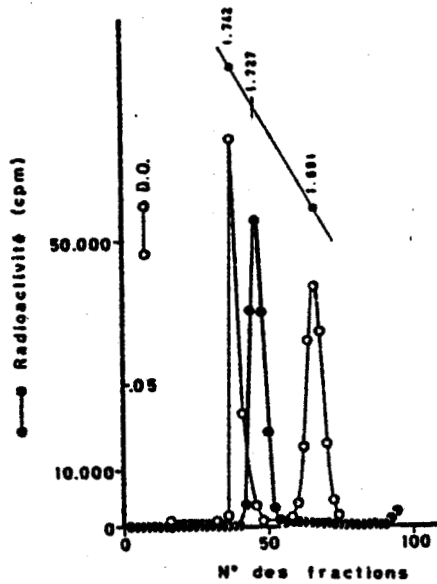
13



14



15



16

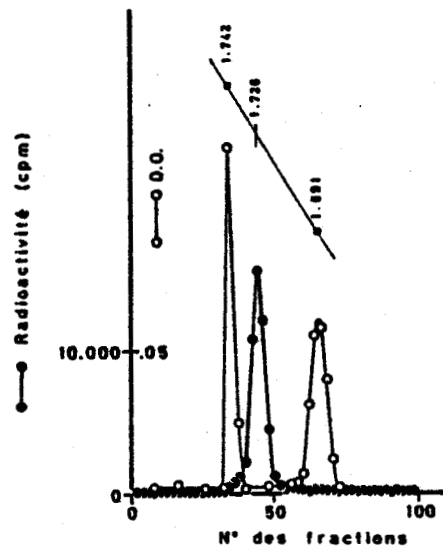


Fig. 13, 14, 15 et 16

Analyse en gradient de CsCl.

Fig. 13 : pic II de la Fig. 6

Fig. 14 : pic I de la Fig. 6

Fig. 15 : pic II de la Fig. 7

Fig. 16 : pic I de la Fig. 7

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$)

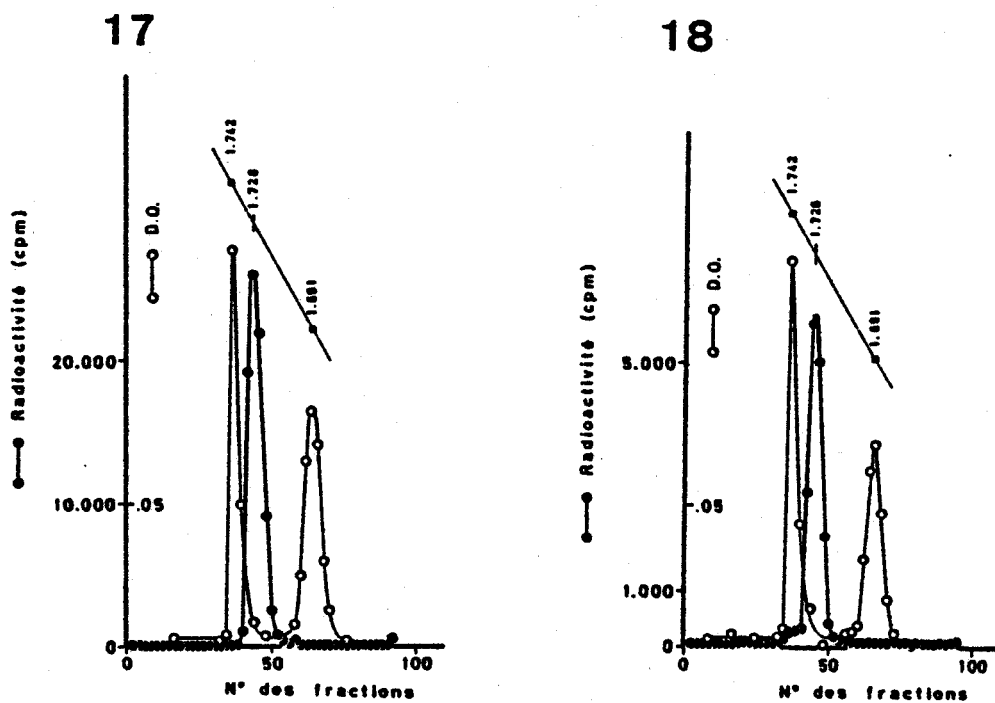


Fig. 17 et 18

Analyse en gradient de CsCl.

Fig. 17 : pic II de la Fig. 8

Fig. 18 : pic I de la Fig. 8

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$)

C. ETUDE GENETIQUE

1. Transformation biologique

Les travaux de KLOOS et son groupe avaient montré qu'avec *M. lysodeikticus* le succès et la reproductibilité des essais de transformation étaient très dépendants du milieu de culture. *Micrococcus* acceptait de se développer sur certains agars notamment et pas sur d'autres. Suite à leurs constatations, KLOOS et SCHULTES (1969) choisirent le "Special Agar Noble" de Difco pour la croissance des *Micrococcus*.

Dans un premier temps, nous avons reproduit les expériences de KLOOS et al. (1969, 1970) en recherchant les meilleures conditions expérimentales et en essayant plusieurs lots d'agar.

Les résultats de ces différents essais sont rassemblés dans le tableau IV (p. 54) et compte tenu de ces observations, nous avons utilisé pour nos expériences ultérieures l'agar-agar 1614 de Merck, "purifié exempt d'inhibiteurs pour la microbiologie".

Ces essais nous ont permis de confirmer les résultats de KLOOS sur *M. lysodeikticus* trp E 16 et ISJ ade⁻ (1969a), c'est-à-dire, l'existence d'une phase de compétence ainsi que le montrent les résultats rassemblés dans le tableau V (p.54) et illustrés dans la figure 19 (p.55).

2. Etude biochimique de la prise de DNA radioactifs homologue et hétérologue

Pour cette étude, nous avons utilisé du DNA radioactif de *S. flava* ATCC 540 (*M. luteus*) (activité spécifique 1×10^6 dpm/ μ g) et du

TABLEAU IV

Influence de différents agars sur les résultats de la transformation de
M. lysodeikticus

Type d'agar	Transformés $\times 10^{-3}$ par ml	Comptes viables (C.V.) $\times 10^{-7}$ par ml	Fréquence de transformation en %
Bacto-Agar (Difco)	0	0	-
Purified Agar (Difco)	1,6	6,0	0,003
Special Agar Noble (Difco)	1,2	4,9	0,002
Agar-Agar 1613 (Merck)	1,3	5,8	0,002
Agar-Agar 1614 (Merck)	32	7,4	0,043
Ion-Agar (Oxoid)	0,81	5,6	0,001

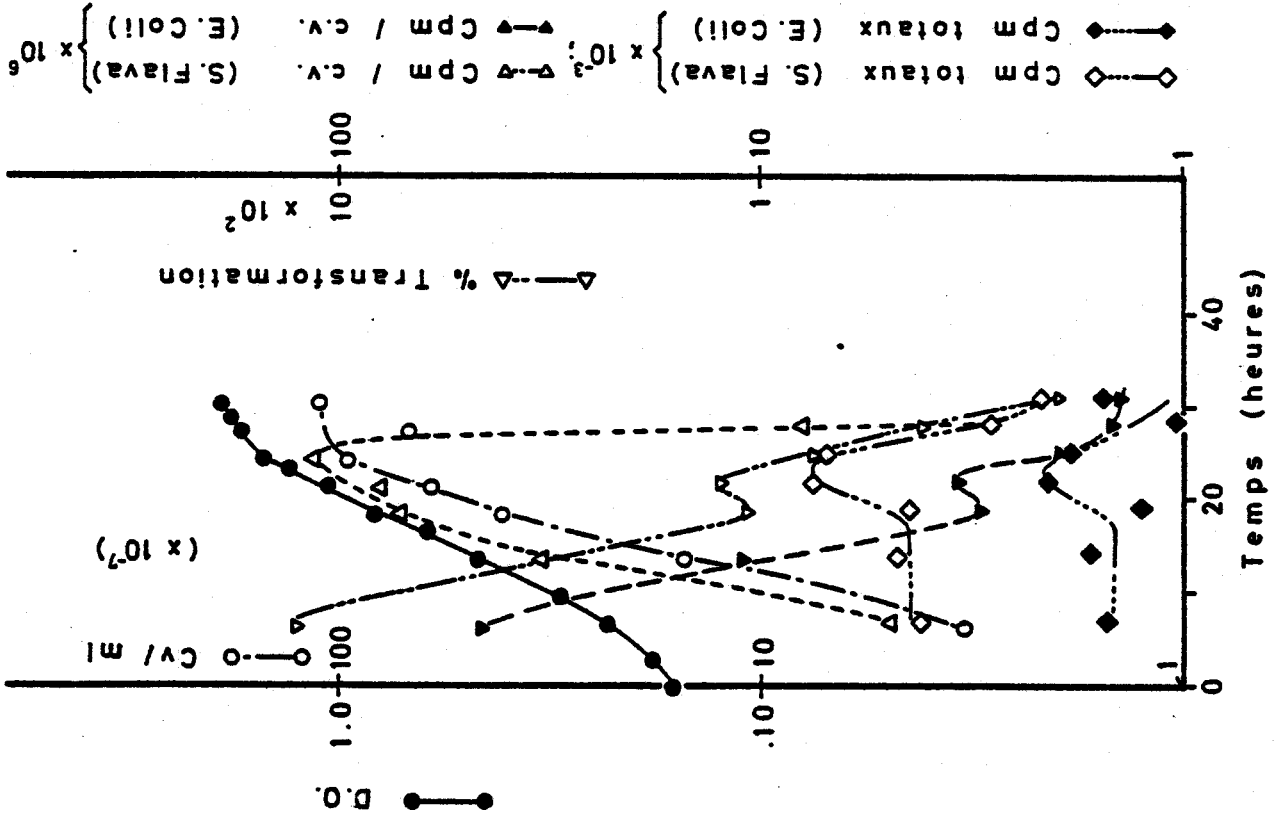
TABLEAU V

Etude de la transformation en fonction de la croissance, de *M. lysodeikticus*
trp C 23 par du DNA de *S. flava* ATCC 540

Point (heure)	D.O. culture (620-865 nm)	Réversants par ml	Transformés par ml	C.V. $\times 10^{-7}$ par ml	Fréquence transfo en %
14	0,225	350	4 000	1,8	0,020
19	0,350	390	11 000	3,4	0,031
25	0,660	1000	110 000	8,1	0,135
28	0,900	800	220 000	13	0,170
31	1,20	900	410 000	28	0,146
34	1,60	110	530 000	86	0,062
40	1,90	220	33 000	150	0,0022



20



19

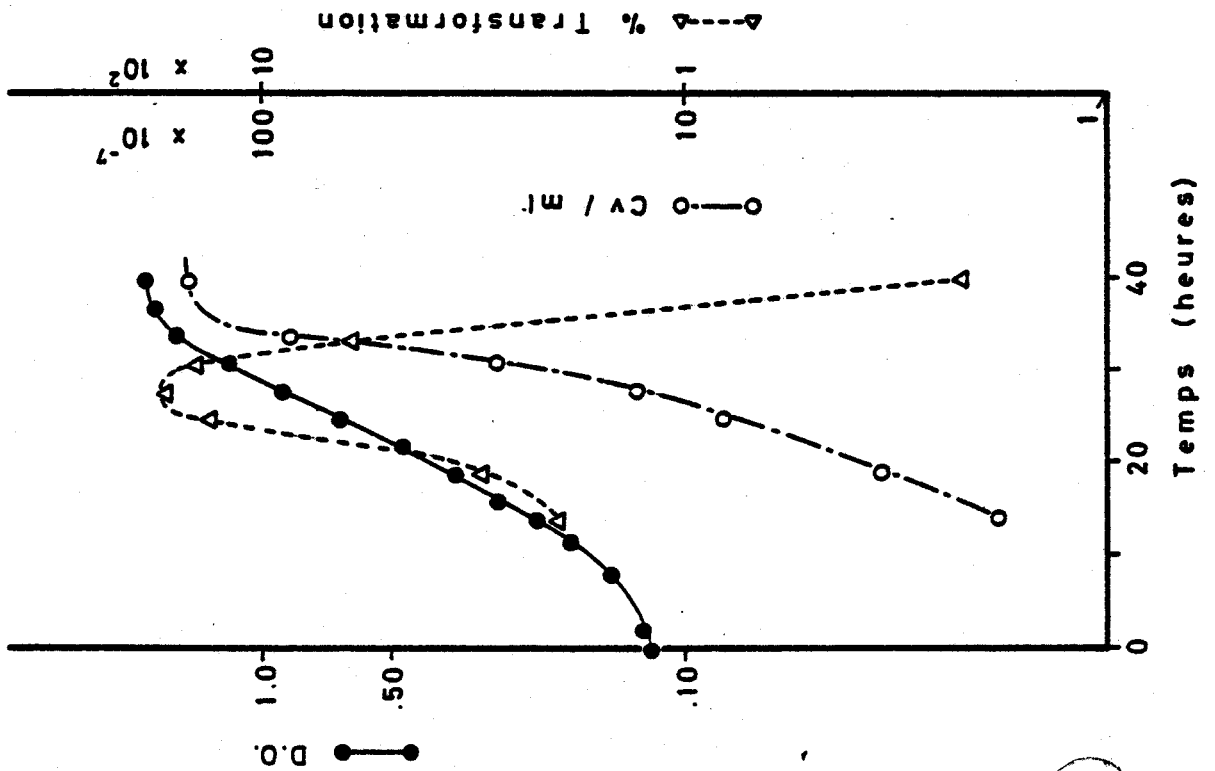


Fig. 19 et 20

Fig. 19 : pourcentage de transformation en fonction de la croissance chez *M. lysodeikticus* trp C23
 Fig. 20 : pourcentage de transformation, prise de DNA ^3H de *S. flava* et de *E. coli* en fonction de la croissance chez *M. lysodeikticus* trp C23

DNA de *E. coli* CR 34 (activité spécifique $1,6 \times 10^6$ dmp/ μ g).

Les cellules ont été incubées pendant 60 minutes dans le milieu de transformation (KANE et KLOOS, 1970) contenant le DNA radioactif (concentration 10 μ g/ml) à différents moments de la courbe de croissance. Les cellules ont ensuite été lavées et traitées par la DNase.

Une estimation de la radioactivité acido-précipitable nous donne une idée de la quantité de matériel radioactif ayant été absorbé par les cellules. Une étude faite en parallèle sur des aliquots des différents échantillons montre que, dans nos conditions expérimentales, les fréquences de transformation étaient semblables à celles observées lors de nos précédentes expériences.

Les résultats rassemblés dans le tableau VI (p. 57) et illustrés par la figure 20 (p. 55) montrent un pic de compétence situé entre la 22^{ème} et la 25^{ème} heure de croissance.

L'analyse des résultats montre sur la courbe de radioactivité totale en fonction du nombre d'heures de culture, un plateau qui correspond aux temps où les plus hauts pourcentages de transformation sont observés ! Toutefois, si cette radioactivité est rapportée à la radioactivité exprimée en nombre de coups par cellules viables, la courbe prend une toute autre allure et dans ce cas la quantité de radioactivité diminue en fonction du temps de croissance.

Dans les cellules incubées avec le DNA de *E. coli*, la quantité de radioactivité retrouvée est environ trois fois inférieure à celle observée lorsque les cellules sont incubées avec le DNA de *S. flava* ; en

TABLEAU VI

Résultats de la transformation de *M. lysodeikticus* trp C 23, par du DNA de *S. flava* ATCC 540, et de l'étude de la prise de DNA homologue et hétérologue (*E. coli* CR 34).

Point (heure)	D.O. cul-ture (620 nm)	Révertants par ml	Transfor-més par ml	C.V. $\times 10^{-7}$ par ml	Cpm totaux		Cpm/C.V. $\times 10^{-6}$ <i>S. flava</i> <i>E. coli</i>	Fréquence transformation en %	
					<i>S. flava</i>	<i>E. coli</i>			
7	0,230	1	1 700	3,3	4 143	1 513	126	46	0,005
14	0,470	14	50 000	15	4 757	1 652	31,7	11	0,0033
19	0,620	24	290 000	41	4 433	1 236	10,8	3,0	0,071
22	1,05	60	490 000	61	7 512	2 101	12,3	3,44	0,080
25	1,50	125	1 100 000	95	7 086	1 871	7,5	1,96	0,116
28	1,70	82	54 000	68	2 834	1 010	4,16	1,48	0,008
31	1,90	170	3 000	110	2 142	1 543	1,95	1,40	0,0003



tenant compte de ce que l'activité spécifique du DNA de *E. coli* était supérieure à celle du DNA de *S. flava*, on peut estimer que les cellules absorbent environ cinq fois moins de DNA de *E. coli* que de DNA de *S. flava*, sous forme polymérisée.

3. Etude de l'état de polymérisation de DNA ^3H dans les cellules de *M. lysodeikticus* trp C 23

En vue d'étudier la nature de la radioactivité présente dans les cellules après incubation avec les DNA radioactifs, nous avons répété ces expériences pour un temps de la courbe de croissance, et en utilisant deux DNA différents obtenus à partir de *S. flava* (activité spécifique : 1×10^6 dpm/ μg) et de *E. coli* (activité spécifique: $0,8 \times 10^6$ dpm/ μg).

La concentration en DNA du milieu d'incubation étant de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour le DNA de *S. flava* et de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour le DNA de *E. coli*.

Les cellules utilisées provenaient d'une culture de *M. lysodeikticus* trp C 23 arrivée à une D.O. de 0,83, et avec lesquelles nous avons observé une bonne fréquence de transformation, égale à 0,26 % ($7,3 \times 10^4$ transformés par ml pour $2,8 \times 10^7$ cellules viables par ml, avec 130 révertants par ml). Les cellules ont été incubées pendant 60 min dans le milieu de transformation contenant les différents DNA, elles ont ensuite été lavées et traitées à la DNase.

Les DNA extraits des différents échantillons ont été analysés par centrifugation en gradient de CsCl.

Les résultats sont illustrés par les figures 21 et 22 (p. 59).

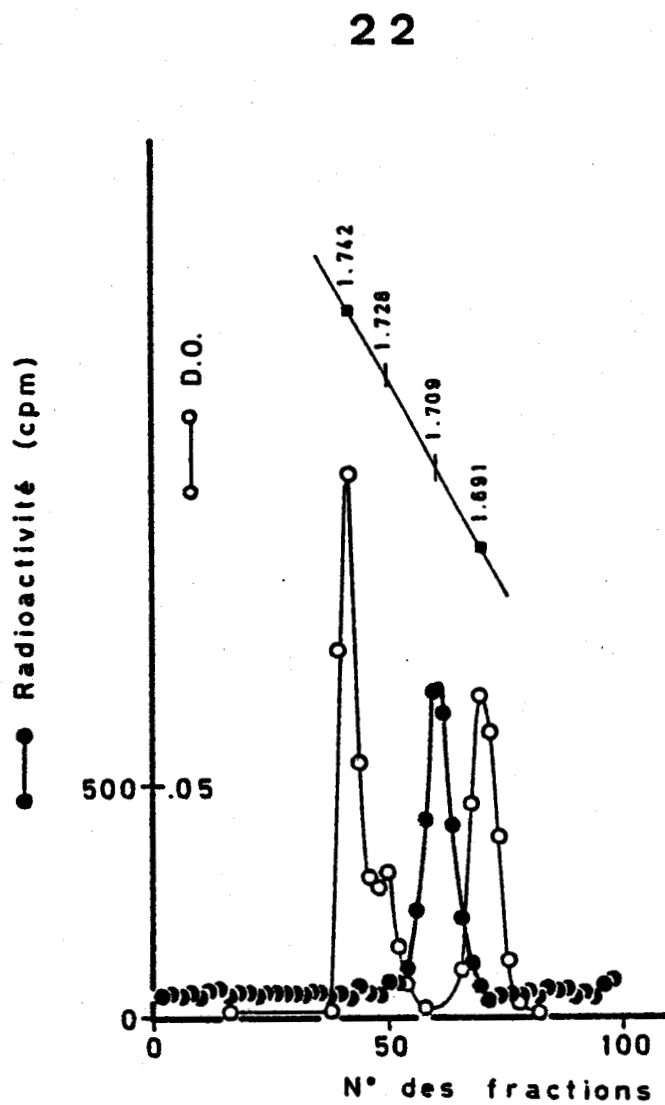
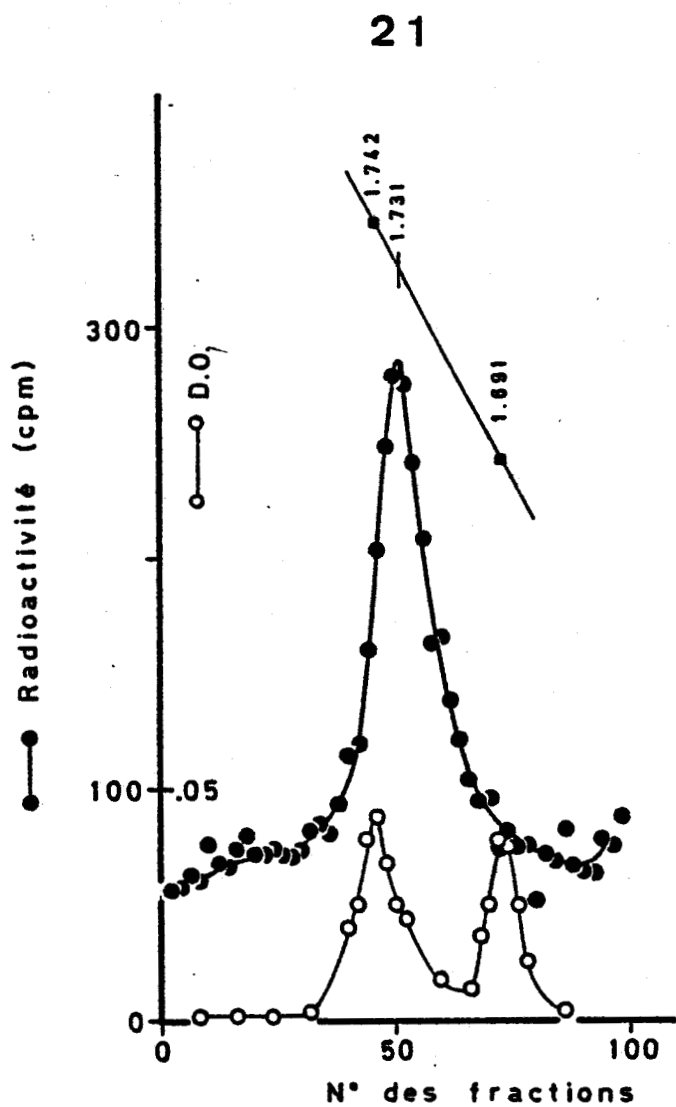


Fig. 21 et 22

Analyse en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules de *M. lysodeikticus* trp C23 après incubation :

Fig. 21 : avec du DNA ^3H de *S. flava*

Fig. 22 : avec du DNA ^3H de *E. coli*

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$)



Dans le cas des cellules traitées par le DNA de *S. flava*, on observe (figure 21, p.59) un pic de radioactivité correspondant à des molécules dont la densité est égale à $1,731 \text{ g/cm}^3$, densité très voisine de celle du DNA de *S. flava* (*M. luteus*) mais aussi de *M. lysodeikticus*.

Par contre, dans le cas des cellules traitées par du DNA de *E. coli* (figure 22, p.59), la radioactivité est portée par des molécules dont la densité est égale à $1,709 \text{ g/cm}^3$, densité du DNA de *E. coli*. Dans ce cas, il semble que l'on puisse conclure que des molécules pas ou peu modifiées de *E. coli* ont été prises par les cellules de *M. lysodeikticus*.

4. Essais de transformation hétérologue

Les résultats précédents ayant montré que du DNA de *E. coli* pouvait être pris intact ou peu modifié par les cellules de *M. lysodeikticus* trp C 23, nous avons voulu voir si le DNA de *E. coli* pouvait transformer ce mutant de *M. lysodeikticus*.

Nous avons utilisé des cellules provenant d'une culture dont la D.O. était égale à 1,3. La concentration des DNA dans le milieu de transformation était de $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ pour le DNA de *S. flava*, tandis que nous utilisons trois concentrations différentes pour le DNA de *E. coli* P4 x Jex 8 : 50, 100 et $200 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VII (p.61). Alors que la fréquence de transformation était particulièrement élevée lorsque les cellules avaient été traitées par le DNA de *S. flava*, la fréquence de transformation observé avec les cellules traitées par le DNA de

TABLEAU VII

Résultats de la transformation de *M. lysodeikticus trp C 23* par du DNA homologue et hétérologue

DNA donneur	Concentration en DNA donneur $\mu\text{g/ml}$	Révertants par ml	Transformés par ml totaux	moins révertants	C.V. $\times 10^{-8}$ par ml	Fréquence transformation $\% \times 10^4$
<i>S. flava</i>	10	2	520 000	520 000	2,9	1 800
<i>E. coli</i>	50	2	5	3	1,9	0,015
<i>E. coli</i>	100	2	5	3	2,4	0,012
<i>E. coli</i>	200	2	15	13	2,2	0,052



E. coli à la concentration la plus élevée (200 µg/ml) n'est pas significativement différente de la fréquence de réversion de la souche utilisée et qui est égale à $1-2 \times 10^{-6}$ % environ.

5. Les gènes adénine et tryptophane sont-ils liés chez *S. flava* ?

La souche *S. flava* (*M. luteus*) ATCC 540 est adénine dépendante ; nous avons donc ajouté de l'adénine à nos boîtes minimales, pour permettre la croissance des bactéries trp^- devenues trp^+ et peut-être ade^- .

Pour voir s'il existait une liaison entre les gènes adénine et tryptophane de *S. flava*, nous avons mis en culture sur boîtes contenant le milieu 9 supplémenté d'adénine, des colonies transformées apparues sur boîtes contenant le milieu 9 supplémenté d'adénine. Nous avons effectué des répliques à partir de ces boîtes, sur boîtes avec du milieu minimal et sur boîtes avec milieu minimal supplémenté d'adénine.

Nous n'avons observé aucune différence, ni dans le temps d'apparition ni dans le nombre des colonies qui se multipliaient sur les différents milieux.

Nous pouvons donc conclure que les gènes adénine et tryptophane ne semblent pas être liés chez *S. flava*.

D. CONCLUSIONS

1. Nous avons mis en évidence l'existence de DNA circulaires, dans toutes les souches de *Micrococcus* que nous possédions.

Pour *M. lysodeikticus* ATCC 4698, le DNA circulaire possède en gradient de CsCl une densité égale à $1,725 \text{ g/cm}^3$, légèrement différente de celle du DNA chromosomique ($1,731 \text{ g/cm}^3$). Pour les autres souches, les densités en gradient de CsCl des DNA circulaires et chromosomiques sont sensiblement égales et voisines de $1,726 \text{ g/cm}^3$.

2. Nous avons étudié le pouvoir transformant du DNA de *S. flava* (*M. luteus*) ATCC 540 sur la souche de *M. lysodeikticus* trp C 23 tryptophane dépendante, et avons obtenu des résultats comparables à ceux de KLOOS : existence d'une phase de compétence en fin de croissance exponentielle, obtention de fréquences de transformation supérieure à 0,1 % au pic de compétence.
3. Nous avons étudié, avec la souche *M. lysodeikticus* trp C 23, la prise de DNA ^3H de *S. flava* (*M. luteus*) et de *E. coli* en fonction de la courbe de croissance. Nous avons observé une prise plus importante (radioactivité totale) au moment du pic de compétence.

L'analyse en gradient de CsCl a montré l'existence de molécules de DNA de *E. coli* peu ou pas modifiées dans les cellules de *M. lysodeikticus* trp C 23.

4. Lors des essais de transformation de *M. lysodeikticus* trp C 23 par le DNA de *E. coli*, la fréquence de transformation hétérologue était très faible et pas significativement différente de la fréquence de réversion.

5. Nous avons montré que, dans nos conditions expérimentales, les gènes adénine et tryptophane de *S. flava* (*M. luteus*) ATCC 540 n'apparaissent pas comme liés.

II. Caractérisation du DNA des différentes souches d'algues utilisées

Le but de notre travail étant d'étudier la prise et le sort de DNA bactérien chez certaines espèces d'algues pro- et eucaryotes, nous devions avant toute autre chose, caractériser le ou les DNA des organismes étudiés.

Cette caractérisation a été faite en analysant par centrifugation en gradient de CsCl, les différentes fractions obtenues lors de la purification de l'extrait cellulaire par filtration moléculaire sur gel d'agarose.

Par chromatographie sur gel d'un extrait partiellement purifié, on observe deux grandes classes de molécules absorbant la lumière U.V. : les premières, éluées au volume mort, sont constituées de matériel de haut poids moléculaire (dont le DNA), les secondes éluées plus tard (à un volume d'éluant correspondant à environ trois fois celui du volume mort) sont constituées de matériel de faible poids moléculaire (protéines, nucléotides, acides aminés, pigments, etc.). Les différentes fractions qui constituent les deux pics principaux ont été rassemblées et analysées séparément.

A. *Anacystis nidulans*

Nous avons testé différentes méthodes déjà publiées pour lyser les cellules d'*A. nidulans* (CRAIG et al., 1969 ; SHESTAKOV et KHYEN, 1970 ; STANIER et al., 1971 ; DMITRIEV et GRODZINSKY, 1975). Comme ces méthodes ne semblaient pas quantitatives, nous avons mis au point une méthode plus

satisfaisante (voir matériel et méthodes).

La figure 23A (p. 67) illustre les résultats de la chromatographie sur gel d'agarose d'un extrait cellulaire radioactif.

Les fractions 6-7 et 8 (1^{er} pic) ont été rassemblées et analysées par centrifugation en gradient de CsCl, en présence de références de densité non-radioactives. Les résultats sont illustrés par la figure 23B (p. 67) : un pic présentant une absorption U.V. et une radioactivité significative est observé ; il correspond à une densité de 1,714 g/cm³. Ce résultat est en accord avec ceux de EDELMAN et al. (1967) et de KUNG et al. (1972).

Les fractions 15 à 23 (2^e pic d'agarose, figure 23A ,p. 67), ont été rassemblées et l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl a donné les résultats illustrés par la figure 23C (p. 67). Dans ce cas, on n'observe pas de pic autre que ceux qui correspondent aux DNA ajoutés comme référence de densité ; d'autre part la radioactivité est distribuée sur tout le gradient.

La quantité de DNA contenue dans une cellule a été déterminée approximativement, en divisant la quantité totale de DNA retrouvée après élution de la colonne d'agarose, par la quantité de cellules à partir desquelles le DNA a été préparé. Nous obtenons pour *A. nidulans* une valeur moyenne de $0,026 \times 10^{-6}$ µg de DNA par cellule, ce qui est assez proche des $0,030 \times 10^{-6}$ µg déterminés par colorimétrie par CRAIG et al. (1969). Cependant, d'après des résultats non publiés de MANN et CARR (cités par LEACH et HERDMAN, 1973), la quantité de DNA par cellule varierait assez

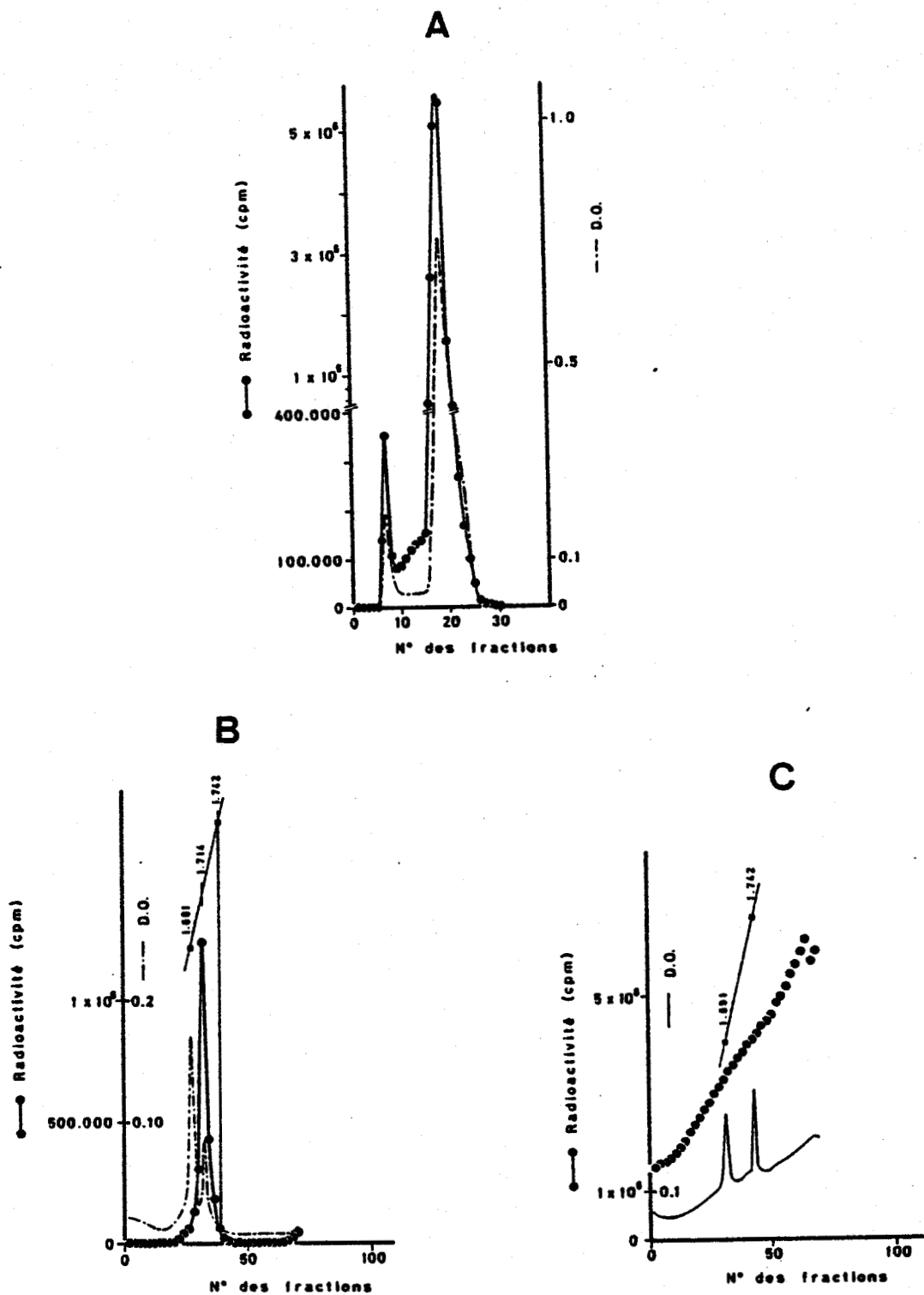


Fig. 23

Fig. 23A : filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un lysat d' *A. nidulans*.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 6 à 8 (Fig. 23B), et des fractions 15 à 23 (Fig. 23C).

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).



fortement selon le taux de croissance d'*A. nidulans*, ce qui rendrait assez difficile l'établissement d'une valeur absolue.

Le meilleur marquage radioactif du DNA a été obtenu avec l'uracile-6-³H, ce qui est en accord avec les résultats de GLASER et al. (1973). Avec ce précurseur radioactif, nous avons obtenu des activités spécifiques élevées, en moyenne 4×10^6 dpm/ μ g.

Par contre, la thymidine-5-³H et l'adénine-2-³H sont très peu incorporées dans le DNA et les activités spécifiques obtenues sont de l'ordre de 15 000 dpm/ μ g. RESTAINO et FRAMPTON (1975) ont montré l'absence de thymidine phosphorylase et de thymidine kinase chez *A. nidulans*, ce qui explique la faible incorporation de thymidine.

Lors de la purification sur gel d'agarose d'un extrait cellulaire obtenu après la lyse complète des cellules par un autre procédé (voir matériel et méthodes), nous obtenons un diagramme qui à la même allure que celui illustré par la figure 23A (p. 67). Mais l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des molécules du premier pic donne un résultat (figure 24, p. 69) différent de celui illustré par la figure 23B (p. 67). En effet, sur la figure 24 (p. 69), nous observons en absorption U.V. à 254 nm trois pics I, II et III, représentant des molécules sédimentant respectivement à des densités égales à 1,680 (I), à 1,714 (II) et à 1,730 (III) g/cm³. L'examen de la figure 24 (p. 69) montre également que les activités spécifiques de ces différentes molécules sont très différentes.

On sait que des molécules de poids moléculaire élevé (glycogène, polysaccharides, ...) sont éluées de la colonne d'agarose en même temps

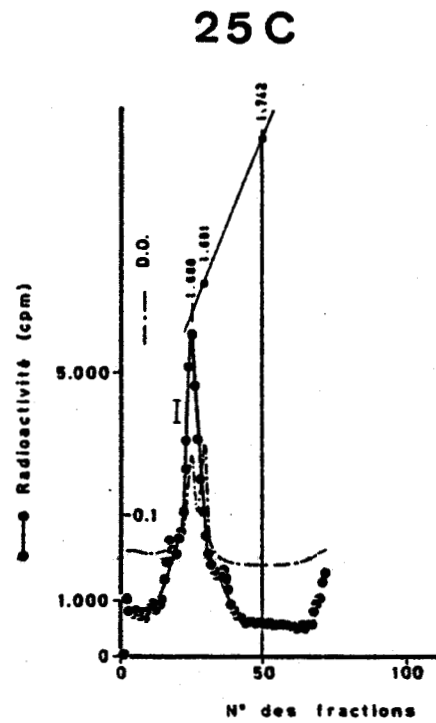
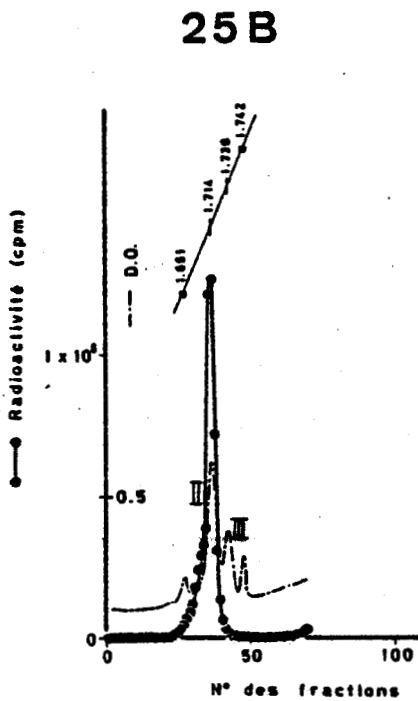
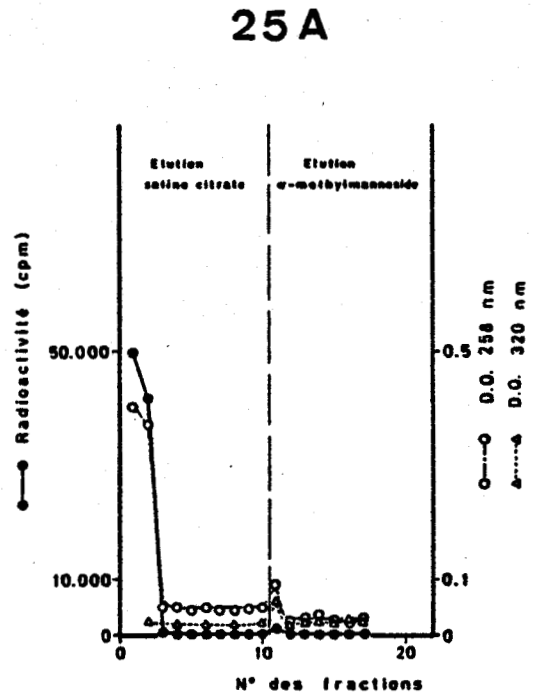
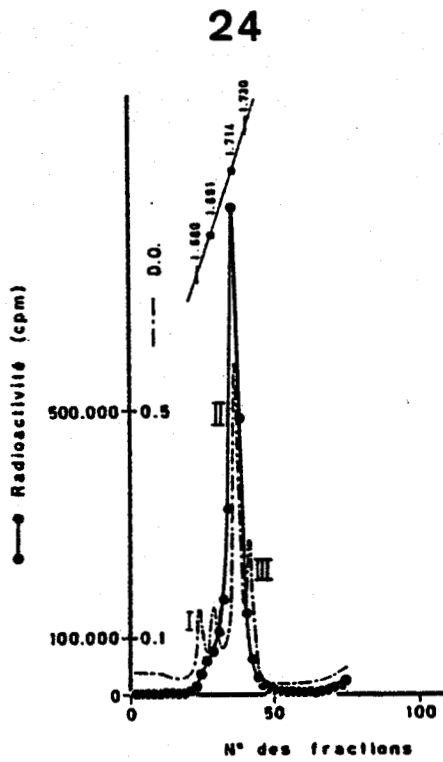


Fig. 24 et 25

Analyse du DNA d' *A. nidulans*.Fig. 24, en gradient de CsCl en présence de DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).

Fig. 25A, par chromatographie sur colonne de concanavoline A-Sepharose.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 1 et 2 (25B) et 11 (25C).

Références de densité : DNA de phage 2C (1,741 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).

que le DNA et les travaux de COUNTS et FLAMM (1966), de YOUNG et JACKSON (1966) et de PRITCHARD et al. (1971) ont montré que ces molécules ont en gradient de CsCl une densité qui est proche de celle du DNA.

Nous avons essayé d'identifier les molécules des pics I et III dans le but de savoir s'il s'agissait de DNA satellites ou de constituants cellulaires co-élués avec le DNA et qui pourraient simuler des DNA satellites.

Les essais d'identification ont été effectués à l'aide de plusieurs techniques complémentaires :

1. Chromatographie sur colonne de concanavaline A-sepharose.
2. Chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite.
3. Centrifugation en gradient de CsCl à pH 12,0.
4. Centrifugation en gradient de CsCl à pH neutre après action de la DNase pancréatique.
5. Centrifugation en gradient de CsCl à pH neutre après action de l' α -amylase.
6. Analyse chimique.

1. Certains polysaccharides, contenant du glucose, du fructose ou du mannose comme groupe terminal, peuvent être séparés du DNA par chromatographie sur colonne de concanavaline A-sepharose 4 B (EDELMAN, 1975).

Le premier pic obtenu lors de la purification de l'extrait cellulaire par filtration sur gel d'agarose (figure 23A, p. 67) a été chromatographié sur une colonne de concanavaline A-sepharose 4 B. Les résultats sont illustrés par la figure 25A (p. 69) ; on peut voir que les deux premières fractions, désorbées avec la solution de SSC normal,

contiennent la plus grande partie du matériel aussi bien en absorption U.V. qu'en radioactivité.

Lors de l'élution avec la solution de α -méthylmannoside, seule la première fraction contient du matériel, absorbant dans l'U.V. à 258 nm ou 320 nm.

L'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du matériel désorbé par le SSC normal est illustrée par la figure 25B (p. 69). On observe en absorption U.V. deux pics correspondant aux densités 1,714 et 1,730 g/cm³ respectivement.

Sur la figure 25C (p. 69) sont illustrés les résultats de l'analyse en gradient de CsCl du matériel désorbé de la colonne par l' α -méthylmannoside. On observe un seul pic en dehors de ceux correspondant aux DNA ajoutés comme référence de densité. Les résultats suggèrent qu'il s'agit dans ce cas de polysaccharide et non de DNA. La figure 25C (p. 69) montre que ces molécules du pic I sont légèrement radioactives ; DOBSON et COOPER (1971), utilisant la thymidine-2-¹⁴C, ont observé une incorporation de radioactivité dans le glycogène des foies de souris. Dans notre cas, il est aussi permis de croire que certains produits de dégradation du précurseur radioactif sont utilisés pour la synthèse des polysaccharides.

2. La filtration sur hydroxylapatite suivant la technique de BERNARDI (1965), ne permet pas de séparer le composé du pic III du DNA.

3. Lors de la centrifugation en gradient de CsCl à pH 12,0, on observe une importante augmentation (62 mg/cm³) de la densité des DNA. Cette

augmentation est due à la dénaturation par rupture des liaisons hydrogènes et à la saturation de groupements de certaines bases par des ions césium.

Après centrifugation à pH 12,0, un seul pic est observé (figure 26A p. 73) correspondant à des molécules sédimentant à une densité égale à $1,774 \text{ g/cm}^3$. Cette valeur de densité est très proche de celle qui est attendue lorsqu'on sédimente en gradient de CsCl à pH 12,0 des molécules de DNA qui ont, en gradient de CsCl à pH neutre, une densité égale à $1,714 \text{ g/cm}^3$.

Ces résultats permettent de dire que les molécules correspondant aux pics I et III ne se comportent pas en gradient de CsCl à pH 12,0, comme des molécules de DNA.

4. L'action de la DNase sur les molécules (I, II et III), éluées au volume mort de la colonne d'agarose, est étrange. En effet, au vu des résultats précédents, nous nous attendions à ce que seules les molécules correspondant au pic II soient sensibles à l'action de la DNase. Mais comme le montrent les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl après action de la DNase (figure 26B , p. 73), un seul pic est observé en absorption à 254 nm, correspondant aux molécules dont la densité est égale à $1,680 \text{ g/cm}^3$.

L'action de la DNase sur les molécules III (de densité $1,730 \text{ g/cm}^3$) isolées et purifiées se fait sans augmentation d'absorption U.V., c'est-à-dire, sans effet hyperchrome, ce qui suggère la nature non-acide désoxyribonucléique de ces molécules.

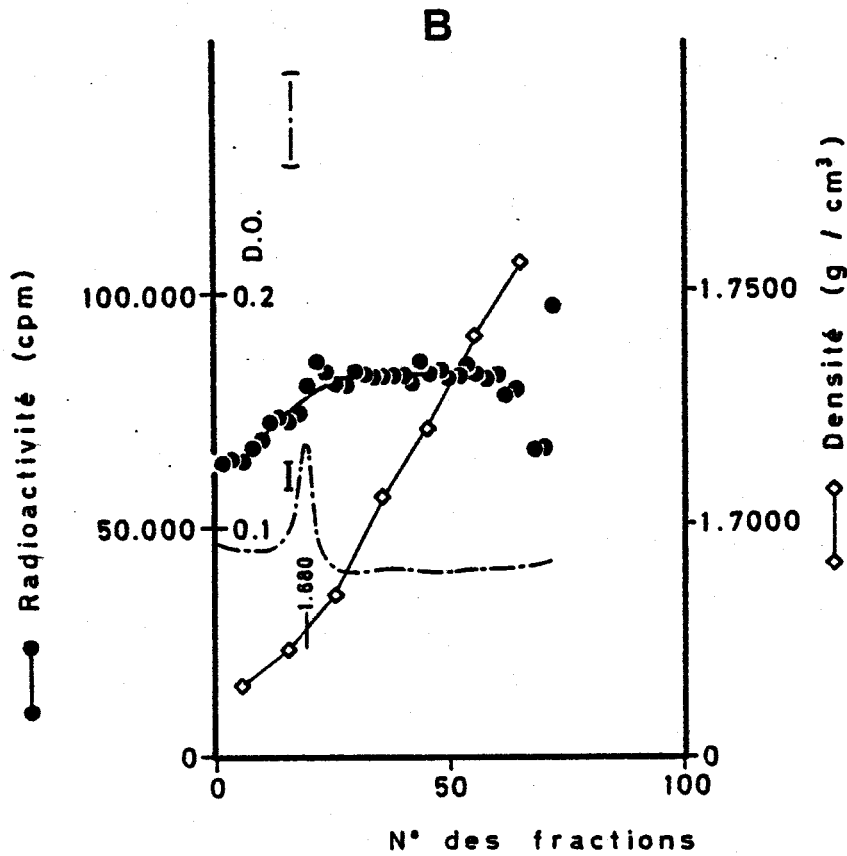
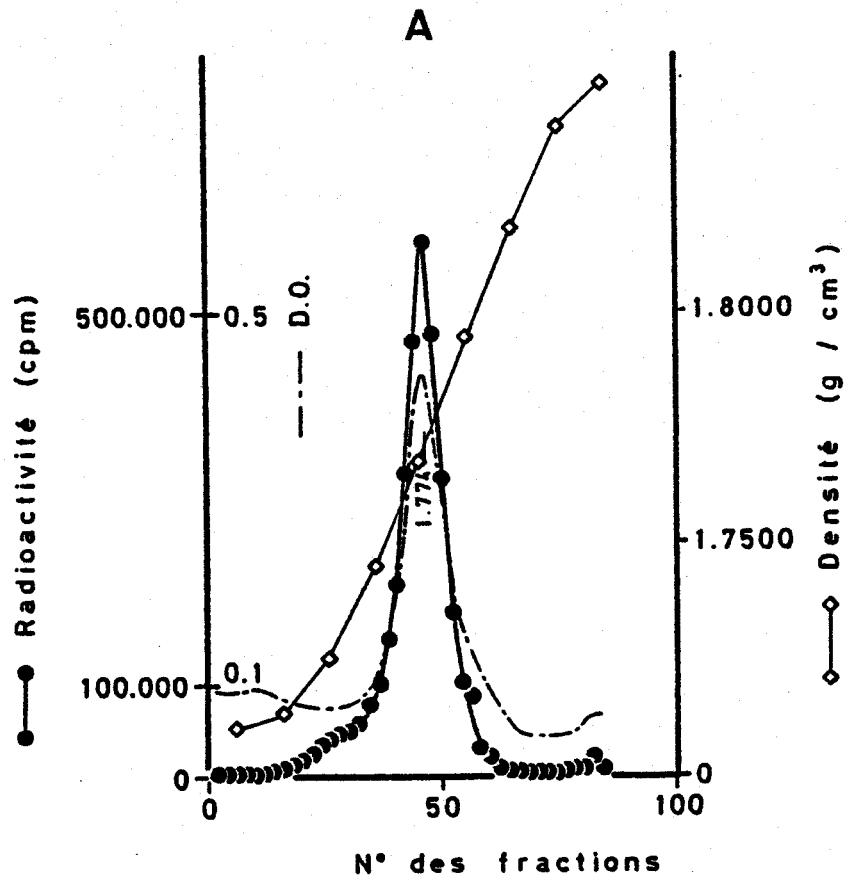


Fig. 26

Analyse en gradient de CsCl du DNA d' *A. nidulans*.

A : à pH 12,0

B : après digestion par la DNase.

Le gradient est caractérisé par la détermination de l'indice de réfraction de certaines fractions.



5. Nous avons également étudié l'action de l' α -amylase sur le mélange des molécules des pics II et III, de densités respectives 1,714 et 1,730 g/cm³. La figure 27A (p. 75) illustre l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du mélange témoin, avant l'action de l' α -amylase et la figure 27B (p. 75) illustre celle du mélange après action de l' α -amylase à 40 °C pendant 30 min. Nous voyons que seules les molécules du DNA d'*A. nidulans* (pic II), de densité égale à 1,714 g/cm³, résistent à cette action.

Les résultats obtenus avec les différentes méthodes d'analyse montrent clairement qu'il n'existe chez l'algue unicellulaire *Anacystis nidulans* qu'une espèce de DNA dont la densité est égale à 1,714 g/cm³.

Lorsque la lyse des cellules est obtenue par l'action de certains enzymes, on observe par analyse en gradient de CsCl, à côté d'un pic principal correspondant au DNA, des pics parasites. Ces pics parasites contaminant qui simulent parfaitement des DNA satellites (identifiés chez beaucoup d'organismes actuellement) sont constitués chez *A. nidulans* de substances à haut poids moléculaire qui accompagnent le DNA lors de la purification sur gel d'agarose et qui ont en gradient de densité de CsCl une densité proche de celle du DNA. Ces substances ont pu être identifiées comme étant de type polysaccharide.

6. Nous avons essayé d'analyser complètement les molécules du pic III, de densité égale à 1,730 g/cm³, que nous pouvions isoler en grande quantité.

Il est possible d'isoler ces molécules par centrifugation préparative selon FLAMM et al. (1969). Les résultats, illustrés par la figure 28

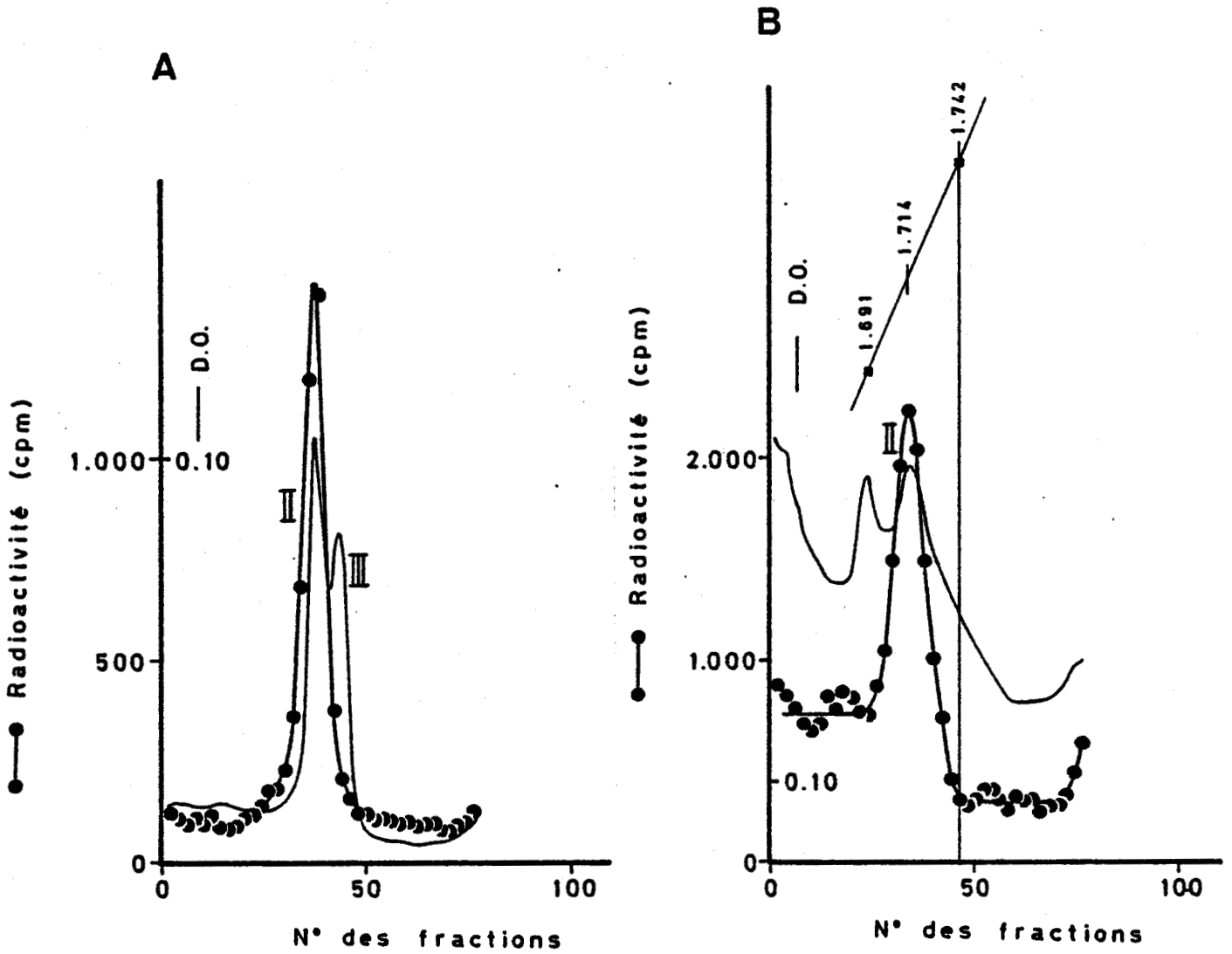


Fig. 27

Analyse en gradient de CsCl du DNA d' *A. nidulans* avant (A) et après (B) digestion par l' α -amylase.
 Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



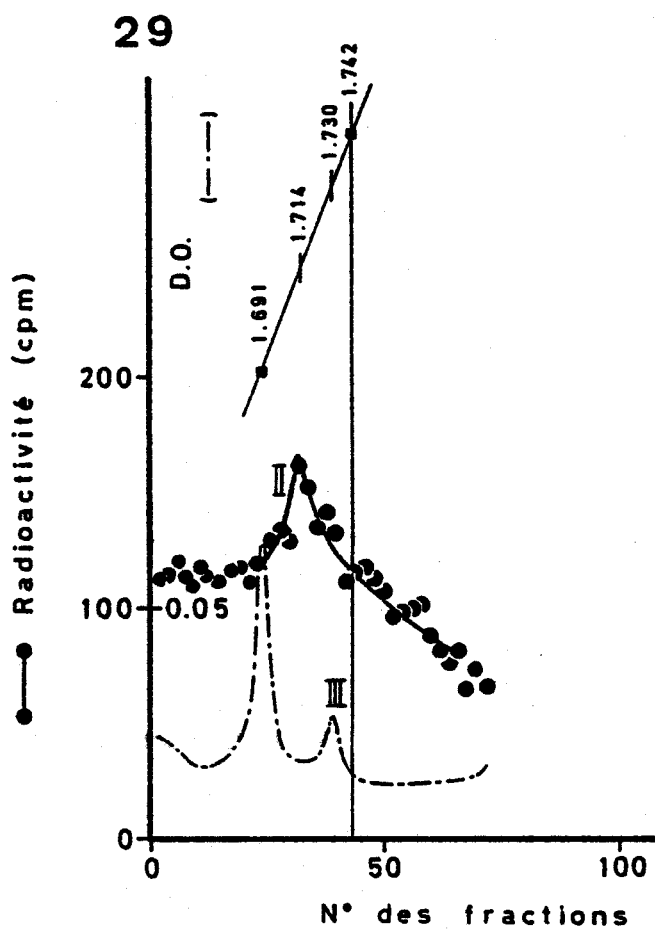
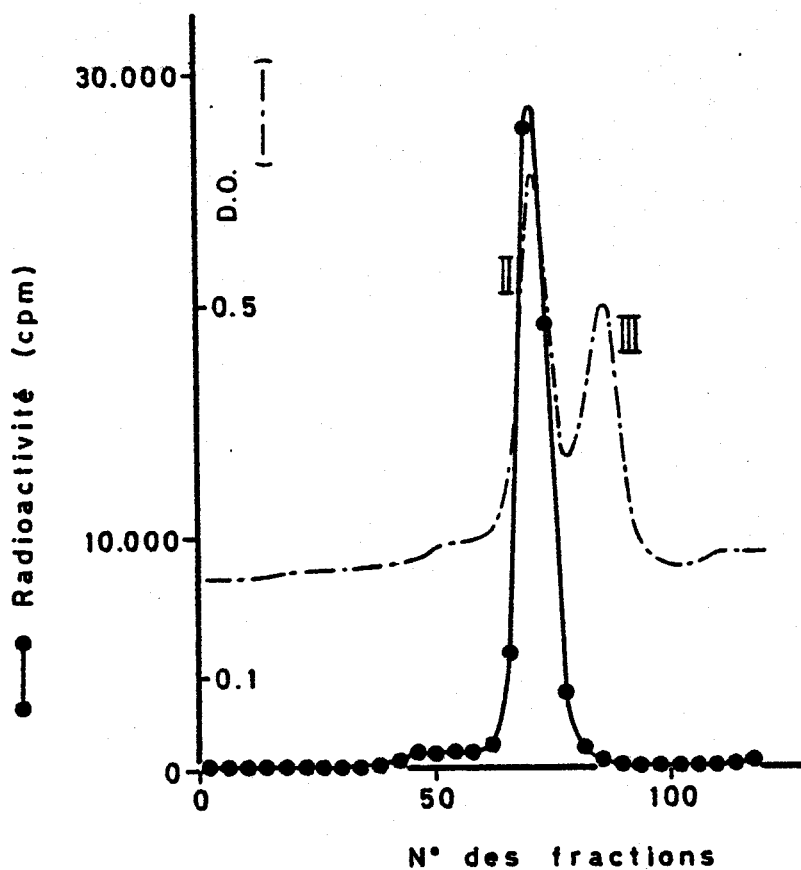


Fig. 28 et 29

Fig. 28 : centrifugation préparative du DNA d' *A. nidulans* (FLAMM et al., 1969).

Fig. 29 : analyse en gradient de CsCl des fractions correspondantes au pic III (Fig. 28).

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



(p. 76), montrent que les espèces moléculaires sont bien séparées après centrifugation à l'équilibre. Le chevauchement des pics est faible ainsi que le montre la figure 29 (p. 76) qui illustre les résultats obtenus lorsqu'on recentrifuge les fractions correspondant au pic III. En absorption U.V. à 258 nm, on n'observe pas de pic à la position correspondant à la densité de 1,714 g/cm³. A cette position, on observe seulement un petit pic en radioactivité, ce qui, vu l'activité spécifique élevée du DNA, ne correspond qu'à une très faible quantité de DNA.

L'analyse par chromatographie du polysaccharide, hydrolysé par HCl, montre que 91 % des monosaccharides trouvés sont de type glucose.

Le polysaccharide a été perméthylé et les éthers méthyliques ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Carbowax 6000 à 3 %, après une réaction de méthanolyse. Au point de vue analytique, les diagrammes obtenus à partir du glycogène (utilisé comme référence) et du polysaccharide sont superposables, c'est-à-dire, que nous trouvons des liaisons 1-4 avec des ramifications 1-6.

Au point de vue quantitatif, par analyse des surfaces des pics, il semble que le polysaccharide extrait d'*A. nidulans* soit moins ramifié que le glycogène.

B. Euglena gracilis

Les cellules d'*E. gracilis* sont sensibles au SDS (MARMUR, 1961) et un contrôle effectué par examen au microscope optique a montré qu'après addition du détergent, il n'y avait plus de cellules entières dans le milieu.

La figure 30A (p. 79) illustre les résultats de la chromatographie sur gel d'agarose d'un extrait cellulaire radioactif.

L'analyse des fractions 6-7, par centrifugation en gradient de CsCl montre (figure 30B ,p. 79) un pic en radioactivité et en absorption U.V. situé à une densité égale à $1,707 \text{ g/cm}^3$, et un épaulement situé approximativement à une densité égale à $1,684 \text{ g/cm}^3$. Ces résultats sont en accord avec ceux de BRAWERMAN et EISENSTADT (1964) et de EDELMAN et al. (1964).

L'analyse des fractions 16-19, correspondant au 2^{ème} pic d'agarose (figure 30A , p. 79), par centrifugation en gradient de CsCl, montre qu'il n'y a aucune molécule qui sédimente dans le gradient (figure 30C , p. 79).

La quantité de DNA par cellule, estimée à $2,1 \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{g}$, a une valeur proche de celle ($2,3 \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{g}$) trouvée par SMILLIE et KROTKOV (1960) et par EDMUNDS (1964).

L'uracile-6-³H et l'adenine-2-³H sont les mieux incorporés dans le DNA d'*E. gracilis* et nous obtenons des activités spécifiques se situant aux environs de 80 000 dpm/ μg . Par contre, la radioactivité spécifique du DNA ³H est faible, de l'ordre de 7000 dpm/ μg , lorsque la thymidine-6-³H est utilisée comme précurseur radioactif.

C. *Ochromonas danica*

Les cellules d'*O. danica* sont sensibles à l'action du SDS. La lyse des cellules est immédiatement suivie d'une précipitation des acides

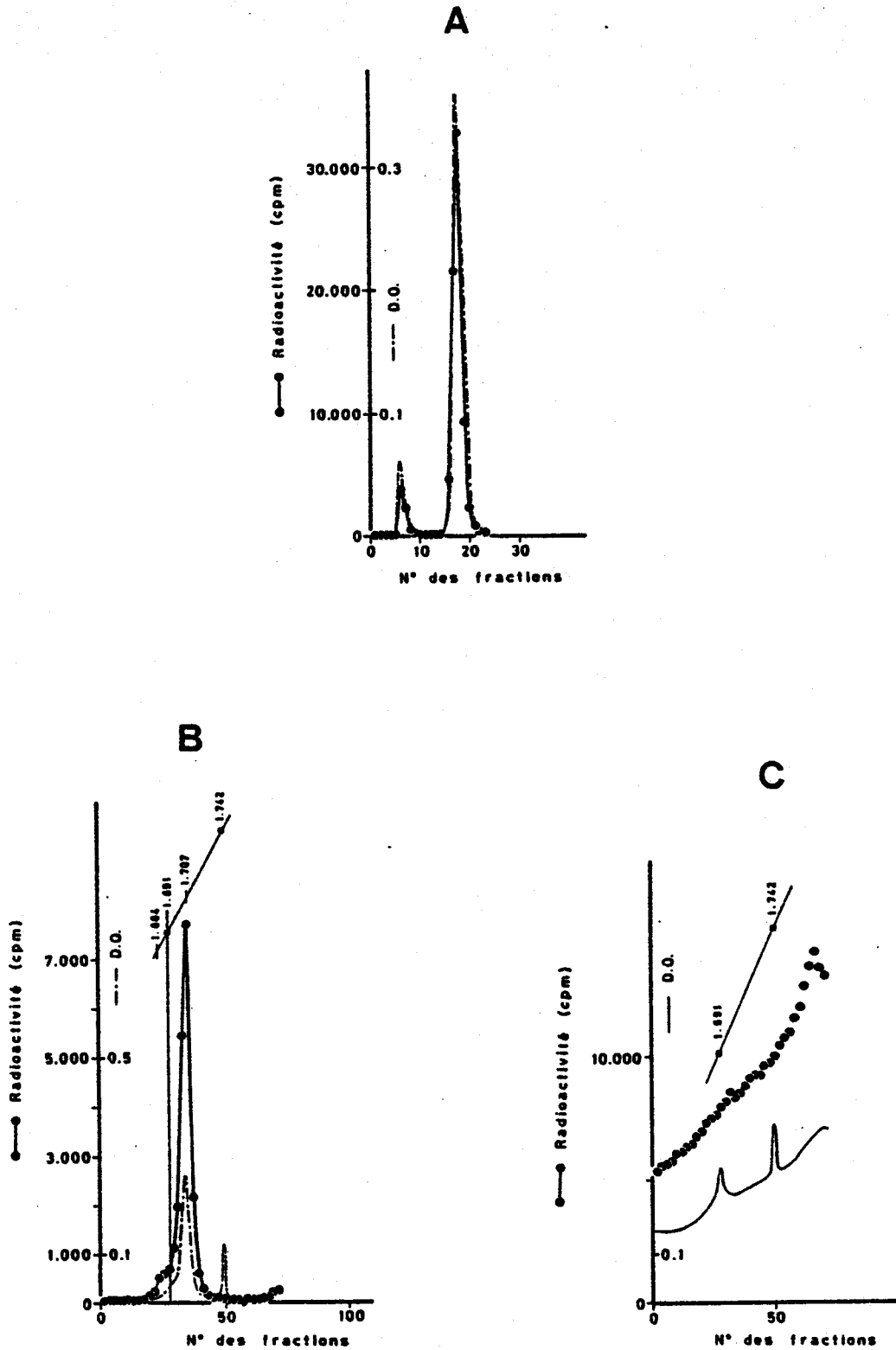


Fig. 30

Fig. 30A : filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un lysat d' *E. gracilis*.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 6 et 7 (Fig. 30B), et des fractions 16 à 19 (Fig. 30C).

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).



nucléiques par l'alcool dans le but de dénaturer et d'inactiver les nucléases relâchées dans le milieu et qui sont particulièrement actives.

La figure 31A (p. 81) illustre les résultats de la filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un extrait radioactif partiellement purifié.

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 5-7, sont illustrés par la figure 31B (p. 81). On observe en radioactivité un pic principal correspondant à une densité de $1,704 \text{ g/cm}^3$ et un pic satellite correspondant à une densité de $1,690 \text{ g/cm}^3$. Une analyse par centrifugation analytique a confirmé ces résultats (figure 31D , p. 81). La planimétrie montre que le DNA satellite représente environ 15 % du DNA cellulaire total. Mais si nous calculons le pourcentage à partir de la figure 31B (p. 81), nous arrivons à une valeur de 35 % environ, ce qui indique que les deux espèces moléculaires n'ont pas les mêmes activités spécifiques.

Les fractions 17-22, correspondant au second pic d'agarose (figure 31 A, p. 81), sont composées de molécules ne sédimentant pas dans le gradient de densité (figure 31C , p. 81).

La quantité de DNA par cellule est estimée à $0,20 \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{g}$ environ.

Nous obtenons des activités spécifiques de DNA élevées par incorporation de thymidine-6- ^3H ou d'adénine-2- ^3H , variant de 1 à $1,5 \times 10^6$ dpm/ μg . L'uracile-6- ^3H est assez bien incorporé également, puisque nous obtenons avec ce précurseur des activités spécifiques qui sont de l'ordre de 5×10^5 dpm/ μg .

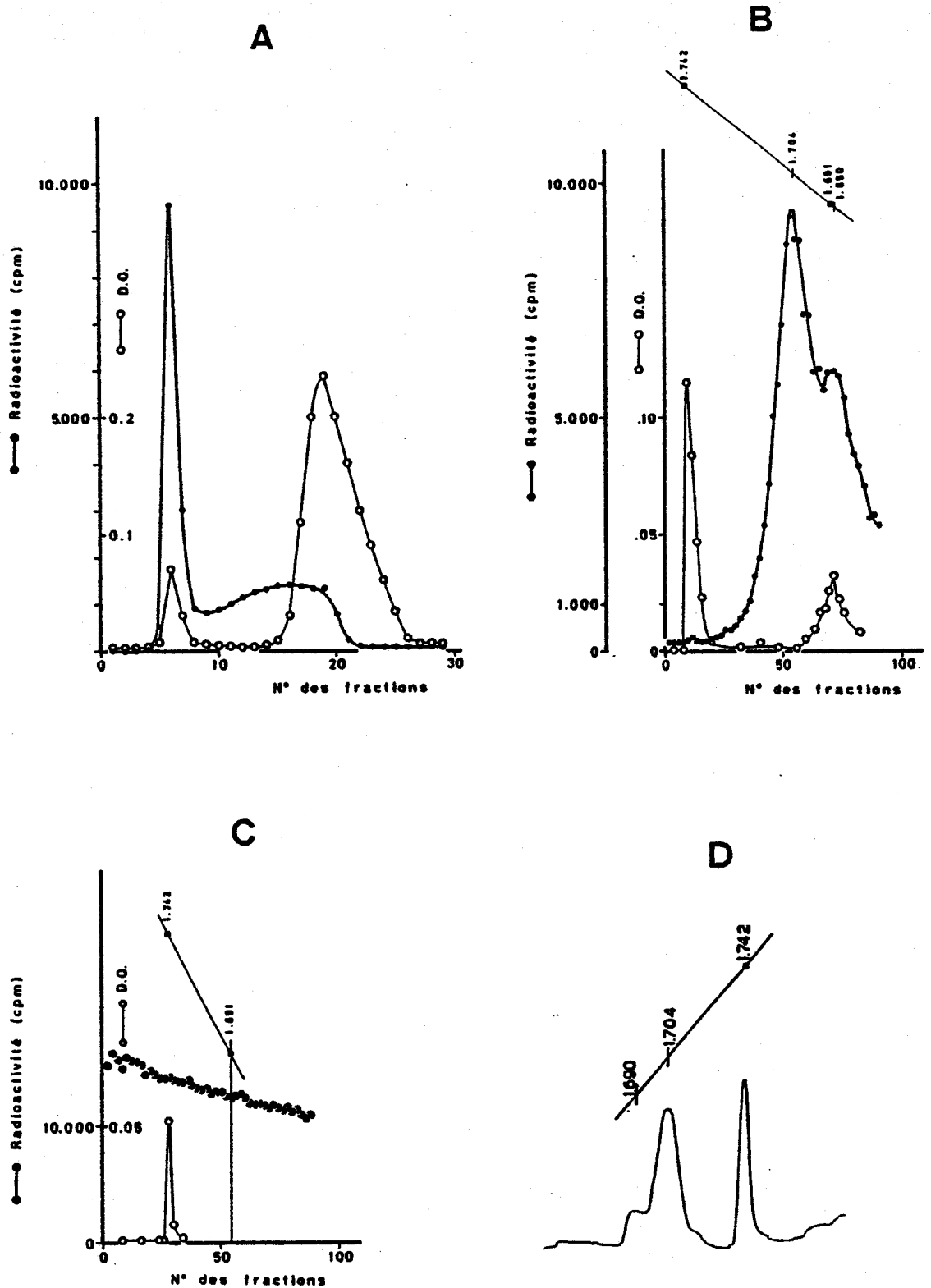


Fig. 31

Fig. 31A : filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un lysat de *O. danica*.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 5 à 7 (Fig. 31B), et des fractions 17 à 22 (Fig. 31C).

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).

Fig. 31D : ultra centrifugation analytique en gradient de CsCl du DNA purifié d' *O. danica* en présence de DNA de phage 2C.

D. Polyedriella helvetica

La figure 32A (p. 83) illustre les résultats de la chromatographie sur gel d'agarose d'un extrait cellulaire radioactif partiellement purifié.

Les fractions 6-8, correspondant au 1^{er} pic d'agarose, ont été rassemblées et analysées par centrifugation en gradient de CsCl. Les résultats sont illustrés dans la figure 32B (p. 83) et on peut voir sur le graphique que la radioactivité après centrifugation à l'équilibre est distribuée en deux pics : l'un, principal, correspondant à une densité de 1,712 g/cm³ et le second à une densité de 1,703 g/cm³.

Le diagramme densitométrique obtenu après centrifugation analytique montre le même résultat (figure 32D, p. 83) : un pic principal de densité égale à 1,712 g/cm³ et un petit pic satellite correspondant à une densité approximative de 1,703 g/cm³.

Le pic satellite, par estimation à partir du tracé de la densité optique, ne représente que 3 % du DNA total, tandis que si l'estimation est faite à partir des courbes de distribution de la radioactivité (figure 32B, p. 83), le pic satellite représente à peu près 30 % du DNA total. Les deux espèces de molécules ont donc des activités spécifiques très différentes ce qui laisse supposer que leurs vitesses de synthèse sont aussi très différentes.

L'analyse des fractions 19-22 du second pic d'agarose (figure 32A, p. 83) montre que le matériel, contenu dans ces fractions, ne sédimente pas en gradient de densité (figure 32C, p. 83).

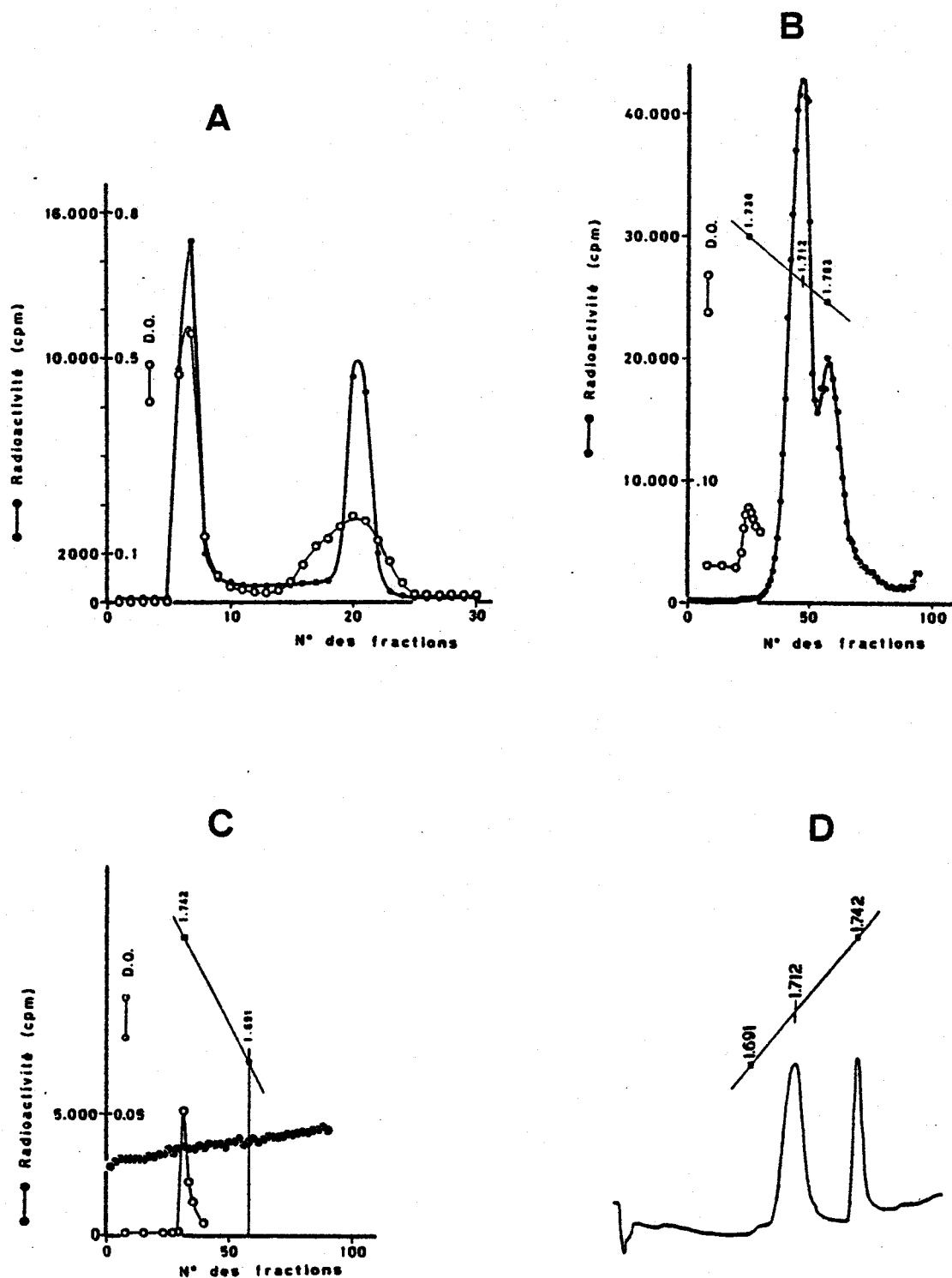


Fig. 32

Fig. 31A : filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un lysat de *P. helvetica*

Analyse en gradient de CsCl des fractions 6 à 8 (fig. 32B), et des fractions 19 à 22 (fig. 32C).

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *M. lysodeikticus* ($1,730 \text{ g/cm}^3$)
DNA de *B. subtilis* ($1,703 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$)

Fig. 32D : ultra centrifugation analytique en gradient de CsCl du DNA purifié de *P. helvetica* en présence de DNA de phage 2C

La quantité de DNA par cellule est estimée à environ $0,25 \times 10^{-6}$ μg .

Les essais d'incorporation de précurseurs radioactifs montrent que c'est l'adénine-2- ^3H qui est la mieux incorporée et nous obtenons avec ce précurseur des activités spécifiques de l'ordre de $1,4 \times 10^6$ dpm/ μg . Avec l'uracile-6- ^3H , nous obtenons des activités spécifiques moins élevées égales à environ 3×10^5 dpm/ μg . L'incorporation de la thymidine-6- ^3H est très faible, les activités spécifiques du DNA étant égales à 2000 dpm/ μg .

En utilisant le procédé d'extraction avec lequel nous observions les contaminants de type polysaccharides chez *A. nidulans*, nous avons trouvé un contaminant chez *P. helvetica* sédimentant en gradient de CsCl à une densité égale à $1,728 \text{ g/cm}^3$, n'incorporant pas les précurseurs normaux des acides désoxyribonucléiques.

E. Porphyridium cruentum

Les résultats de la filtration sur gel d'agarose d'un extrait cellulaire radioactif sont illustrés par la figure 33A (p. 85).

Les fractions 8 à 11 ont été rassemblées et analysées par centrifugation en gradient de CsCl ; les résultats sont illustrés par la figure 33B (p. 85). L'absorption dans l'U.V. et la radioactivité sont distribuées en deux pics : le pic principal sédimentant à une densité égale à $1,716 \text{ g/cm}^3$, et un pic satellite sédimentant à une densité égale à $1,694 \text{ g/cm}^3$ (figure 33B , p. 85). Afin de pouvoir estimer plus aisément par planimétrie le pourcentage représenté par le DNA satellite, nous avons centrifugé le DNA dans un rotor à angle fixe qui permet une meilleure séparation des espèces moléculaires (figure 33D, p. 85). Le DNA satellite

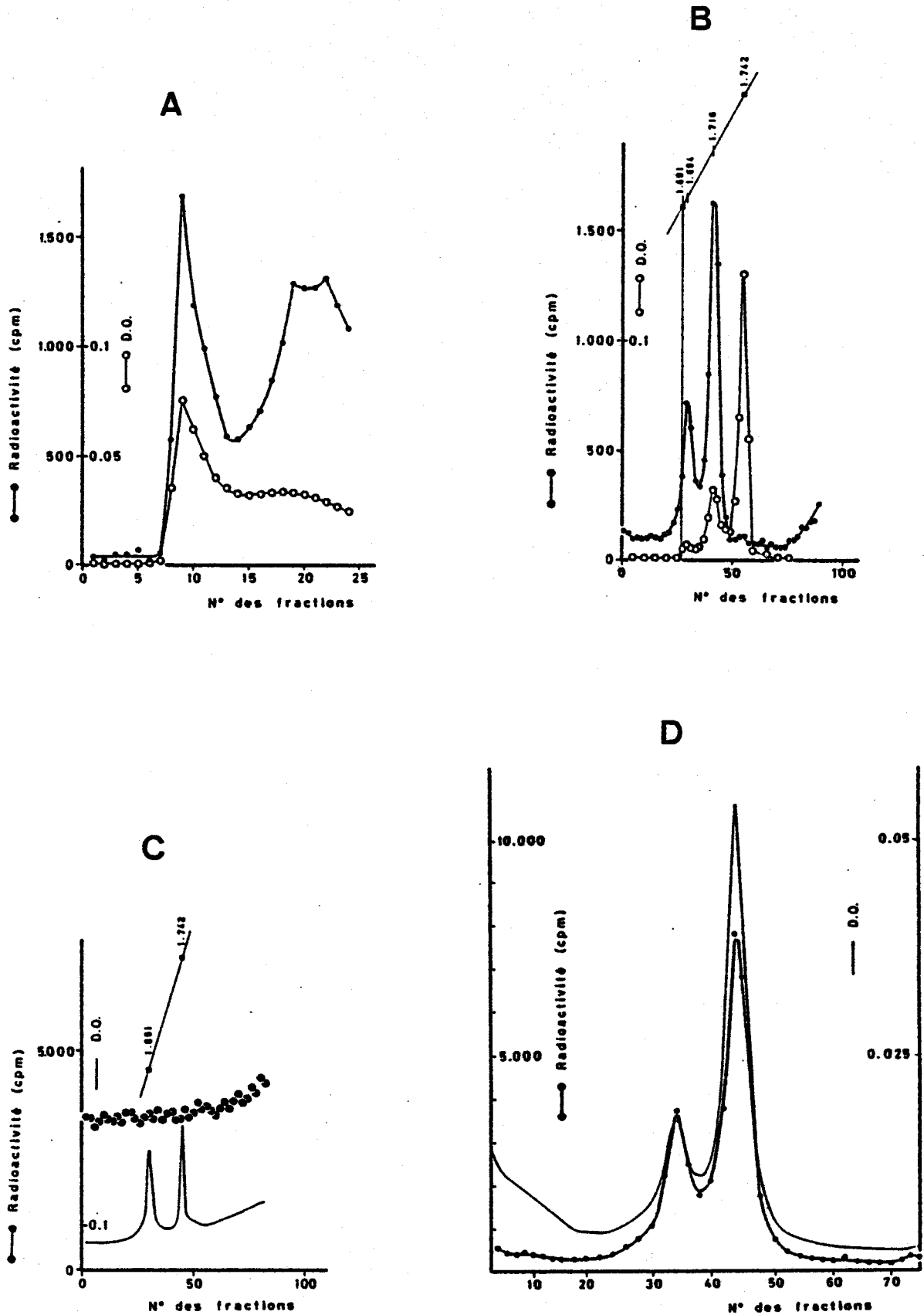


Fig. 33

Fig. 33A : filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un lysat de *P. cruentum*.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 8 à 11 (fig. 33B) et des fractions 19 à 22 (fig. 33C).

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).

Fig. 33D : centrifugation en gradient de CsCl du DNA purifié de *P. cruentum*

représente environ 25 % du DNA total. L'analyse montre également que les deux espèces moléculaires de DNA ont à peu près la même radioactivité spécifique.

L'analyse du second pic d'agarose, fractions 19- 22 (figure 33A , p. 85), dont les résultats sont illustrés par la figure 33C (p. 85), montre que ces fractions ne contiennent pas de matériel qui sédimente en gradient de CsCl.

La quantité de DNA par cellule a été estimée à $0,1 \times 10^{-6}$ μg .

Lors des essais d'incorporation de précurseurs radioactifs, l'activité spécifique la plus élevée - 2×10^5 dpm/ μg a été obtenue en utilisant l'adénine-2- ^3H . Avec l'uracile-6- ^3H ou la thymidine-6- ^3H , les activités spécifiques obtenues sont beaucoup plus faibles, en moyenne de 10 000 dpm/ μg .

F. Scenedesmus obliquus

Les résultats de la chromatographie sur gel d'agarose d'un extrait cellulaire radioactif partiellement purifié sont illustrés par la figure 34A (p. 87).

Les résultats de l'analyse des fractions 6 à 8 (1^{er} pic) par centrifugation en gradient de CsCl, illustrés par la figure 34B (p. 87), montrent l'existence d'un seul pic et en absorption U.V. et en radioactivité, correspondant à des molécules de densité égale à $1,712 \text{ g/cm}^3$.

SSYMANK et al. (1976) ont trouvé, en analysant le DNA extrait d'une souche de *S. obliquus* D3 provenant de la collection d'algues de

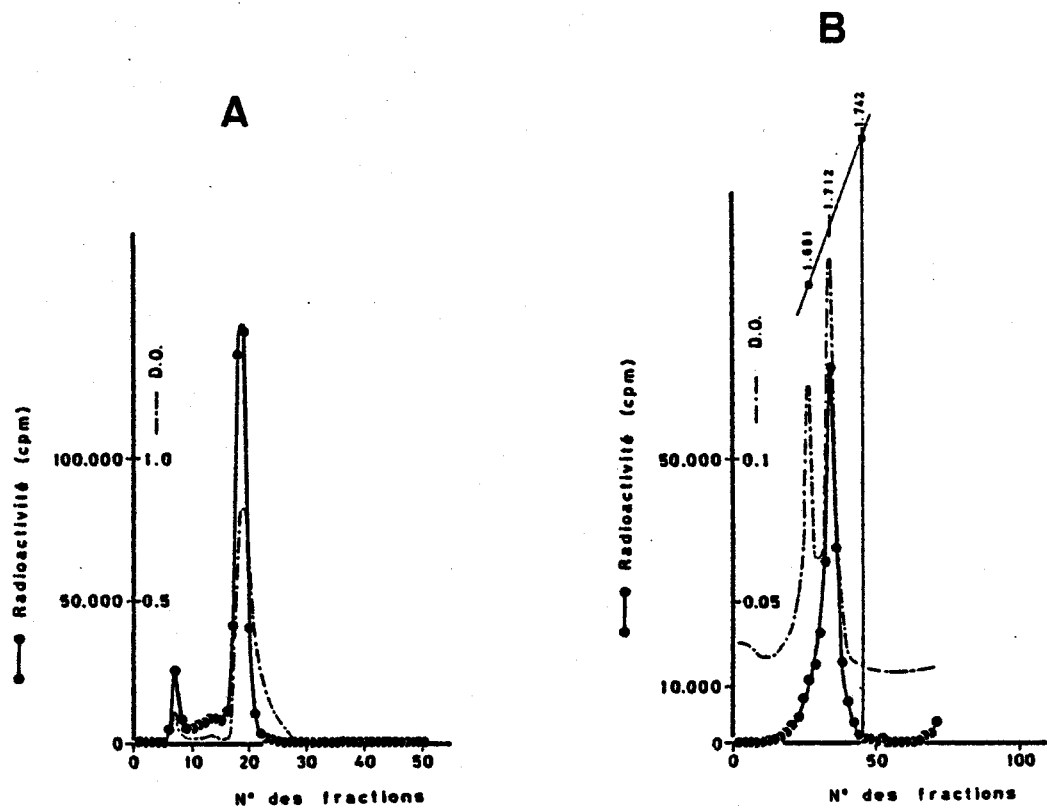


Fig. 34

Fig. 34A : filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un lysat de *S. obliquus*.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 6 à 8 (fig. 34B).

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



Göttingen, outre le pic correspondant à une densité de $1,71 \text{ g/cm}^3$, un net épaulement correspondant à une densité de $1,69 \text{ g/cm}^3$. Nous avons à plusieurs reprises centrifugé du DNA extrait de *S. obliquus* (No. 276/3a, CCAP, Cambridge, Angleterre) dans un rotor à angle fixe et nous n'avons jamais observé un tel épaulement. Nous avons cependant noté un certain étirement, en absorption U.V. et en radioactivité, vers les densités moins élevées. Nous avons rassemblé les fractions correspondant à cette région ; la centrifugation de ces fractions en gradient de CsCl a montré que les molécules sédimentaient à une position correspondant à la densité de $1,712 \text{ g/cm}^3$ seule.

La quantité de DNA par cellule est estimée à environ $0,4 \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{g}$.

Les essais d'incorporation de précurseurs radioactifs ont montré que l'activité spécifique la plus élevée était obtenue avec l'adénine-2- ^3H , environ $4 \times 10^5 \text{ dpm}/\mu\text{g}$; avec l'uracile-6- ^3H , nous obtenons des activités spécifiques un peu plus faibles, égales à $1,5 \times 10^5 \text{ dpm}/\mu\text{g}$. La thymidine-6- ^3H est beaucoup plus faiblement incorporée puisque nous obtenons des activités spécifiques de l'ordre de 15 000 dpm/ μg .

G. CONCLUSIONS

1. En vue d'une extraction quantitative, les méthodes de lyse ont été adaptées en fonction des particularités de chaque algue. Les extraits cellulaires obtenus ont été purifiés par filtration sur gel d'agarose. Cette méthode avait déjà été utilisée par d'autres auteurs pour des matériaux différents (LOEB et CHAUVEAU, 1969 ; KADO et YIEN, 1971 ; HEYN et al., 1974 ; P. CHARLES, 1975), ainsi que pour une algue unicellulaire (LURQUIN et al., 1975).
2. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VIII (p. 90). Nous voyons que la densité des différents DNA varie entre 1,716 g/cm³ (*P. cruentum*) et 1,704 g/cm³ (*O. danica*), densité proche de celle du DNA des organismes supérieurs.
3. Nous avons observé des DNA satellites pour 4 espèces (*E. gracilis*, *O. danica*, *P. helvetica* et *P. cruentum*).
4. En général, la thymidine-6-³H est faiblement incorporée dans le DNA, sauf chez *O. danica*. Cette faible incorporation est probablement liée à l'absence de thymidine kinase comme cela a été montré chez *A. nidulans* par RESTAINO et FRAMPTON (1975). L'adénine-2-³H ou l'uracile-6-³H sont mieux incorporés, et il est possible d'obtenir des DNA dont les radio-activités spécifiques varient de 1×10^5 à 4×10^6 dpm/ μ g.
5. Les quantités de DNA par cellule, estimées selon notre méthode, sont en accord avec celles citées dans la littérature et obtenues par d'autres méthodes.

TABLEAU VIII

Méthode d'isolement, densité en gradient de CsCl, marquage radioactif et contenu par cellule des DNA de 6 algues unicellulaires

Algue	Traitement spécial	SDS Pronase RNase précipitation par l'alcool	Densité en CsCl (g/cm ³) principal satellite	G + Ca (mole %)	Incorporation de précurseurs radioactifs			Contenu en DNA par cellule (µg × 10 ⁶)
					uracile	adénine	thymidine	
<i>A. nidulans</i>	broyage ^b	+	1,714	55,1	++++	+	+	0,026
<i>E. gracilis</i>	-	+	1,708	48,9	++	++	+	2,10
<i>O. danica</i>	-	+	1,704	24,5 44,9	+++	++++	++++	0,20
<i>P. helvetica</i>	broyage ^b	+	1,712	30,6 53,1	+++	++++	+	0,25
<i>P. cruentum</i>	cellulysine	+	1,716	43,9 57,1	+	+	+++	0,10
<i>S. obliquus</i>	broyage ^b	+	1,712	34,7 53,1	++	+++	+	0,40

a calculé à partir de la relation de SCHILDKRAUT et al. (1962)

b précédé par agitation avec acétone, alcool, éther.



Remarquons que le contenu en DNA des algues eucaryotes est de 10 à 20 fois, même 100 fois (*E. gracilis*) plus élevé que le contenu en DNA de l'algue procaryote *A. nidulans*.

6. Par une certaine méthode de lyse plus drastique des cellules d'*A. nidulans*, nous avons mis en évidence deux espèces moléculaires de polysaccharides qui, sédimentant en gradient de CsCl dans la région des DNA, peuvent simuler des DNA satellites.

Nous avons pu montrer que l'une de ces deux espèces moléculaires était composée presque exclusivement de glucose et que sa structure était très proche de celle du glycogène.

Ces résultats ont été publiés dans Plant Science Letters, 8 (1977), 35-44.

III. Prise et sort de DNA radioactif bactérien chez les algues

A. *Anacystis nidulans*

1. CHOIX D'UN MILIEU D'INCUBATION

Lors des expériences de transformation homologue d'*A. nidulans* par transfert de DNA exogène, les auteurs ont utilisé comme milieu d'incubation, soit le milieu de culture (HERDMAN, 1973a, 1973b ; ORKWISZEWSKI et KANEY, 1974), soit du tampon phosphate pH 7,5 (SHESTAKOV et KHYEN, 1970).

Nous avons comparé les résultats de l'absorption de DNA bactérien par les cellules d'*A. nidulans* en suspension soit dans du milieu de culture (pH 8,0), soit dans du tampon phosphate (pH 8,0) contenant du DNA tritié de *S. flava* (radioactivité spécifique : 10^6 dpm/ μg , concentration : 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les cellules ont été incubées pendant 2 heures à 32 °C avec agitation modérée et sous lumière (2500 lux). La radioactivité acido-précipitable, égale à 2 020 200 cpm lorsque l'incubation a lieu dans le tampon phosphate, est égale à 237 900 cpm lorsqu'elle a lieu dans le milieu de culture. Dans les expériences ultérieures, les incubations avec du DNA exogène homologue ou hétérologue ont toujours été faites dans du tampon phosphate pH 8,0.

2. PRISE DE DNA BACTERIEN EN FONCTION DE LA CROISSANCE

SHESTAKOV et KHYEN (1970), étudiant le phénomène de transformation homologue de mutants d'*A. nidulans*, ont observé que le maximum de transformation s'obtenait lorsque la concentration cellulaire de la culture était égale à $4 - 6 \times 10^7$ cellules par ml. ORKWISZEWSKI et KANEY (1974)

ont mis en évidence la présence d'un pic de transformation, comparable à la phase de compétence décrite chez certaines bactéries transformables, lorsque la concentration cellulaire est égale à $4 - 8 \times 10^7$ cellules par ml.

Nous avons étudié la prise de DNA radioactif de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (radioactivité spécifique : $1,5 \times 10^6$ dpm/ μ g), en différents points de la courbe de croissance. Des aliquotes ont été prélevées à différents moments après le début de la culture, les cellules ont été centrifugées, le surnageant a été écarté et remplacé par un volume de tampon phosphate (pH 8,0) contenant le DNA radioactif bactérien à la concentration de 30 μ g/ml.

L'incubation a été poursuivie pendant 1 heure à 32 °C sous 2500 lux avec une agitation modérée. Le matériel a ensuite été traité comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes (XII).

Les résultats, rassemblés dans le tableau IX (p.94), sont illustrés par la figure 35 (p.95).

En portant en ordonnée les valeurs de la radioactivité acido-insoluble exprimée en cpm par unité de D.O. et en abscisse le temps écoulé depuis le début de culture exprimé en heure, on observe un pic qui se situe à un moment où la concentration cellulaire de la culture est égale à environ $5,0 \times 10^7$ cellules par ml. Ce moment préférentiel de prise de DNA bactérien exogène pourrait correspondre à la phase de compétence observée par ORKWISZEWSKI et KANEY (1974).

La figure 36A (p. 96) illustre les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du milieu contenant le DNA radioactif

TABLEAU IX

Résultats de l'étude de la prise de DNA-tritié de *M. lysodeikticus* par *A. nidulans*, en différents points de la courbe de croissance

Point	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre d'heures après le début de la culture	8	18	33	48	69	89	117	152	201
Nombre de cellules par ml $\times 10^{-7}$	1,45	1,7	5,0	7,45	16,3	21,8	47,0	47,5	42,8
Radioactivité dans le surnageant après incubation cpm totaux $\times 10^{-5}$	59,9	52,8	57,2	50,9	40,3	59,2	62,8	54,8	44,9
Radioactivité dans le surnageant après DNase cpm totaux $\times 10^{-5}$	2,3	2,5	1,9	1,8	1,6	2,0	2,2	1,4	1,6
Radioactivité acido-soluble dans les cellules cpm totaux	3914	11 720	4228	4874	3032	1604	2098	4620	7882
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules cpm totaux	2958	4816	20 044	4758	6416	13 698	13 508	25 608	29 074
Absorption à 258 nm de la fraction acido-insoluble unité d.o.	0,045	0,051	0,065	0,103	0,178	0,237	0,314	0,390	0,461
Radioactivité acido-insoluble par unité de d.o. cpm/d.o.	65 700	94 400	308 000	46 200	36 000	57 800	43 000	65 700	63 000
Radioactivité acido-insoluble par cellule cpm/cell.	0,00020	0,00028	0,00040	0,000064	0,000039	0,000063	0,000029	0,000054	0,000068



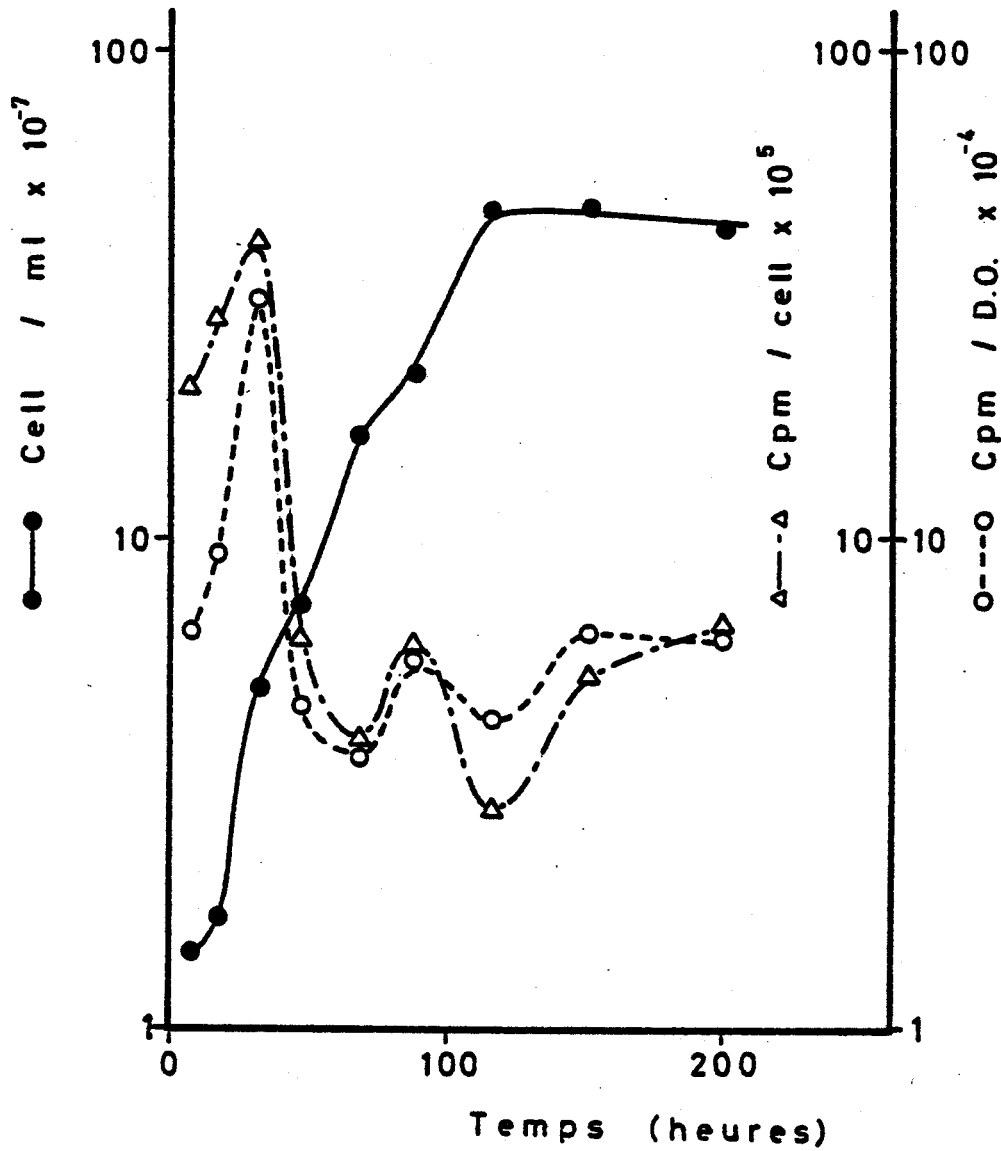


Fig. 35

Absorption de DNA ³H de *M. lysodeikticus* par les cellules d'*A. nidulans* en fonction de la croissance.



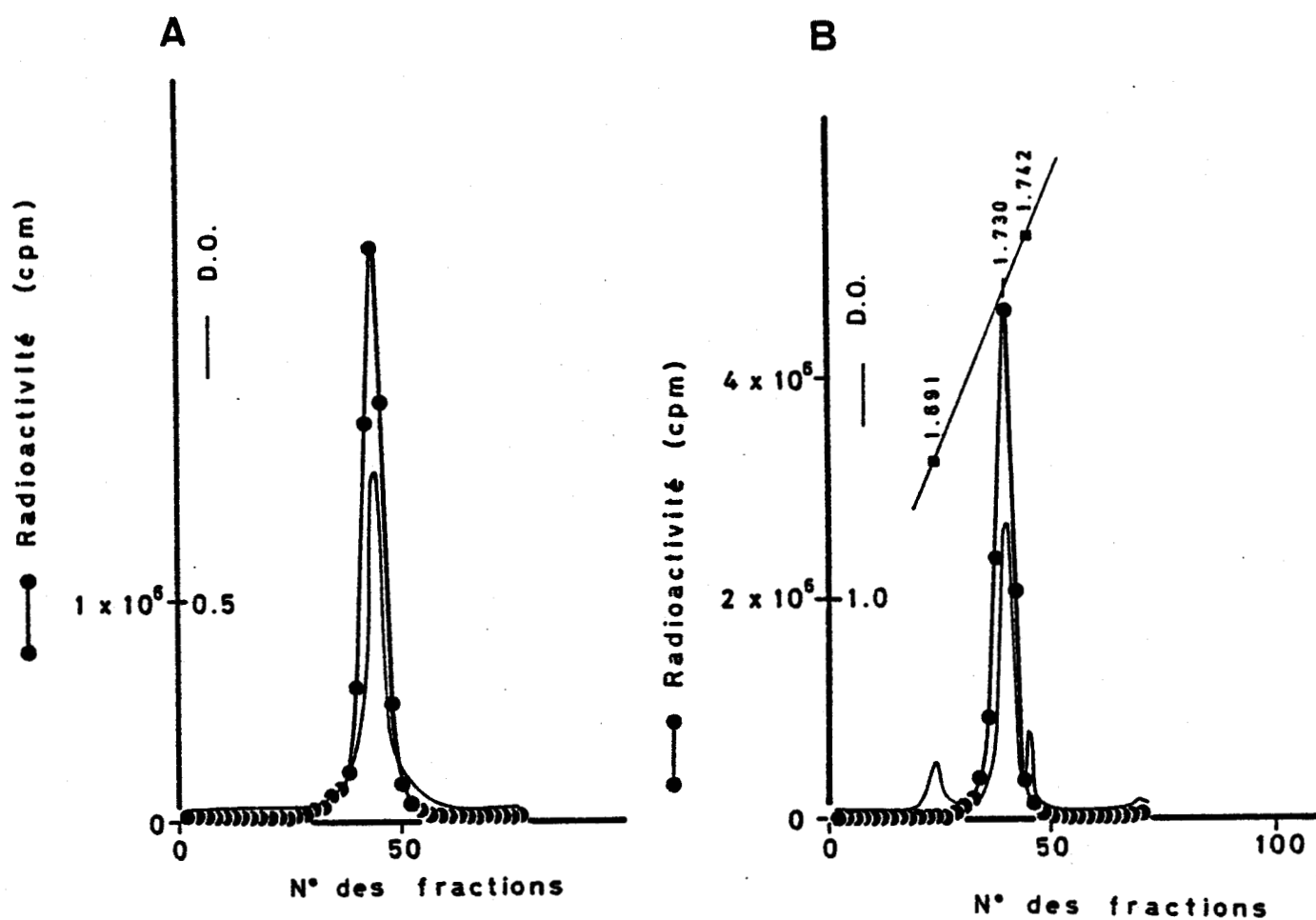


Fig. 36

Analyse en gradient de CsCl des milieux radioactifs (contenant du DNA ³H de *M. lysodeikticus*) avant (A) et après (B) incubation avec les cellules d'*A. nidulans*.

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).



avant l'incubation avec les cellules. Les résultats de l'analyse du surnageant, après centrifugation des cellules en fin d'incubation de l'échantillon correspondant au point 3 ($5,0 \times 10^7$ cellules par ml), sont illustrés par la figure 33B (p. 95). Les deux figures sont très comparables et il semble que le DNA bactérien ne soit pas modifié pendant l'incubation avec les cellules. Des résultats identiques ont été obtenus lors de l'analyse des surnageants acellulaire correspondant aux autres points de l'expérience.

Les expériences ont été répétées plusieurs fois dans des mêmes conditions expérimentales, et des résultats identiques ayant été obtenus, nous avons utilisé, pour nos expériences ultérieures, des cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance dont la concentration cellulaire était voisine de 5×10^7 cellules par ml.

3. RECHERCHE DES CONDITIONS DE PRISE OPTIMALE

a) Influence de l'agitation

L'importance des échanges gazeux entre le milieu de culture et le milieu extérieur est fonction de la fréquence d'agitation. Nous avons comparé les résultats de l'absorption de DNA exogène bactérien par les cellules d'*A. nidulans* lorsque celles-ci sont agitées doucement (60 agitations par min) ou fortement (230 agitations par min).

Les cellules ($6,2 \times 10^7$ cellules par ml) ont été incubées à 32 °C sous 2500 lux avec 30 µg/ml de DNA de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (radioactivité spécifique : $1,5 \times 10^6$ dpm/µg).

La radioactivité acido-insoluble totale liée aux cellules est

égale à 10 300 000 cpm dans le cas d'une agitation douce, elle est égale à 9 970 000 cpm lorsque l'agitation est vigoureuse. Nous voyons que les résultats sont identiques et pour une question de facilité, lors des expériences ultérieures, les incubations en présence de DNA radioactif ont été faites avec une agitation douce.

b) Influence de la température

D'après ORKWISZEWSKI et KANEY (1974), la température à laquelle des cellules sont incubées dans le milieu contenant le DNA exogène, est critique pour l'obtention de transformants. Pour ces auteurs la température optimale est de 25 °C et ils n'ont obtenu aucune transformation lorsque l'incubation a lieu à 40 °C (dans le milieu de culture) qui est la température optimale de croissance de l'algue.

Cependant, SHESTAKOV et KHYEN (1970) et HERDMAN (1973a, 1973b) ont obtenu des cellules transformées et avec une fréquence comparable, en travaillant respectivement à 38 °C (dans le tampon phosphate) et à 34 °C (dans le milieu de culture).

Nous avons étudié l'effet éventuel de la température sur l'absorption de DNA de *S. flava* ATCC 540 (radioactivité spécifique : 8×10^5 dpm/ μ g, concentration : 30 μ g/ml) par les cellules d'*A. nidulans* (concentration cellulaire : $4,9 \times 10^7$ cellules par ml).

Les résultats montrent que la quantité de radioactivité acido-insoluble liée aux cellules est pratiquement identique aux différentes températures étudiées (de 20 °C à 42 °C).

Nous avons analysé par centrifugation en gradient de CsCl les surnageants acellulaires après incubation avec les cellules. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus lors de l'analyse dans les mêmes conditions du milieu avant l'incubation avec les cellules. Les déviations standards des distributions étaient identiques et montraient qu'il n'y avait pas eu de modification du DNA bactérien quelle que soit la température à laquelle les incubations avaient eu lieu.

Nous avons cultivé les algues à la température de 32 °C (ASATO et FOLSOME, 1970), et les incubations avec le DNA exogène ont été faites à la même température.

c) Influence de la durée d'incubation

SHESTAKOV et KHYEN (1970) ont obtenu les premiers transformants après 30 min d'incubation des cellules avec le DNA homologue, et dans leurs conditions expérimentales, la fréquence de transformation la plus élevée est obtenue lorsque les cellules sont incubées pendant 5 h avec le DNA donneur.

HERDMAN (1973a, 1973b) incube pendant beaucoup plus longtemps, 14 h, mais il utilise une concentration en DNA exogène beaucoup plus faible, égale à 0,1 µg par ml, alors que les autres auteurs utilisent une concentration égale à environ 20 - 40 µg/ml.

Nous avons étudié la prise de DNA de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (concentration : 30 µg/ml, radioactivité spécifique: 2×10^6 dpm/µg) par les cellules d'*A. nidulans* (concentration cellulaire : $6,0 \times 10^7$ cellules par ml) en fonction de la durée d'incubation.



Les résultats sont rassemblés dans le tableau X (p. 101) et illustrés par la figure 37A p.102 .

Nous voyons que les valeurs de la radioactivité acido-insoluble les plus élevées sont observées aux temps d'incubation les plus courts, 30 et 60 min.

En fin d'incubation, les surnageants acellulaires ont été analysés par centrifugation en gradient de CsCl. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux observés lors de l'analyse du milieu radioactif avant l'incubation avec les cellules. Les diagrammes sont identiques et les écarts standards des distributions sont comparables. Les valeurs du bruit de fond sont normales et semblent indiquer qu'il n'y ait pas eu de dégradation du DNA bactérien dans le milieu d'incubation même quand l'incubation a été prolongée pendant plusieurs heures.

d) Influence de la concentration en DNA bactérien dans le milieu d'incubation

Pour cette étude, nous avons incubé pendant 45 min des cellules d'*A. nidulans* provenant d'une culture en phase de croissance exponentielle dont la concentration cellulaire était égale à $6,5 \times 10^7$ cellules/ml, dans du tampon phosphate (pH 8,0) contenant du DNA tritié de *S. flava* (radioactivité spécifique : 8×10^5 dpm/ μ g) à des concentrations différentes (de 0,33 μ g/ml à 70 μ g/ml).

En fin d'incubation, les cellules ont été traitées et les résultats des analyses sont rassemblés dans le tableau XI (p.101) et sont illustrés par la figure 37B (p.102).

TABLEAU X

Résultats de l'étude de la prise de DNA de *M. lysodeikticus* par *A. nidulans*, en fonction de la durée d'incubation avec le DNA ³H de *M. lysodeikticus*

Temps d'incubation des cellules avec le DNA ³ H (heure)	0,5	1	3	4	5	8	12
	35 400	30 800	9400	13 300	13 700	7200	15 500
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules (cpm totaux)							

TABLEAU XI

Résultats de l'étude de la prise de DNA de *S. flava* par *A. nidulans*, en fonction de la concentration du DNA de *S. flava* dans le milieu d'incubation

Concentration du DNA de <i>S. flava</i> dans le milieu d'incubation(µg/ml)	0,33	3,3	10	20	33	44	55	70
	700	730	800	2700	3600	11 200	11 900	11 300
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules (cpm totaux)								



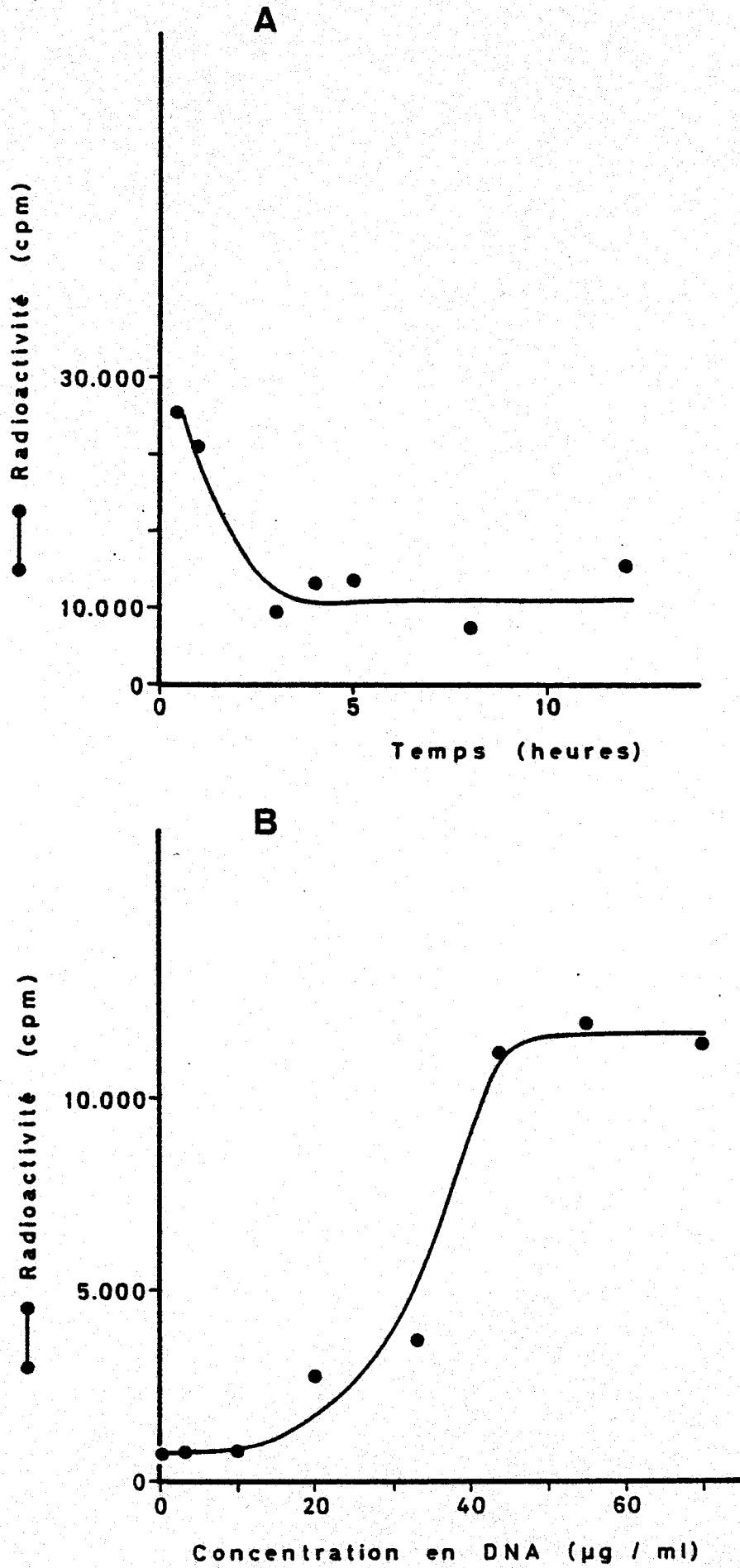


Fig. 37

Etude de l'absorption de DNA ^3H de *M. lysodeikticus* et de *S. flava* par les cellules d' *A. nidulans*, respectivement en fonction de la durée de l'incubation (A) et en fonction de la concentration en DNA bactérien dans le milieu d'incubation (B).



Les valeurs les plus élevées de la radioactivité acido-insoluble extraite des cellules sont atteintes lorsque la concentration en DNA bactérien dans le milieu d'incubation est voisine de 40 à 50 µg/ml.

4. ESSAIS DE TRANSFORMATIONS INDUITES PAR DU DNA HOMOLOGUE OU HETEROLOGUE

Pour ces essais, nous avons utilisé la souche IU 625/1172 auxotrophe pour la méthionine, dont la croissance tant en milieu liquide que sur milieu solide est normale, et dont le pourcentage de réversion est faible (0,0001).

Nous avons utilisé soit du DNA d'*A. nidulans* IU 625, soit du DNA de *M. lysodeikticus* ATCC 4698.

Les conditions expérimentales sont celles décrites dans le chapitre matériel et méthodes (XI) et peuvent être résumées comme suit : des aliquotes d'une culture en phase exponentielle de croissance dont la concentration cellulaire est égale à $5,2 \times 10^7$ cellules/ml sont centrifugées, le surnageant est écarté et est remplacé par un volume égal de tampon phosphate (pH 8,0) contenant soit du DNA d'*A. nidulans*, soit du DNA de *M. lysodeikticus* à la concentration de 40 µg/ml.

L'incubation est poursuivie pendant 4 heures, avec agitation lente, sous 2500 lux et à la température de 32 °C.

En fin d'incubation, les suspensions sont centrifugées, les cellules sont ensuite traitées par de la DNase et finalement mises en culture sur milieu solide.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XII (p. 105). Pour la transformation homologue, nous obtenons un pourcentage assez élevé, comparable à ceux obtenus par d'autres auteurs pour la correction d'autres marqueurs (HERDMAN, 1973a, 1973b ; ORKWISZEWSKI et KANEY, 1974). Par contre après traitement des cellules par le DNA de *M. lysodeikticus*, les pourcentages de transformation ne sont pas significativement différents de ceux de réversion.

5. ETUDE BIOCHIMIQUE DE L'ABSORPTION DE DNA EXOGENE

Nos premiers essais avaient montré qu'une quantité importante de radioactivité acido-précipitable (tableau IX, p.97) pouvait être extraite des cellules après incubation de celles-ci avec du DNA tritié du *M. lysodeikticus*.

D'autre part, les essais de transformation induite par ce DNA bactérien étant négatifs, il était important d'étudier la nature des molécules radioactives présentes dans les cellules en fin d'incubation avec le DNA radioactif.

Nous avons répété les expériences d'essais de transformation, mais en utilisant cette fois soit du DNA tritié d'*A. nidulans*, soit du DNA tritié de *M. lysodeikticus*.

Des cellules, provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance dont la concentration cellulaire était égale à $5,4 \times 10^7$ cellules/ml, ont été incubées pendant 45 min dans du tampon phosphate (pH 8,0) contenant soit du DNA tritié d'*A. nidulans* (activité spécifique : 4×10^6 dpm/ μ g), soit du DNA tritié de *M. lysodeikticus* (activité spécifique : 2×10^6 dpm/ μ g), à la concentration de 40 μ g/ml. Les cellules ont ensuite été centrifugées, lavées et traitées par la DNase.

TABLEAU XII

Résultats d'essais de transformation d'*A. nidulans* 1172 par du DNA homologue et hétérologue *M. lysodeikticus*

Expérience	DNA donneur	Transformés par ml	Révertants par ml	Comptes viables $\times 10^{-7}$ par ml	Fréquence de trans- formation en %
1	-		49	3,95	0,00012
2	-		92	4,80	0,00019
3	-		67	3,52	0,00019
1	<i>A. nidulans</i> IU625	102 000		4,82	0,21
2	idem	124 000		4,95	0,25
3	idem	68 400		3,80	0,18
1	<i>M. lysodeikticus</i> ATCC4698	52		3,80	0,00014
2	idem	97		4,40	0,00022
3	idem	61		3,75	0,00016

Le DNA a été extrait des cellules suivant la méthode décrite dans le chapitre matériel et méthodes (V.B).

a) Cellules traités par du DNA ^3H d'*A. nidulans*

1. Analyse du surnageant acellulaire en fin d'incubation

Le surnageant acellulaire a été analysé par centrifugation en gradient de CsCl et les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus lors de l'analyse dans les mêmes conditions du milieu avant l'incubation avec les cellules.

Les résultats sont illustrés par les figures 38A et 38B (p. 107) respectivement. On peut voir que les distributions sont très semblables, ce qui semble indiquer que le DNA n'a pas été modifié ou très peu pendant l'incubation avec les cellules.

2. Analyse du DNA extrait des cellules en fin d'incubation

La figure 39A (p. 108) illustre les résultats de la filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat cellulaire. On observe deux pics en radioactivité.

Les fractions 5 à 7 correspondant au premier pic ont été rassemblées et analysées par centrifugation en gradient de CsCl. Les résultats sont illustrés par la figure 39B (p. 108) et on peut voir que les molécules radioactives sédimentent dans le gradient à une position qui correspond à la densité de $1,714 \text{ g/cm}^3$, densité du DNA d'*A. nidulans*.

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de

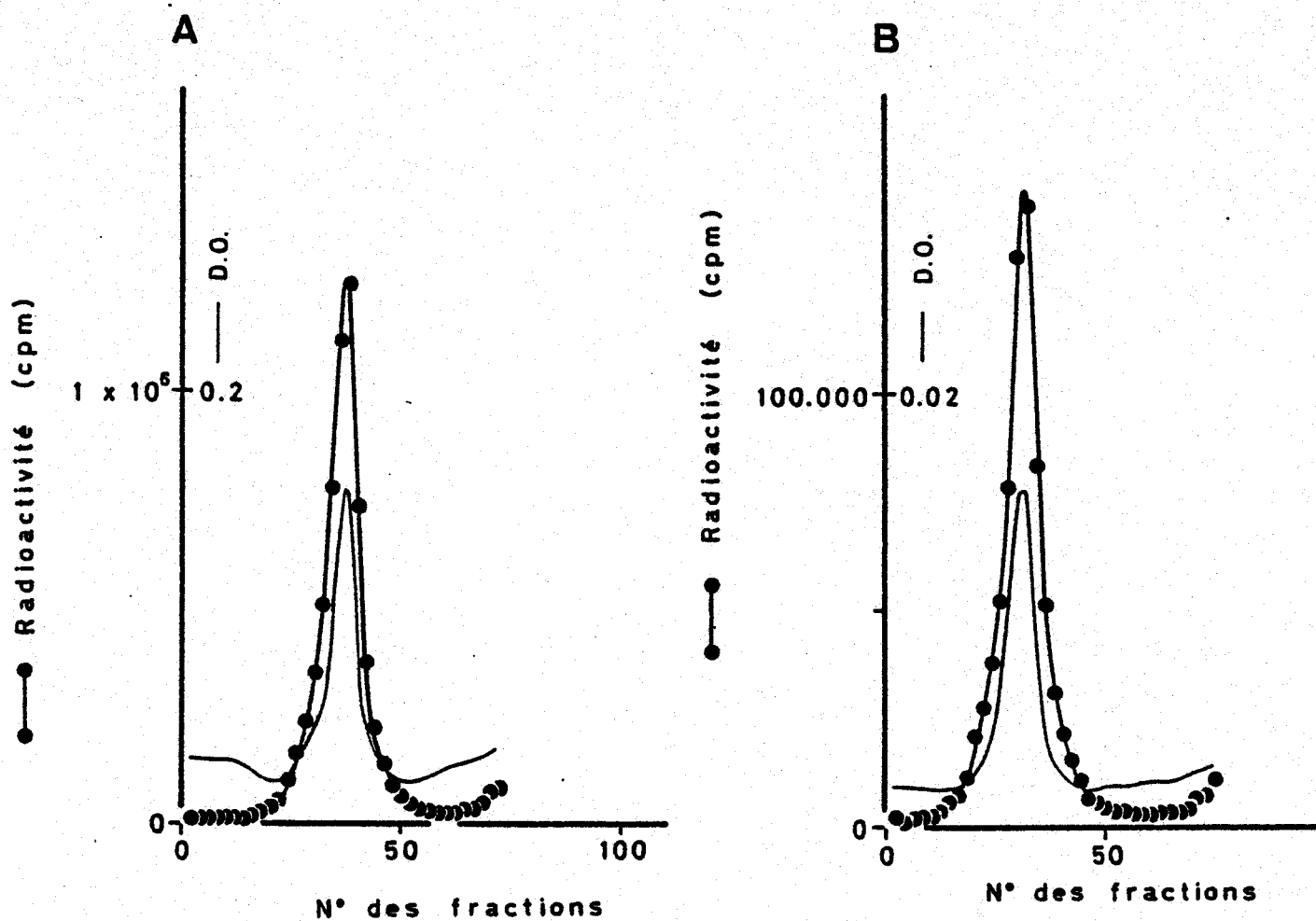


Fig. 38

Analyse en gradient de CsCl des milieux radioactifs (contenant du DNA ^3H de *A. nidulans*) avant (B) et après (A) incubation avec les cellules d' *A. nidulans*



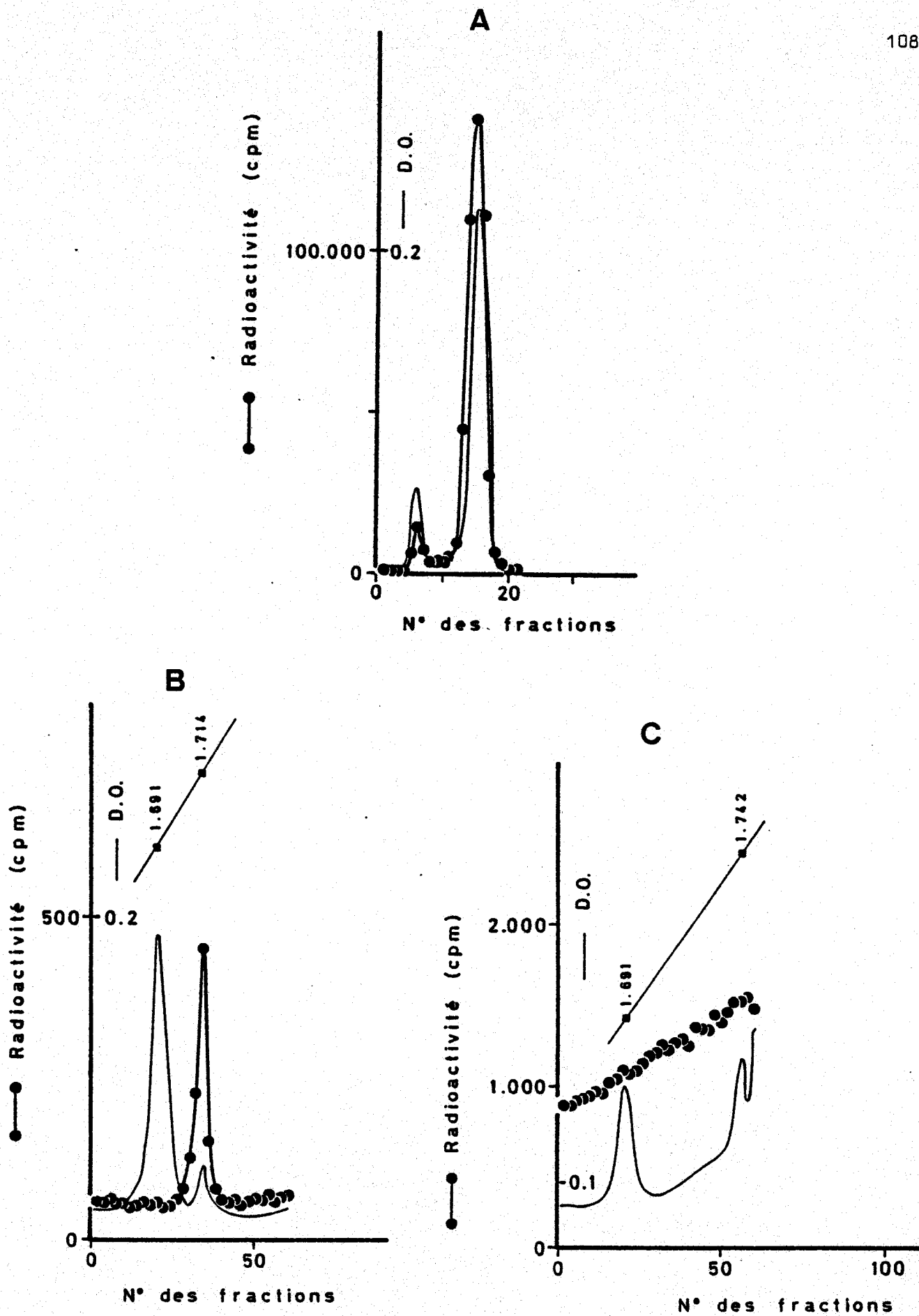


Fig. 39

Fig. 39A : filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un lysat de cellules d' *A. nidulans*, après incubation avec du DNA ^3H de *A. nidulans*.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 5 à 7 (fig. 39B) et des fractions 13 à 18 (fig. 39C).

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm 3), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm 3).

CsCl des fractions 13 à 18, correspondant au second pic de la figure 39A (p. 108), sont illustrés par la figure 39C (p. 108). On voit que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

b) Cellules traitées par du DNA ^3H de *M. lysodeikticus*

1. Analyse du surnageant acellulaire en fin d'incubation

Le surnageant acellulaire a été analysé par centrifugation en gradient de CsCl et les résultats ont été comparés à ceux obtenus lors de l'analyse du milieu avant l'incubation avec les cellules. Les résultats sont illustrés par les figures 40A et 40B (p. 110) respectivement. Les deux distributions sont comparables et il semble que le DNA bactérien soit peu ou pas modifié pendant l'incubation avec les cellules.

2. Analyse du DNA extrait des cellules en fin d'incubation

Les résultats de la filtration sur colonne de Sepharose 4 B du lysat cellulaire partiellement purifié sont illustrés par la figure 41A (p. 111). On observe deux pics radioactifs.

La figure 41B (p. 111) illustre les résultats de l'analyse par ultracentrifugation en gradient de CsCl des fractions 5 à 7, correspondant au 1^{er} pic. Nous voyons que les molécules radioactives sédimentent dans le gradient à une position qui correspond à la densité du DNA d'*A. nidulans* ($1,714 \text{ g/cm}^3$).

Les résultats de l'analyse des fractions 11 à 16, correspondant au second pic de la figure 41A (p. 111), sont illustrés par la figure 41C

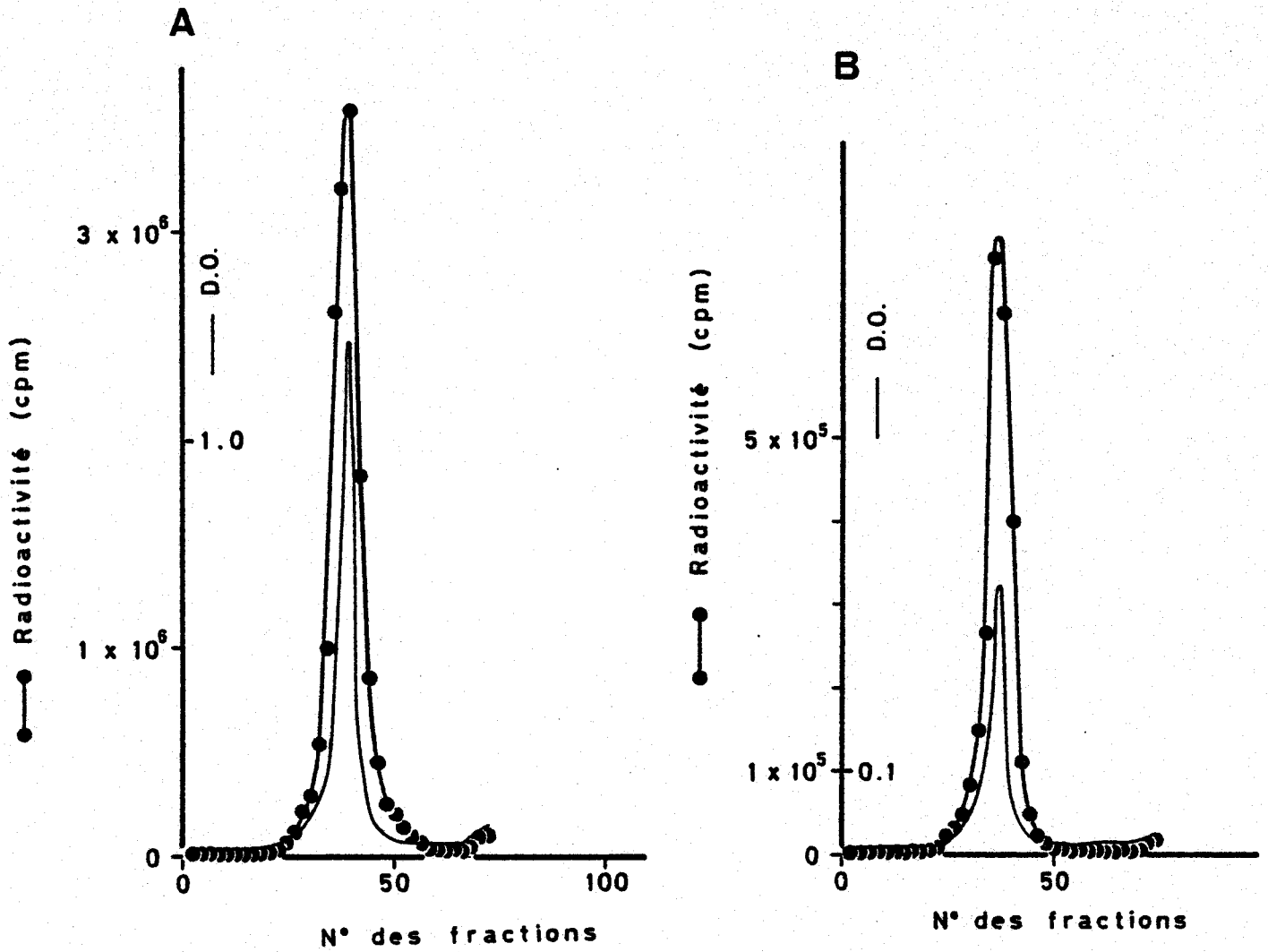


Fig. 40

Analyse en gradient de CsCl des milieux radioactifs (contenant du DNA ^3H de *M. lysodeikticus*) avant (B) et après (A) incubation avec les cellules d' *A. nidulans*.

BUS
LILLE

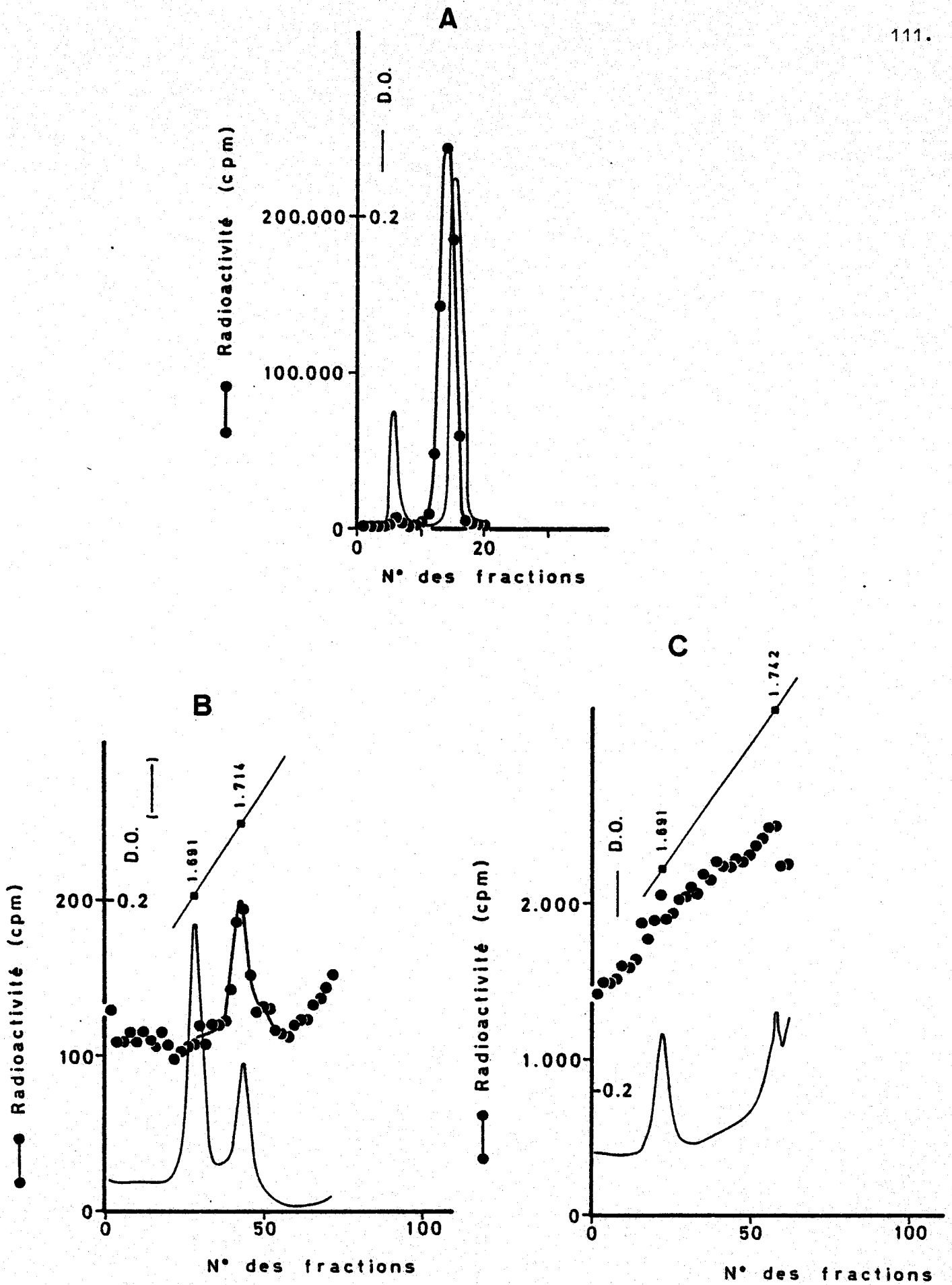


Fig. 41

Fig. 41A : filtration moléculaire sur gel d'agarose d'un lysat de cellules d' *A. nidulans*, après incubation avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus*.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 5 à 7 (fig. 41B) et des fractions 11 à 16 (fig. 41C).

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).



(p. 111). La radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

c) Analyse par thermo-chromatographie sur HAP après réassociation moléculaire

L'analyse du DNA extrait des cellules en fin d'incubation avec du DNA tritié de *M. lysodeikticus* montre que la radioactivité est portée par des molécules qui, en gradient de CsCl, ont une densité égale ou voisine de celle du DNA de l'algue (1,714 g/cm³).

Le DNA total extrait des cellules a été analysé en vue de la présence éventuelle de séquences de DNA bactérien.

Les DNA sont dépolymérisés par action des ultrasons pendant 15 min de manière à obtenir un poids moléculaire inférieur à 400 000 daltons.

Le DNA radioactif extrait des cellules a été mélangé à un excès de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus* dans du tampon Tris 0,01 M (pH 7,4), du NaCl 0,4 M, du SDS 0,1 % et de la formamide 50 %. Le mélange est aspiré dans un capillaire qui est ensuite scellé .

Après dénaturation par immersion dans un bain-marie à 100 °C pendant 10 min, les capillaires sont placés dans un bain-marie à 51 °C. Les conditions de réassociation sont maintenues pendant 18 heures de manière à obtenir un Cot égal à 100 compte tenu de la concentration en DNA et de la molarité en NaCl du mélange.

En fin d'incubation, l'échantillon est dilué par du tampon

phosphate (TP) 0,01 M de manière à obtenir une concentration en formamide inférieure à 1 %.

Les échantillons sont chargés sur colonne d'hydroxylapatite (HAP) à 60 °C préalablement équilibrée par des lavages successifs par du TP 0,01 M à 60 °C.

La colonne est lavée trois fois par du tampon 0,01 M. La radioactivité présente dans ces éluats représente le matériel non adsorbé. Le matériel simple chaîne est ensuite élué par passage de TP 0,12 M. La radioactivité présente dans ces échantillons représente le matériel non renaturé.

La température est ensuite élevée par incréments de 5 °C. Lorsque l'équilibre thermique est obtenu, les fractions dénaturées sont éluées par passage de TP 0,12 M porté à la même température.

La radioactivité des différentes fractions est déterminée par comptage en scintillation liquide.

Les mêmes opérations ont été conduites en utilisant du DNA tritié de *M. lysodeikticus* dénaturé et réassocié en présence soit d'un excès de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*, soit d'un excès de DNA non-radioactif de cellules de souris. Les résultats sont illustrés par les figures 42A, 42B et 42C (p. 114) respectivement.

On peut voir que, dans nos conditions expérimentales et dans l'expérience témoin, on obtient environ 50 % de réassociation. L'analyse par thermo-chromatographie du DNA bicaténaire montre (figure 42B ,p. 114)

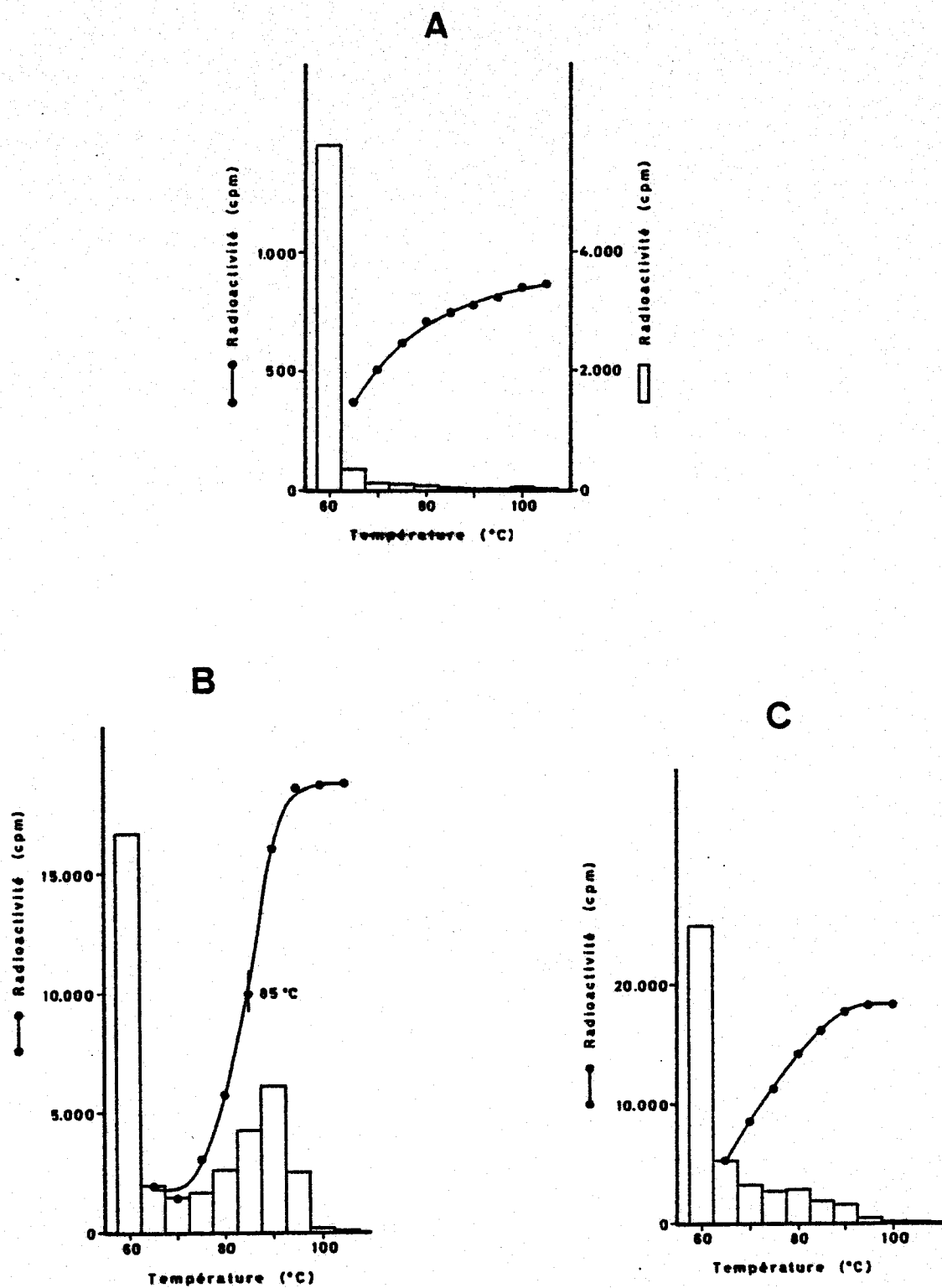


Fig. 42

Analyse par thermo-chromatographie sur HAP après réassociation moléculaire

A : DNA extrait des cellules après incubation (DNA ^3H *M. lysodeikticus*)

B : DNA ^3H de *M. lysodeikticus*

C : DNA ^3H de *M. lysodeikticus*

dénaturés et renaturés en présence d'un excès de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus* (A et B) ou de DNA non-radioactif de souris (C).



que la radioactivité est éluée entre 70 et 100 °C, avec une température de fusion égale à 85 °C.

Dans le cas du DNA radioactif extrait des cellules d'*A. nidulans*, dénaturé en présence d'un excès de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*, on observe qu'environ 90 % de la radioactivité est éluée par le TP 0,12 M à 60 °C. La thermo-chromatographie de la fraction adsorbée sur la colonne ne montre pas de profil d'éluion caractéristique d'un DNA bicaténaire (figure 42A, p. 114).

Une allure identique est observée dans le cas du DNA radioactif de *M. lysodeikticus* dénaturé en présence d'un excès de DNA de cellules de souris (figure 42C , p. 114).

Si des séquences de DNA bactérien radioactif avaient été présentes dans le DNA extrait des cellules, elles auraient dû se réassocier, dans nos conditions expérimentales, avec le DNA bactérien non-radioactif présent en excès et montrer lors de la thermo-chromatographie un profil semblable à celui observé lors de l'expérience contrôle.

6. CONCLUSIONS

1. Nous avons étudié l'absorption de DNA radioactif de *M. lysodeikticus* par les cellules d'*A. nidulans* prélevées à différents moments de la croissance, et nous avons observé un moment préférentiel de prise lorsque la concentration cellulaire de la culture est égale à environ 5×10^7 cellules par ml, et qui pourrait correspondre à la phase de compétence signalée par ORKWISZEWSKI et KANEY (1974).
2. L'étude de différents paramètres nous a permis d'établir les conditions expérimentales dans lesquelles la prise de DNA bactérien exogène est optimisée. Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance dont la concentration cellulaire est égale à 5×10^7 cellules/ml ($\pm 1 \times 10^7$) sont incubées pendant 45 minutes à 32°C (± 10) dans du tampon phosphate (pH 8,0) contenant le DNA bactérien à la concentration de $40 \mu\text{g/ml}$ (± 10) sous une intensité lumineuse de 2500 lux et avec une agitation lente (± 60 agitations/min).
3. Nous avons fait des essais de transformation d'un mutant d'*A. nidulans*, 1172 auxotrophe pour la méthionine, induite par du DNA homologue et hétérologue (*M. lysodeikticus*). La fréquence de transformation homologue observée (0,2 %) est comparable à celles signalées par d'autres auteurs avec d'autres mutants d'*A. nidulans*. Par contre, la fréquence de transformation hétérologue n'est pas différente de celle de réversion.
4. Des études biochimiques, il semble qu'on puisse dire que :
 - le DNA bactérien n'est pas ou peu modifié lors de l'incubation avec les cellules. En fin d'incubation, le DNA sédimente en gradient de

CsCl comme un DNA polymérisé et on n'observe pas de molécules de faible poids moléculaire qui pourraient provenir de la dégradation du DNA étranger ;

- le DNA bactérien est rapidement dégradé à l'intérieur des cellules. La radioactivité présente dans les cellules en fin d'incubation avec le DNA bactérien est portée soit par des molécules de poids moléculaire élevé qui ont en gradient de CsCl une densité équivalente à celle du DNA de l'algue, soit par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Les molécules radioactives de poids moléculaire élevé dont la densité est équivalente à celle du DNA de l'algue, pourraient-elles être des molécules de *M. lysodeikticus* "intégrées" dans le génome de l'algue ?

L'analyse par centrifugation en gradient de CsCl ne permet pas de donner une réponse définitive. En effet, ces molécules radioactives ont une densité voisine de celle de l'algue et on sait qu'en centrifugation préparative, l'erreur sur l'estimation de la densité est de l'ordre de 2 mg/ml. Sachant que la densité du DNA d'*A. nidulans* est égale à 1,714 g/cm³ et celle du DNA de *M. lysodeikticus* à 1,731 g/cm³, on peut calculer que pour obtenir une molécule hybride dont la densité serait significativement différente de celle du DNA de l'algue, le DNA bactérien devrait représenter environ 15 % de la molécule, et les résultats obtenus permettent de dire que s'il était présent, le DNA de *Micrococcus* représenterait moins de 15 % de la molécule hybride ;

la méthode par hybridation DNA-DNA est beaucoup plus sensible et permettrait des détections de quantité de 0,01 à 2 % de DNA étranger (LURQUIN,1976).

En postulant que toute la radioactivité est portée par des molécules de DNA de *Micrococcus*, ce dernier représenterait environ 0,2 % de la quantité totale de DNA.

Dans le cas présent, les résultats observés permettent de dire que le pourcentage de DNA étranger est inférieur à 0,1 % ou que la radioactivité est portée par des molécules d'une autre nature.

III. Prise et sort de DNA radioactif bactérien chez les algues

B. *Euglena gracilis*

1. CHOIX D'UN MILIEU D'INCUBATION AVEC LE DNA BACTERIEN

Nous avons comparé la prise de DNA radioactif bactérien par les cellules d'*E. gracilis* en suspension dans deux milieux d'incubation différents :

1. Milieu de culture de CRAMER et MYERS (1952) sans vitamine B1 ni B12 (pH : 7,0).
2. Tampon phosphate, pH : 7,0.

Nous n'avons pas ajouté de vitamines au milieu d'incubation 1, en nous basant sur le fait que les milieux de transformation utilisés pour les bactéries sont en général des milieux de survie, dans lesquels les bactéries ne peuvent pas se multiplier.

Nous avons utilisé un DNA tritié de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (radioactivité spécifique : $1,9 \times 10^6$ dpm/ μ g), et les cellules ont été incubées pendant 1 h dans le milieu radioactif contenant 30 μ g/ml de DNA bactérien. Après traitement par la DNase, le matériel acido-insoluble est précipité par addition de TCA froid et est récupéré sur filtre.

La radioactivité acido-précipitable, égale à 348 000 cpm lorsque les cellules ont été incubées dans le milieu de culture, est égale à 1 245 000 cpm lorsque l'incubation a lieu dans le tampon phosphate.

C'est donc le tampon phosphate (pH : 7,0) qui a été utilisé pour

les expériences ultérieures.

2. PRISE DE DNA RADIOACTIF BACTERIEN EN FONCTION DE LA CROISSANCE

Des aliquotes ont été prélevées à différents moments de la croissance et traitées comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes (XII).

Nous avons utilisé du DNA radioactif de *M. lysodeikticus* (radioactivité spécifique : $1,5 \times 10^6$ dpm/ μ g), à la concentration finale de 35 μ g/ml.

Les résultats de l'estimation de la radioactivité dans les différents échantillons sont rassemblés dans le tableau XIII (p. 121), et sont illustrés par la figure 43 (p. 122).

L'analyse de ces résultats montre que la courbe de radioactivité totale acido-insoluble passe par un maximum approximativement au milieu de la phase exponentielle de croissance (figure 43, p. 122). Lorsque les résultats sont exprimés en radioactivité acido-insoluble par cellule (ou par unité de D.O.), les valeurs les plus élevées sont observées lorsque la concentration cellulaire dans la fiole de culture est la plus faible, la courbe ayant tendance à dessiner un plateau au milieu de la phase exponentielle de croissance.

Nous avons également analysé les surnageants acellulaires après la période d'incubation dans le milieu radioactif. Les résultats ont été comparé à ceux obtenu en analysant de la même façon le milieu radioactif avant l'incubation des cellules.

TABLEAU XIII

Résultats de l'étude de la prise de DNA ^3H de *M. lysodeikticus* par *E. gracilis*
en quelques points de la courbe de croissance

	1	2	3	4
Point de la courbe (heures)	21	98	165	309
Nombre de cellules par ml $\times 10^{-5}$	2,11	9,95	18,80	39,5
Radioactivité dans le surnageant après incubation cpm tot. $\times 10^{-5}$	230,60	229,70	230,00	206,50
Radioactivité dans le surnageant après DNase cpm tot. $\times 10^{-5}$	0,82	0,67	0,65	0,27
Radioactivité acido-soluble dans les cellules cpm totaux	2560	3178	4496	3704
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules cpm totaux	7864	10 254	12 180	4332
Valeur de l'absorption à 258 nm de la fraction acido-insoluble unité D.O.	0,155	0,495	0,700	0,730
Radioactivité acido-insoluble par unité de D.O. cpm/D.O.	51 000	21 000	17 000	6000
Radioactivité acido-insoluble par cellule cpm/cell.	0,0373	0,0103	0,0065	0,0011



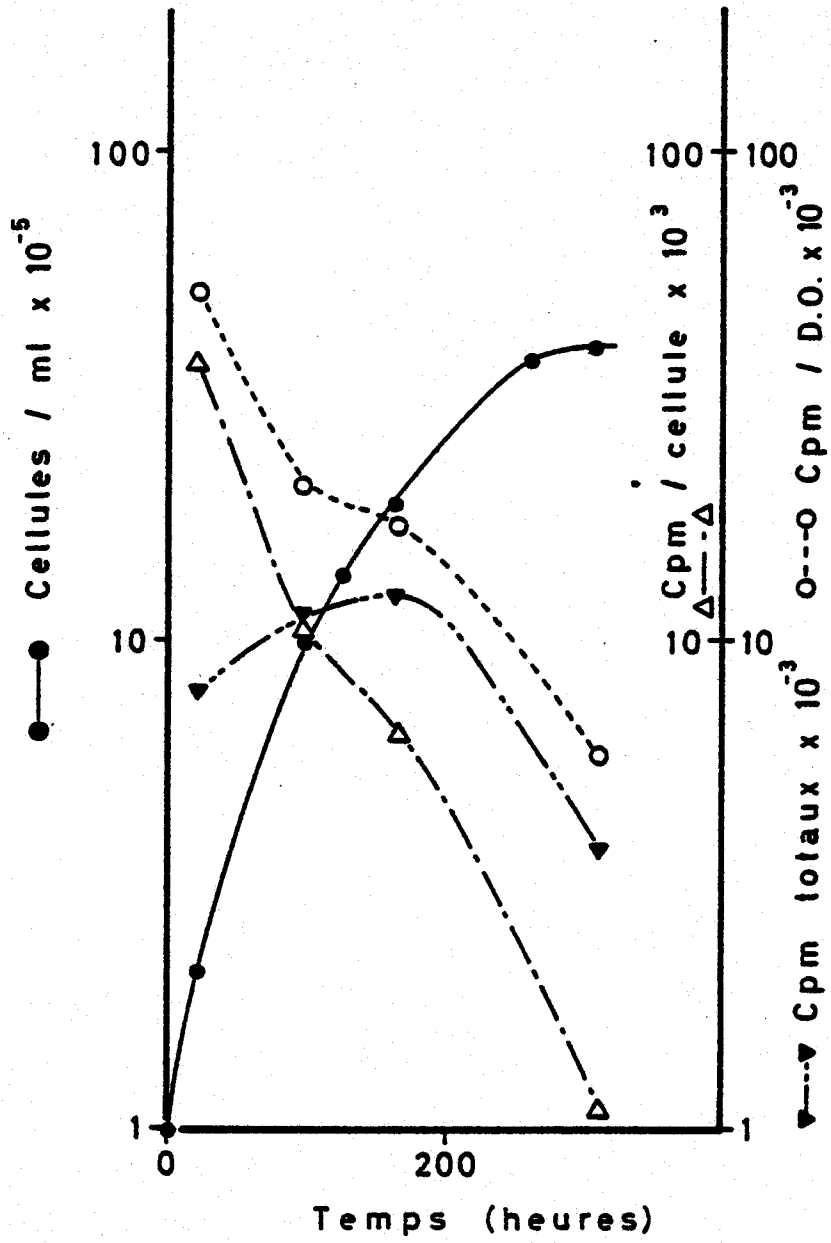


Fig. 43
Absorption de DNA ^3H de *M. lysodeikticus* par les cellules d' *E. gracilis* en fonction de la croissance.

Les résultats sont illustrés par les figures 44A (p. 124) et 44B (p. 124).

On peut voir que l'écart standard de la courbe de distribution de la radioactivité est identique dans les deux cas. Le degré de polymérisation des molécules radioactives n'a pas été modifié (ou très peu) lors de l'incubation avec les cellules, ce qui laisse supposer que ces dernières ne relâchent pas (ou peu) de nucléases dans le milieu extérieur.

Des résultats comparables ont été obtenus lors de répétitions dans des conditions expérimentales semblables.

3. SORT D'UN DNA RADIOACTIF BACTERIEN

Des cultures synchrones peuvent être obtenues lorsqu'on cultive *E. gracilis* à 21 °C avec agitation et avec alternance de phases de lumière (14 h) et d'obscurité (10 h) (EDMUNDS, 1965 et COOK, 1971). La synchronisation s'obtient dès le début de l'installation du régime lumière/obscurité, lorsque le nombre de cellules par ml est égal à environ 1×10^4 ou 1×10^5 .

La prise de DNA tritié bactérien a été étudiée avec des cellules se trouvant au repos en phase lumière (point 1) et avec des cellules en multiplication en phase obscurité (point 2) (figure 45 , p. 125).

L'incubation dans le tampon phosphate contenant du DNA radioactif de *S. flava* ATCC 540 (activité spécifique : 8×10^5 dpm/ μ g ; concentration : 30 μ g/ml), a été faite à la lumière (4500 lux) pour le point 1 et à l'obscurité pour le point 2, pendant 4 heures.

La suspension a ensuite été centrifugée et les cellules ont été

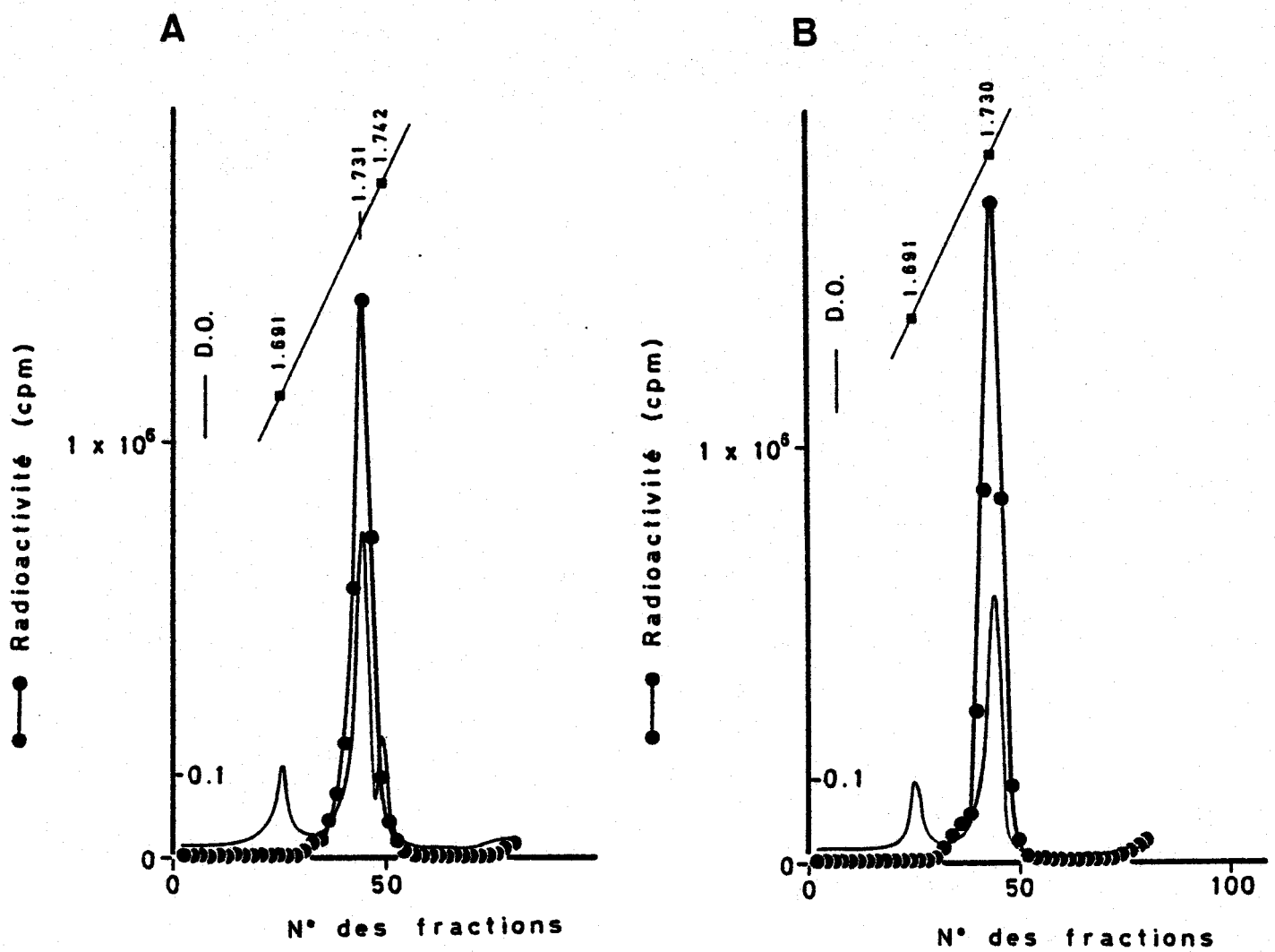


Fig. 44

Analyse en gradient de CsCl des milieux radioactifs (contenant du DNA ^3H de *M. lysodeikticus*) avant (B) et après (A) incubation avec les cellules d' *E. gracilis*.

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



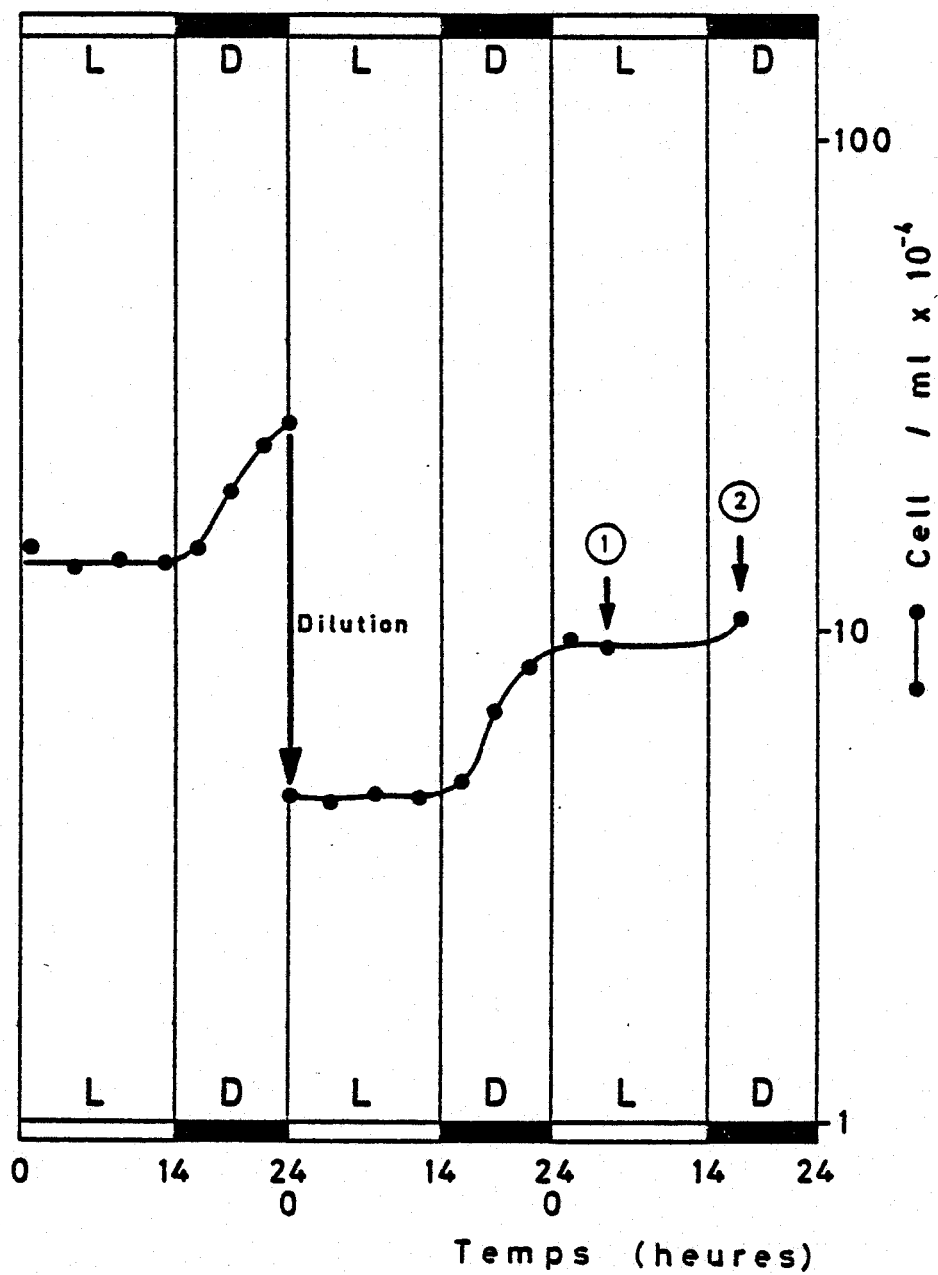


Fig. 45

Courbe de croissance de cellules d' *E. gracilis* après synchronisation.



lavées deux fois par agitation avec du NaCl 0,14 M. Une aliquote a été prélevée pour analyse (notée -A) et le reste a été remis en suspension dans du milieu de culture contenant du DNA de *S. flava* ATCC 540 non-radioactif à la concentration de 30 µg/ml et la culture a été poursuivie pendant 72 heures avec le régime lumière/obscurité décrit. L'analyse (notée -B) a alors été effectuée sur le lysat cellulaire purifié.

a) Analyse des échantillons prélevés en fin d'incubation avec le DNA radioactif bactérien

1. Analyse des surnageants

Le milieu radioactif, après incubation des cellules, correspondant au point 2-A, a été analysé par centrifugation en gradient de CsCl (figure 46 , p. 127). La valeur de l'écart standard de la distribution de la radioactivité est normale et on n'observe pas en dehors du pic, de radioactivité spécifique supérieure au bruit de fond normal. Les résultats obtenus avec le milieu d'incubation correspondant au point 1-A sont identiques.

Le DNA radioactif bactérien n'est donc pas ou très peu modifié lors de l'incubation avec les cellules.

2. Analyse de la radioactivité du lysat cellulaire purifié

Au point 1-A (à la lumière). Le lysat cellulaire est purifié par filtration sur gel d'agarose et la figure 47A (p. 128) illustre les résultats obtenus.

Nous voyons qu'il n'y a pas de radioactivité dans les fractions

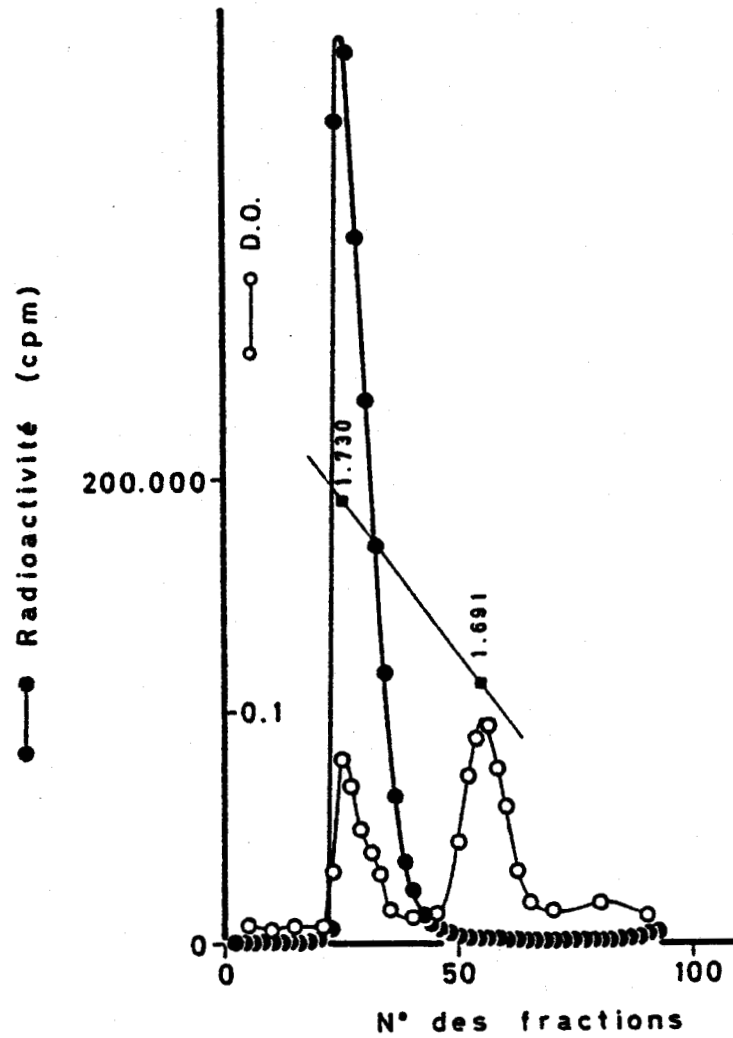


Fig. 46

Analyse en gradient de CsCl du milieu radioactif (contenant du DNA ^3H de *S. flava*) après incubation avec les cellules d' *E. gracilis*.

Référence de densité : DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm 3).



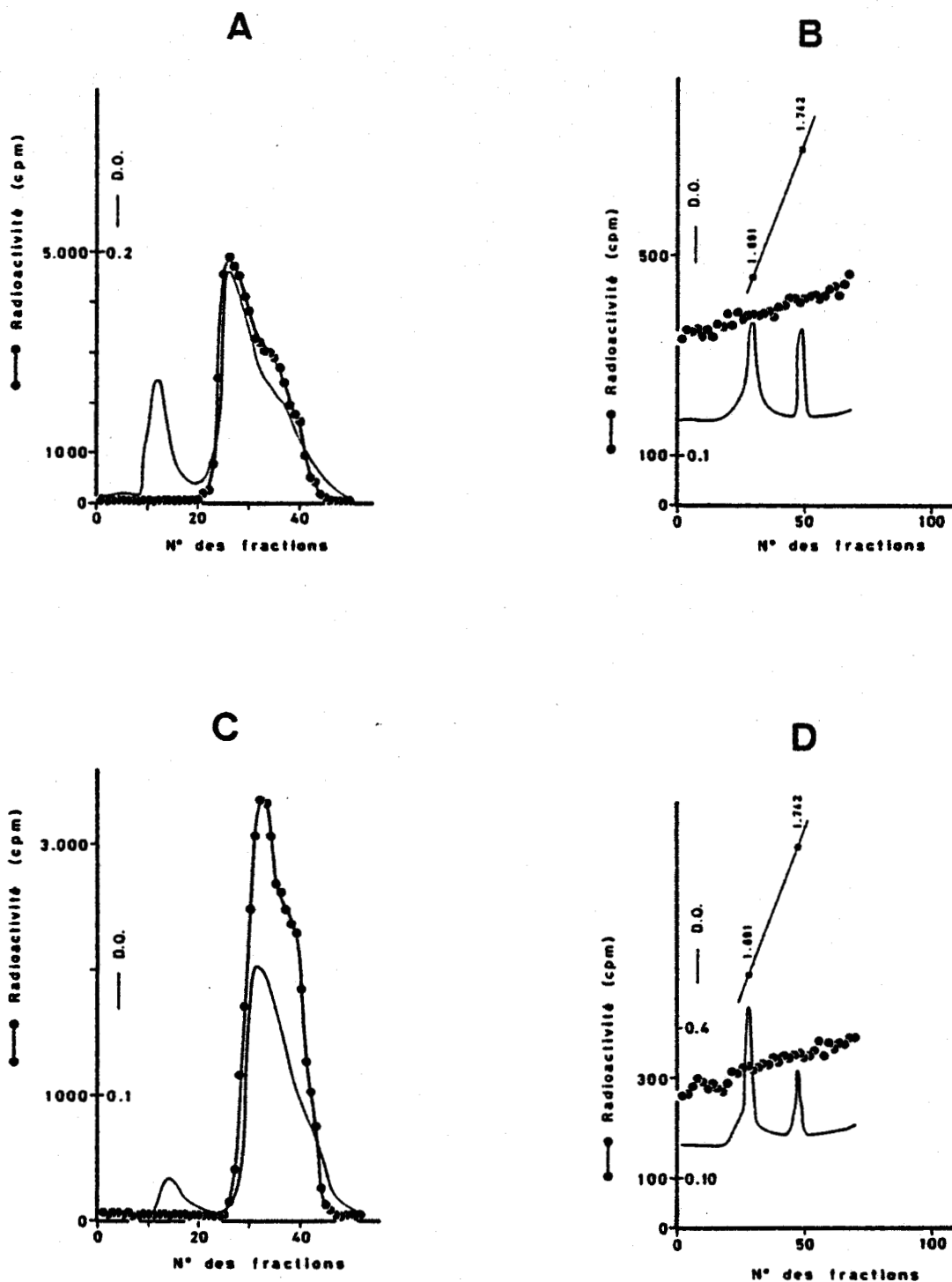


Fig. 47

Filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules d'*E. gracilis*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava*, échantillon correspondant au point 1 de la Fig. 45(A), au point 2 de la Fig. 45(C).

Analyse en gradient de CsCl

Fig. 47B : fractions 25 à 36 de la Fig. 47A

Fig. 47D : fractions 30 à 40 de la Fig. 47C.

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).

BIS
LILLE

10 à 15, contenant les molécules polymérisées éluées au volume mort. Mais nous observons au niveau des fractions 25 à 36, une radioactivité importante.

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des molécules, contenues dans les fractions 25 à 36, sont illustrés par la figure 47B (p. 128). On peut voir que la radioactivité est portée par des molécules de très faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Au point 2-A (à l'obscurité). Les résultats de la purification, par filtration moléculaire sur gel d'agarose, du lysat cellulaire sont illustrés par la figure 47C (p. 128).

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des molécules radioactives éluées dans les fractions 30 à 40, illustrés par la figure 47D (p. 128), montrent que la radioactivité est portée par de petites molécules qui ne sédimentent pas dans le gradient de densité.

b) Analyse des échantillons en fin de chasse (après 72 h de culture)

1. Analyse des surnageants

Après 72 h de culture, les cellules ont été centrifugées. La figure 48 (p. 130) illustre les résultats de la centrifugation en gradient de CsCl du surnageant correspondant au point 2-B.

On remarque que les molécules radioactives, de très faible poids moléculaire, ne sédimentent pas dans le gradient. Par contre, le DNA non-radioactif de *S. flava* ajouté pour la chasse est toujours polymérisé et

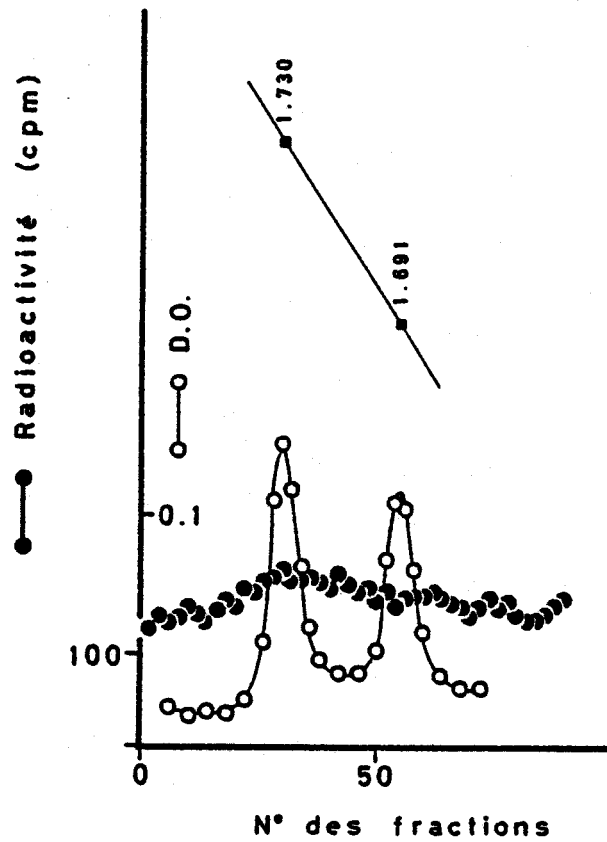


Fig. 48

Analyse en gradient de CsCl du surnageant acellulaire provenant de l'échantillon des cellules d' *E. gracilis* incubées dans du milieu contenant du DNA ^3H de *S. flava*, puis cultivées pendant 72 h dans du milieu contenant du DNA non-radioactif de *S. flava*.
 Référence de densité : DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



n'a pas ou peu subi de modifications ; il n'y a donc pas ou peu de nucléases dans le milieu après 72 h de culture.

Pour le point 1-B, les résultats sont identiques.

2. Analyse de la radioactivité du lysat cellulaire purifié

Au point 1-B. La figure 49A (p. 132) illustre les résultats de la filtration sur gel d'agarose du lysat cellulaire. Seules les molécules éluées dans les fractions 15 à 20 sont radioactives, et elles ont été analysées par centrifugation en gradient de CsCl (figure 49B , p. 132).

On voit que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Au point 2-B. Les résultats de la purification sur gel d'agarose du lysat cellulaire sont illustrés par la figure 49C (p. 132). On voit qu'il y a de la radioactivité dans les fractions 15 à 19.

L'analyse des molécules, contenues dans ces fractions, par centrifugation en gradient de CsCl montre (figure 49D , p. 132) que la radioactivité est portée par de petites molécules qui ne sédimentent pas dans le gradient.

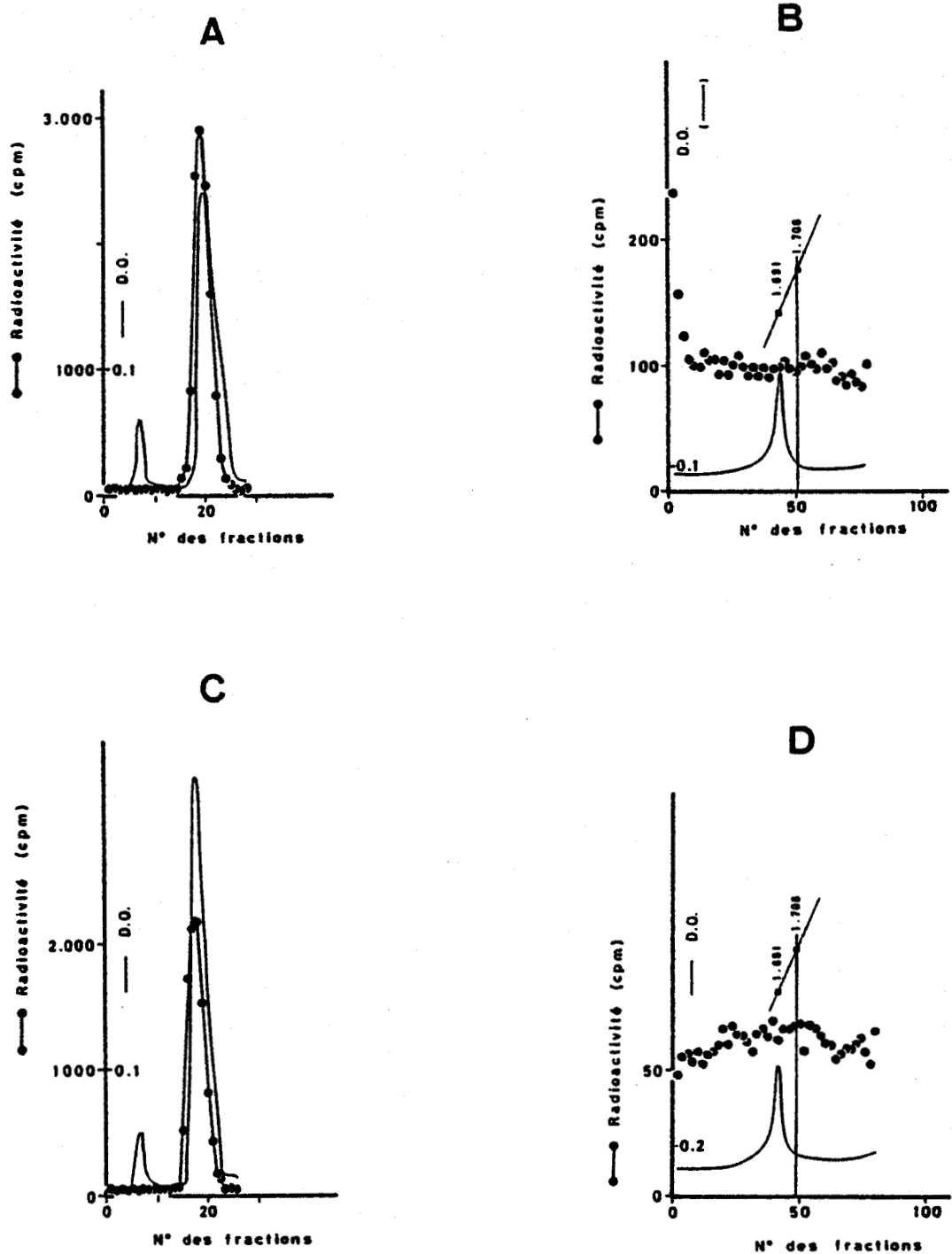


Fig. 49

Filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules d' *E. gracilis*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava* et puis culture pendant 72 h en présence de DNA non-radioactif de *S. flava*, échantillons correspondant au point 1-B (A), au point 2-B (C).

Analyse en gradient de CsCl

fig. 49B : fractions 15 à 20 de la fig. 49A

fig. 49D : fractions 15 à 19 de la fig. 49C

Références de densité : DNA d' *E. gracilis* ($1,708 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



4. CONCLUSIONS

1. Nous n'avons pas observé de phase préférentielle de prise de DNA radioactif de *M. lysodeikticus* par les cellules d'*E. gracilis* pendant la phase de croissance exponentielle.
2. Il semble que, dans nos conditions expérimentales, avec des cultures synchrones et après incubation soit à la lumière, soit à l'obscurité, du DNA radioactif de *S. flava* ne soit pas trouvé à l'intérieur des cellules d'*E. gracilis*.

III. Prise et sort de DNA radioactif bactérien chez les algues

C. *Ochromonas danica*

1. CHOIX D'UN MILIEU D'INCUBATION

Nous avons comparé les résultats obtenus lors de l'absorption de DNA radioactif bactérien par les cellules d'*O. danica*, en suspension soit dans le milieu de culture (pH : 6,1), soit dans du tampon phosphate (pH : 6,1).

Les cellules ont été incubées avec agitation pendant 1 heure dans l'un ou l'autre milieu contenant du DNA tritié de *S. flava* (concentration : 27 µg/ml, activité spécifique : 4×10^5 dpm/µg).

Les cellules ont ensuite été traitées comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes, (XI). La radioactivité acido-précipitable est égale à 76 700 cpm lorsque les cellules ont été incubées dans le milieu de culture, tandis qu'elle est égale à 191 440 cpm lorsque l'incubation a eu lieu dans le tampon phosphate.

Pour les essais ultérieurs, les cellules ont donc toujours été incubées dans du tampon phosphate contenant du DNA radioactif bactérien.

2. PRISE DE DNA ³H BACTERIEN EN FONCTION DE LA COURBE DE CROISSANCE

A différents moments de la croissance, des aliquotes de la culture ont été prélevées et les cellules incubées pendant 4 heures dans le tampon phosphate contenant du DNA radioactif de *S. flava* (concentration : 27 µg/ml, activité spécifique : 4×10^5 dpm /µg). Les échantillons ont été

analysés comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes, paragraphe XII.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XIV (p.136) et sont illustrés par la figure 50 (p. 137).

Nous pouvons constater (figure 50, p. 137) que la courbe des valeurs de la radioactivité par unité de D.O. (ou par cellule) varie inversement de la courbe du nombre de cellules, et que les valeurs de la radioactivité par cellule ou par unité de D.O. (cpm/D.O.) les plus élevées sont observées au début de la phase logarithmique de croissance.

Dans le tableau XIV (p. 136), deux valeurs attirent particulièrement l'attention, ce sont celles de la radioactivité acido-soluble présente dans les cellules 69 et 93 heures après le début de la culture. Ces deux valeurs sont significativement différentes de celles observées pour les autres temps étudiés. Par contre, les valeurs trouvées pour la radioactivité acido-insoluble ne sont pas significativement différentes les unes des autres, ce qui pourrait vouloir dire qu'aux temps 69 h et 93 h, donc au début de la phase stationnaire, il y aurait une prise plus importante de DNA étranger par les cellules, mais que ce DNA serait rapidement hydrolysé "in situ".

Les expériences ont été répétées plusieurs fois dans des conditions similaires, et des résultats analogues ont toujours été obtenus.

3. SORT DU DNA RADIOACTIF BACTERIEN

Nous avons étudié le sort d'un DNA radioactif exogène en trois moments de la courbe de la phase logarithmique de croissance, à des con-

TABLEAU XIV

Prise de DNA ^3H de *S. flava* par *O. danica*, à différents moments de la courbe de croissance : examen de la radioactivité acido-soluble et -insoluble

	1	2	3	4	5	6	7
Nombre d'heures après le début de la culture	0	22	39,5	69	93	117	140,5
Nombre de cellules par ml $\times 10^{-5}$	1,0	6,25	22,5	79,0	76,0	69,0	72,0
Radioactivité dans le surnageant après incubation cpm totaux $\times 10^{-5}$	40,5	43,2	42,2	44,4	43,0	44,0	40,0
Radioactivité dans le surnageant après DNase cpm totaux	1940	6236	6096	5792	8484	6850	6746
Radioactivité acido-soluble dans les cellules cpm totaux	1504	2124	3062	6955	6254	760	1098
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules cpm totaux	1828	2150	914	1818	908	804	1266
Absorption à 258 nm de la fraction acido-insoluble unité D.O.	0,037	0,044	0,082	0,445	0,467	0,413	0,512
Radioactivité acido-insoluble par unité de D.O. cpm/D.O.	49 400	48 860	11 140	4085	1945	1945	2375
Radioactivité acido-insoluble par cellule	0,018	0,0034	0,00041	0,00023	0,00012	0,00012	0,00017

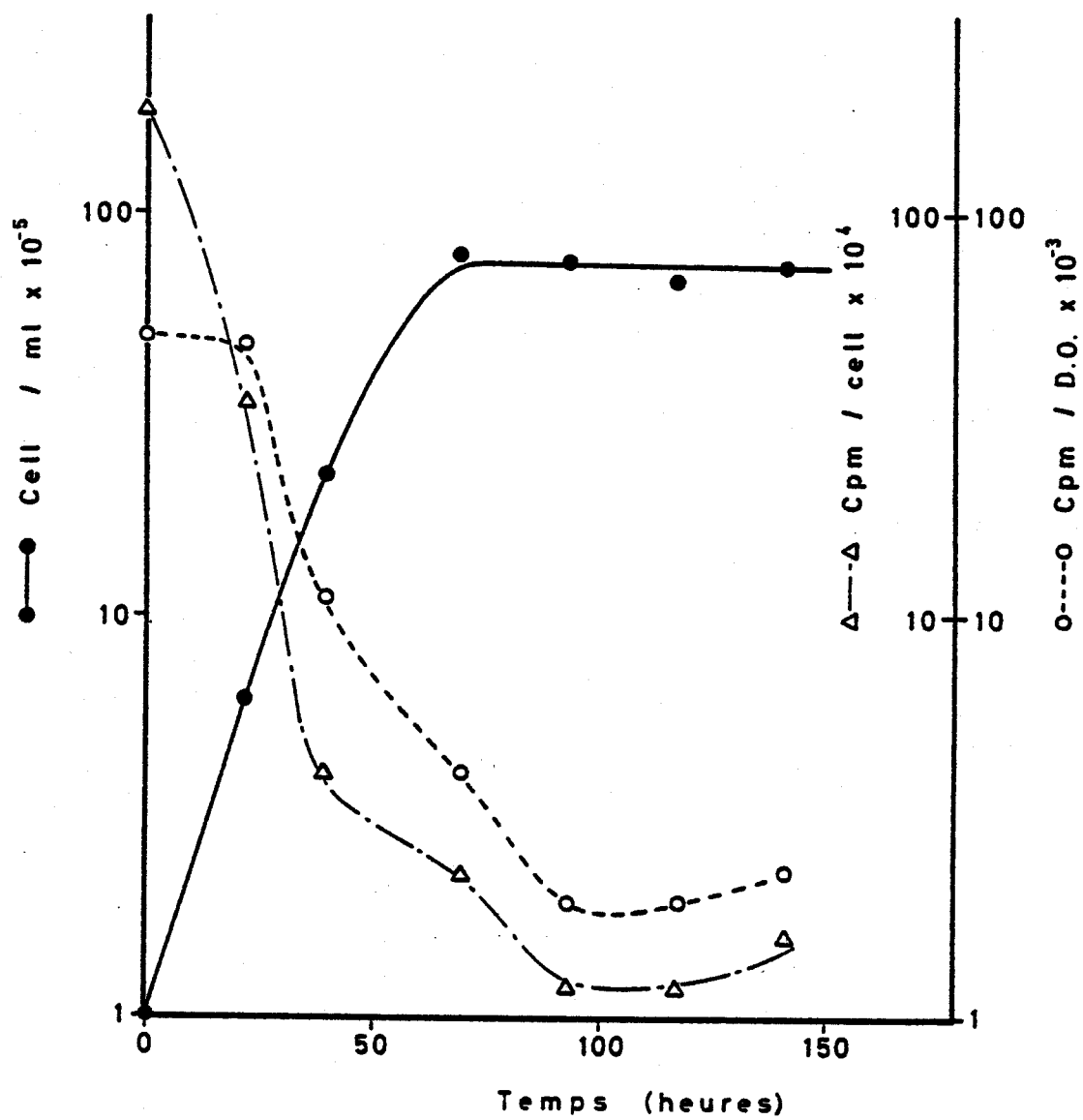


Fig. 50

Absorption de DNA ³H de *S. flava* par les cellules de *O. danica* en fonction de la croissance.



centrations cellulaires égales à $1,48 \times 10^5$ cellules/ml, à $2,2 \times 10^6$ cellules/ml, et à $4,0 \times 10^6$ cellules/ml.

Les cellules ont été incubées pendant 4 heures dans du tampon phosphate contenant du DNA de *S. flava* radioactif (concentration : 47 µg/ml, radioactivité spécifique : 8×10^5 dpm /µg, poids moléculaire : 10×10^6 daltons). Après lavage, une aliquote a été prélevée (notée A) et les cellules ont été remises en culture pendant 48 h dans du milieu de culture contenant du DNA non-radioactif de *S. flava* (concentration : 25 µg/ml).

A la fin de cette période de chasse, l'analyse (notée B) a été faite sur le DNA extrait des cellules suivant la méthode décrite dans le chapitre matériel et méthodes (VI, B, 2).

a) Analyse des échantillons prélevés en fin d'incubation avec le DNA radioactif bactérien

1. Analyse des milieux d'incubation

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl d'une aliquote du milieu d'incubation correspondant au point 3-A sont illustrés dans la figure 51 (p. 139).

On peut voir que les molécules radioactives sédimentent dans le gradient à une position correspondant à celle du DNA bactérien utilisé. La valeur de la déviation standard de la distribution de la radioactivité montre qu'il s'agit de molécules polymérisées. En dehors du pic, les valeurs de la radioactivité sont égales à celles d'un bruit de fond normal.

Les résultats de l'analyse des échantillons correspondant aux points 1-A et 2-A sont identiques.

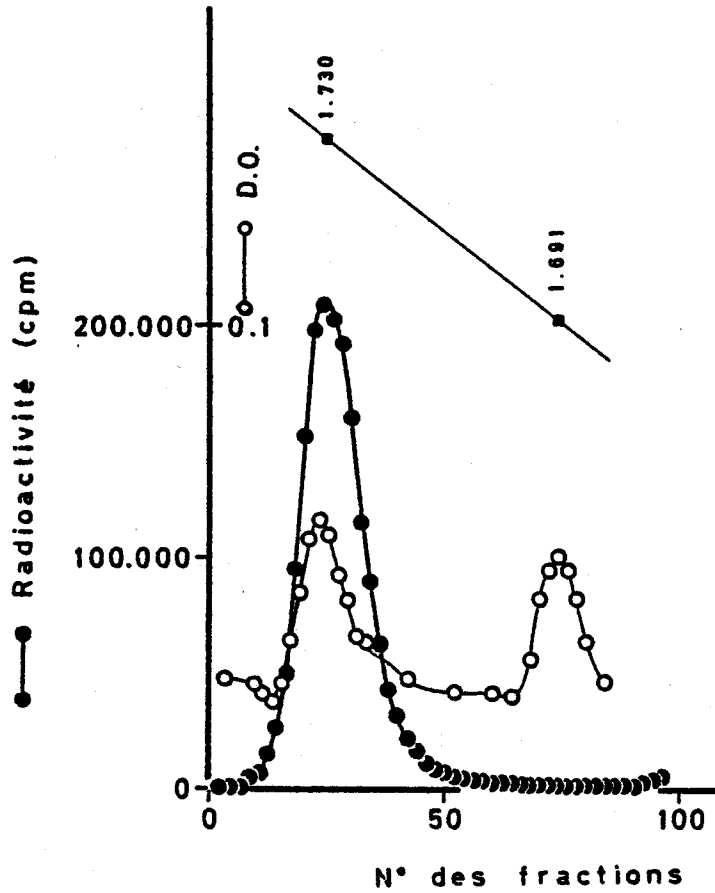


Fig. 51

Analyse en gradient de CsCl du milieu radioactif (contenant du DNA ³H de *S. flava*) après incubation avec les cellules d' *O. danica*.

Référence de densité : DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).



2. Analyse de la radioactivité du lysat cellulaire purifié

Au point 2-A ($2,2 \times 10^6$ cellules par ml). Les résultats de la purification du lysat des cellules d' *O. danica* par chromatographie sur gel d'agarose sont illustrés par la figure 52A (p. 141).

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 24 à 32 sont illustrés par la figure 52B (p. 141). Les molécules radioactives forment un pic équilibré autour d'un mode dont la position correspond à celle du DNA bactérien utilisé. La déviation standard du pic de distribution indique qu'il s'agit de molécules de faible poids moléculaire.

Au point 3-A ($4,99 \times 10^6$ cellules par ml). Les résultats de la filtration sur gel d'agarose du lysat cellulaire partiellement purifié sont illustrés par la figure 52C (p. 141).

Les résultats de l'analyse des fractions 28 à 33, correspondant au pic radioactif, sont illustrés par la figure 52D (p. 141). Les molécules radioactives sédimentent dans le gradient et se distribuent autour d'un mode dont la position correspond à celle du DNA bactérien utilisé. La déviation standard du pic de distribution indique qu'il s'agit de molécules de faible poids moléculaire.

b) Analyse des échantillons en fin de chasse (après 48 h de culture)

1. Analyse du milieu de culture après centrifugation des cellules

Les résultats de l'analyse d'une aliquote du surnageant acellulaire, de la culture de 48 h correspondant au point 1-B, sont illustrés par la figure 53 (p. 142). Les résultats de l'analyse des surnageants correspondant aux points 2-B et 3-B sont identiques à ceux-ci.

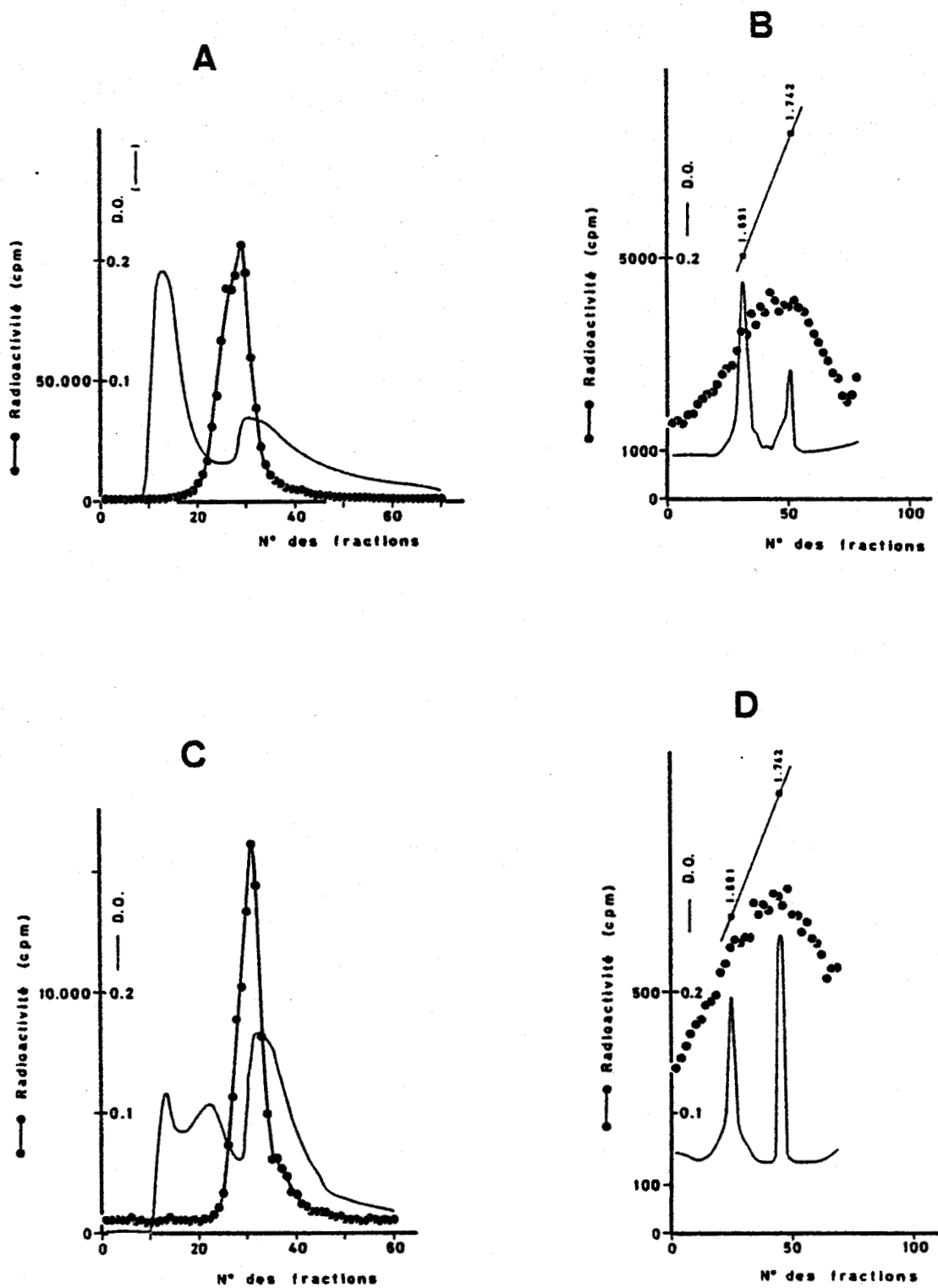


Fig. 52

Filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules d'*O. danica*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava*, échantillons correspondant au point 2-A (A), au point 3-A (C).

Analyse en gradient de CsCl

fig. 52B : fractions 24 à 32 de la fig. 52A

fig. 52D : fractions 28 à 33 de la fig. 52C

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm 3), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm 3).



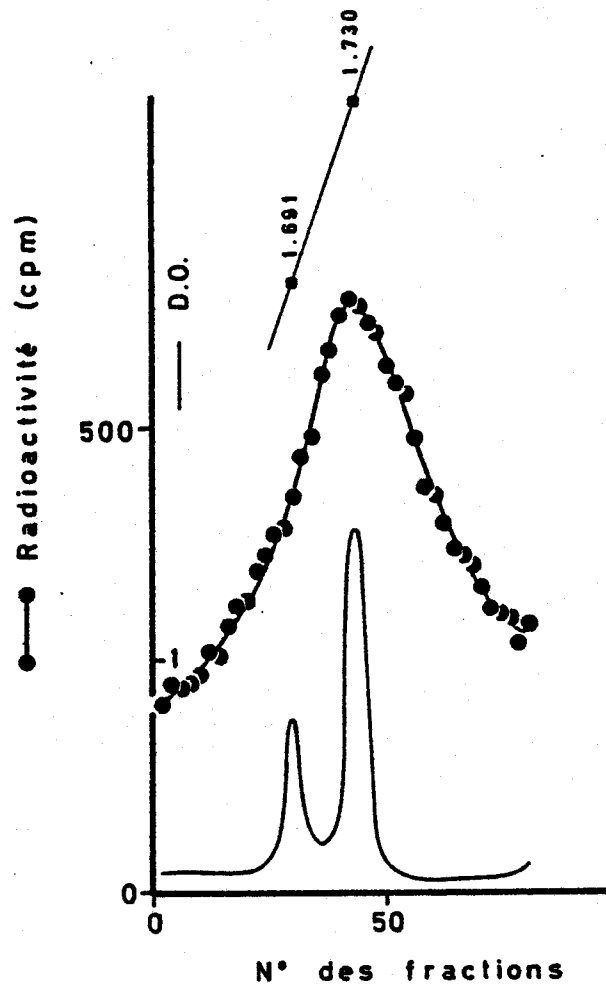


Fig. 53

Analyse en gradient de CsCl du surnageant acellulaire provenant de l'échantillon des cellules d' *O. danica*, incubées dans du milieu contenant du DNA ^3H de *S. flava* puis cultivées pendant 48 h dans un milieu contenant du DNA non-radioactif de *S. flava*.

Référence de densité : DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



Nous observons, à côté de molécules radioactives de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient en formant un bruit de fond important de 200 cpm environ sur tout le gradient, d'autres molécules qui sédimentent à une position correspondant à la densité de $1,730 \text{ g/cm}^3$, densité égale à celle du DNA bactérien utilisé. La déviation standard de la distribution indique qu'il s'agit de molécules de DNA dépolymérisé.

Par contre, le DNA non-radioactif de *S. flava*, ajouté au milieu de culture, sédimente dans le gradient et la déviation standard de la distribution des molécules absorbant en U.V. indique qu'il s'agit de DNA polymérisé.

Ces observations suggèrent qu'il n'y a que peu ou pas de nucléases dans le milieu et que la dépolymérisation du DNA radioactif aurait lieu à l'intérieur des cellules.

2. Analyse de la radioactivité du lysat cellulaire purifié

Au point 1-B. La concentration cellulaire était égale à $1,48 \times 10^5$ cellules par ml au début de la culture ; après 48 h, elle était égale à $7,8 \times 10^5$ cellules par ml, ce qui correspond à un peu plus de 2 générations.

La figure 54A(p.144) illustre les résultats de la purification par filtration sur gel d'agarose du lysat cellulaire. L'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 23 à 37, contenant le matériel radioactif, est illustrée par la figure 54B (p.144). On peut voir que la radioactivité se répartit sur tout le gradient et qu'elle est portée par des molécules de faible poids moléculaire.

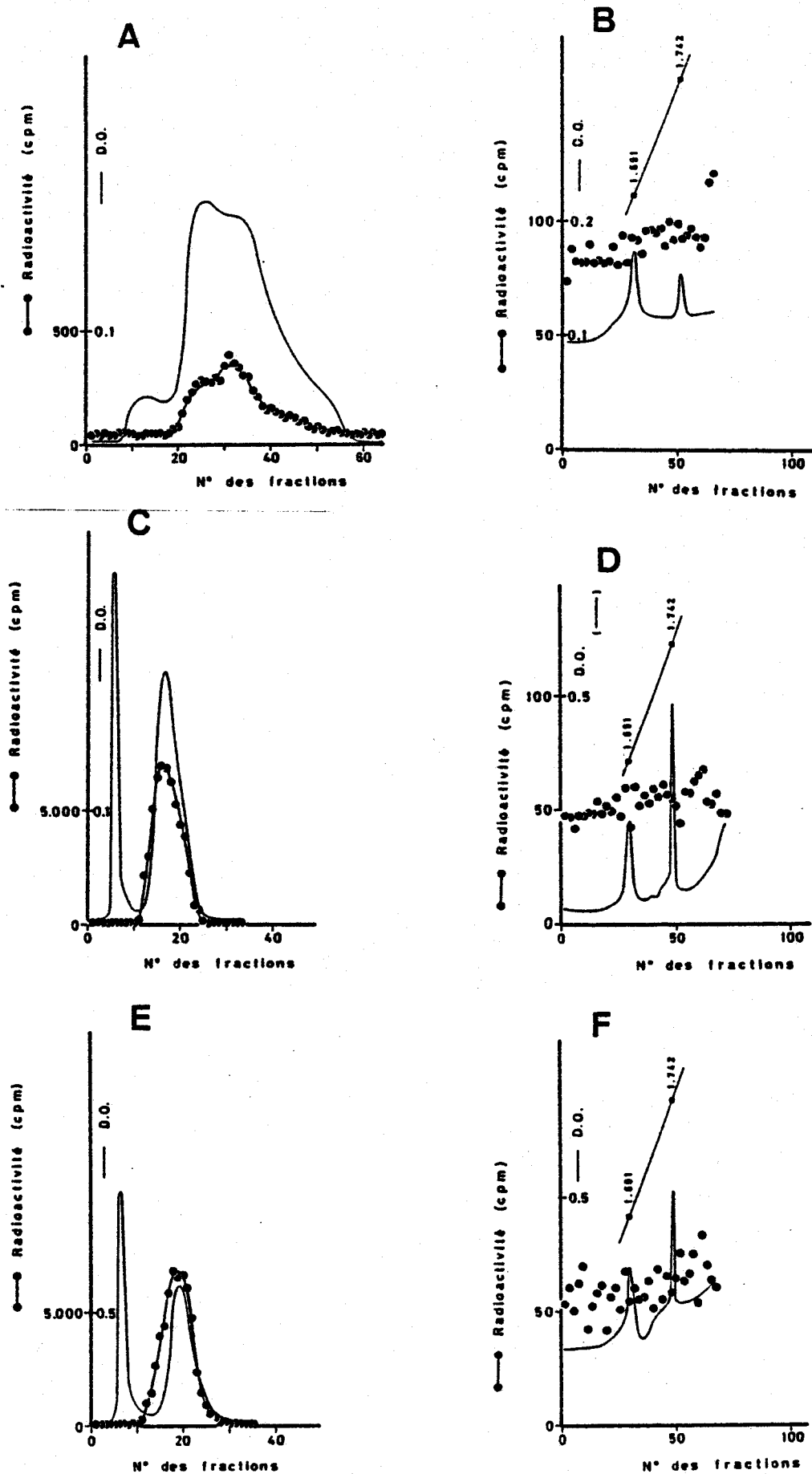


Fig. 54

Filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules d' *O. danica*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava* et puis culture pendant 48 h en présence de DNA non-radioactif de *S. flava*, échantillons correspondant au point 1-B (A), au point 2-B (C), au point 3-B (E).

Analyse en gradient de CsCl

Fig. 54B : fractions 23 à 37 de la fig. 54A

Fig. 54D : fractions 14 à 20 de la fig. 54C

Fig. 54F : fractions 16 à 22 de la fig. 54E

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).

Au point 2-B. La concentration cellulaire était égale à $2,2 \times 10^6$ cellules par ml au départ, elle était égale à $4,9 \times 10^6$ après 48 h de culture, ce qui correspond à une génération.

Les résultats de la filtration sur gel d'agarose du lysat cellulaire partiellement purifié sont illustrés par la figure 54C (p. 144). Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 14 à 20, correspondant au pic radioactif, sont illustrés par la figure 54D (p. 144). On peut voir que dans ce cas, la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire, qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Au point 3-B. L'analyse dans ce cas a été faite après une génération ; en effet, la concentration cellulaire, égale à $4,01 \times 10^6$ cellules par ml au départ, était égale à $7,7 \times 10^6$ cellules par ml après 48 h de culture.

Les résultats de la purification du lysat cellulaire par filtration sur gel d'agarose sont illustrés par la figure 54E (p. 144). La figure 54F (p. 144) illustre les résultats de l'analyse, par centrifugation en gradient de CsCl, des fractions 16 à 22 contenant les molécules radioactives. Nous constatons que dans ce cas, également, la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

4. CONCLUSIONS

1. C'est au début de la phase logarithmique de croissance que, dans nos conditions expérimentales, les cellules d'*O. danica* semblent prendre le mieux le DNA de *S. flava* exogène, sans toutefois qu'on puisse parler de "moment préférentiel de prise" ou de "phase de compétence."
2. L'analyse des échantillons prélevés en fin d'incubation avec le DNA tritié de *S. flava*, montre que la radioactivité est portée par des molécules qui ont en gradient de CsCl la même densité que celle du DNA bactérien utilisé.

L'examen de la distribution de cette radioactivité montre toutefois qu'il s'agit de molécules de faible poids moléculaire. La comparaison de cette distribution avec celle observée lors de l'analyse du milieu d'incubation avant l'expérience, permet une estimation grossière du poids moléculaire de ces molécules (P. CHARLES, 1972). La masse moléculaire du DNA tritié présent dans les cellules est environ 5 à 6 fois plus petite que celle du DNA tritié bactérien dans le milieu d'incubation.

L'analyse des échantillons après division des cellules (72 h de culture), montre qu'il n'y a plus de radioactivité sédimentable. Ceci semble vouloir dire que le DNA présent dans les cellules après 4 heures d'incubation en présence de DNA tritié bactérien, a été soit hydrolysé, soit rejeté dans le milieu extérieur.

L'analyse du milieu de culture, après centrifugation des cellules, nous permet de pencher pour la seconde hypothèse. En effet, les résultats montrent que ce milieu est radioactif et que la radioactivité est portée

par des molécules qui sédimentent dans le gradient de CsCl à une position correspondant à la densité du DNA bactérien utilisé. La distribution de cette radioactivité est très comparable à celle qui est observée lors de l'analyse dans les mêmes conditions de la radioactivité portée par les cellules en fin d'incubation avec le DNA tritié bactérien.

3. Il semble donc que du DNA de *S. flava* peut pénétrer dans les cellules d' *O. danica*. Cependant, ces molécules de DNA bactérien sont de faible poids moléculaire et sont rejetées par les cellules après division cellulaire.

III. Prise et sort de DNA radioactif bactérien chez les algues

D. *Polyedriella helvetica*

1. CHOIX D'UN MILIEU D'INCUBATION

Les cellules de *P. helvetica* ont été incubées pendant une heure soit dans du milieu de culture, pH 6,5 soit dans du tampon phosphate, pH 6,5 contenant du DNA tritié de *S. flava* (activité spécifique : 400 000 dpm/ μ g), à la concentration de 27 μ g/ml. Les cellules ont ensuite été incubées dans une solution de DNase et lavées soigneusement. Le matériel acido-insoluble, précipité au TCA froid, a été récupéré sur filtre et la radioactivité déterminée par comptage des filtres en scintillation liquide.

La radioactivité acido-précipitable est égale à 12 791 cpm lorsque les cellules ont été incubées dans le milieu de culture, tandis qu'elle est égale à 90 348 cpm lorsque l'incubation a lieu dans le tampon phosphate. Elle est donc environ 7 fois plus grande dans ce cas.

Dans nos expériences ultérieures, l'incubation des cellules a donc toujours été faite dans du tampon phosphate (pH : 6,5) contenant le DNA radioactif bactérien.

2. PRISE DE DNA RADIOACTIF BACTERIEN EN FONCTION DE LA CROISSANCE

A différents moments de la croissance, des aliquotes de la culture ont été prélevées ; les cellules ont été incubées avec 27 μ g/ml de DNA tritié de *S. flava* (radioactivité spécifique : 400 000 dpm/ μ g). Ces cellules ont ensuite été traitées comme indiqué dans le chapitre matériel

et méthodes (XII). Les résultats, rassemblés dans le tableau XV (p.150 et 151), sont illustrés par la figure 55 (p. 152).

Si l'on examine la quantité totale de radioactivité acido-insoluble, les valeurs les plus élevées sont observées après 39 et 207 heures de culture environ, soit au début et au milieu de la phase exponentielle de croissance.

Ces expériences ont été répétées plusieurs fois dans des conditions expérimentales semblables et des résultats comparables ont toujours été obtenus.

3. SORT D'UN DNA RADIOACTIF BACTERIEN

Au vu des résultats obtenus ci-dessus, nous avons étudié le sort d'un DNA radioactif de *S. flava* (radioactivité spécifique : 8×10^5 dpm/ μ g, poids moléculaire : 10×10^6 daltons), au trois moments de la phase exponentielle de croissance, où les quantités de radioactivité acido-précipitable étaient les plus élevées, au début, à une concentration cellulaire égale à $1,97 \times 10^5$ cellules/ml (point 1), au milieu, à des concentrations cellulaires égales à $3,41 \times 10^6$ (point 2) et finalement à $6,0 \times 10^6$ cellules/ml (point 3).

Les cellules ont été incubées pendant 4 heures dans du tampon phosphate contenant le DNA tritié bactérien à la concentration de 42 μ g/ml ; elles ont ensuite été centrifugées, lavées puis remises en suspension dans du milieu frais. Après prélèvement d'une aliquote (notée A), on a ajouté du DNA de *S. flava* non-radioactif (concentration : 28 μ g/ml) et la

TABLEAU XV

Etude de la prise de DNA ^3H de *S. flava* par *P. helvetica*, en quelques points de la courbe de croissance

	1	2	3	4	5	6	7
Point de la courbe (heures)	0	22	39,5	69	93	117	140,5
Nombre de cellules par ml $\times 10^{-5}$	1,0	2,0	3,9	8,1	9,5	11,0	15,0
Radioactivité dans le surnageant après incubation cpm totaux $\times 10^{-5}$	41,2	42,0	41,9	41,4	41,3	43,6	42,5
Radioactivité dans le surnageant après DNase cpm totaux	7898	8562	22 718	18 384	10 652	1552	8318
Radioactivité acido-soluble dans les cellules cpm totaux	3376	4438	9650	5690	3058	1872	2334
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules cpm totaux	6544	5416	12 934	8800	1090	1810	2968
Absorption à 258 nm de la fraction acido-insoluble unité D.O.	0,042	0,053	0,069	0,100	0,105	0,125	0,135
Radioactivité acido-insoluble par unité de D.O. cpm/D.O.	156 000	100 000	187 000	88 000	10 400	14 500	22 000
Radioactivité acido-insoluble par cellule cpm/cell.	0,0654	0,0271	0,0332	0,0109	0,00115	0,00165	0,00198

TABLEAU XV (suite)

	8	9	10	11	12	13	14
Point de la courbe (heures)	163,5	207,5	262	352,5	428,5	526	620
Nombre de cellules par ml $\times 10^{-5}$	17,0	23,0	29,5	77,5	83,0	150,0	115,0
Radioactivité dans le surnageant après incubation cpm totaux $\times 10^{-5}$	39,2	40,7	40,1	41,5	40,6	42,4	41,2
Radioactivité dans le surnageant après DNase cpm totaux	9076	5540	15 430	14 744	43 482	9602	11 582
Radioactivité acido-soluble dans les cellules cpm totaux	1974	6832	3110	7030	3063	2046	4568
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules cpm totaux	1818	5628	4376	6934	2814	2648	1516
Absorption à 258 nm de la fraction acido-insoluble, unité D.O.	0,139	0,162	0,226	0,258	0,367	0,455	0,335
Radioactivité acido-insoluble par unité de D.O. cpm/D.O.	13 100	34 700	19 400	26 900	7670	5800	4500
Radioactivité acido-insoluble par cellule cpm/cell.	0,00107	0,00245	0,00148	0,00089	0,00034	0,00018	0,00013



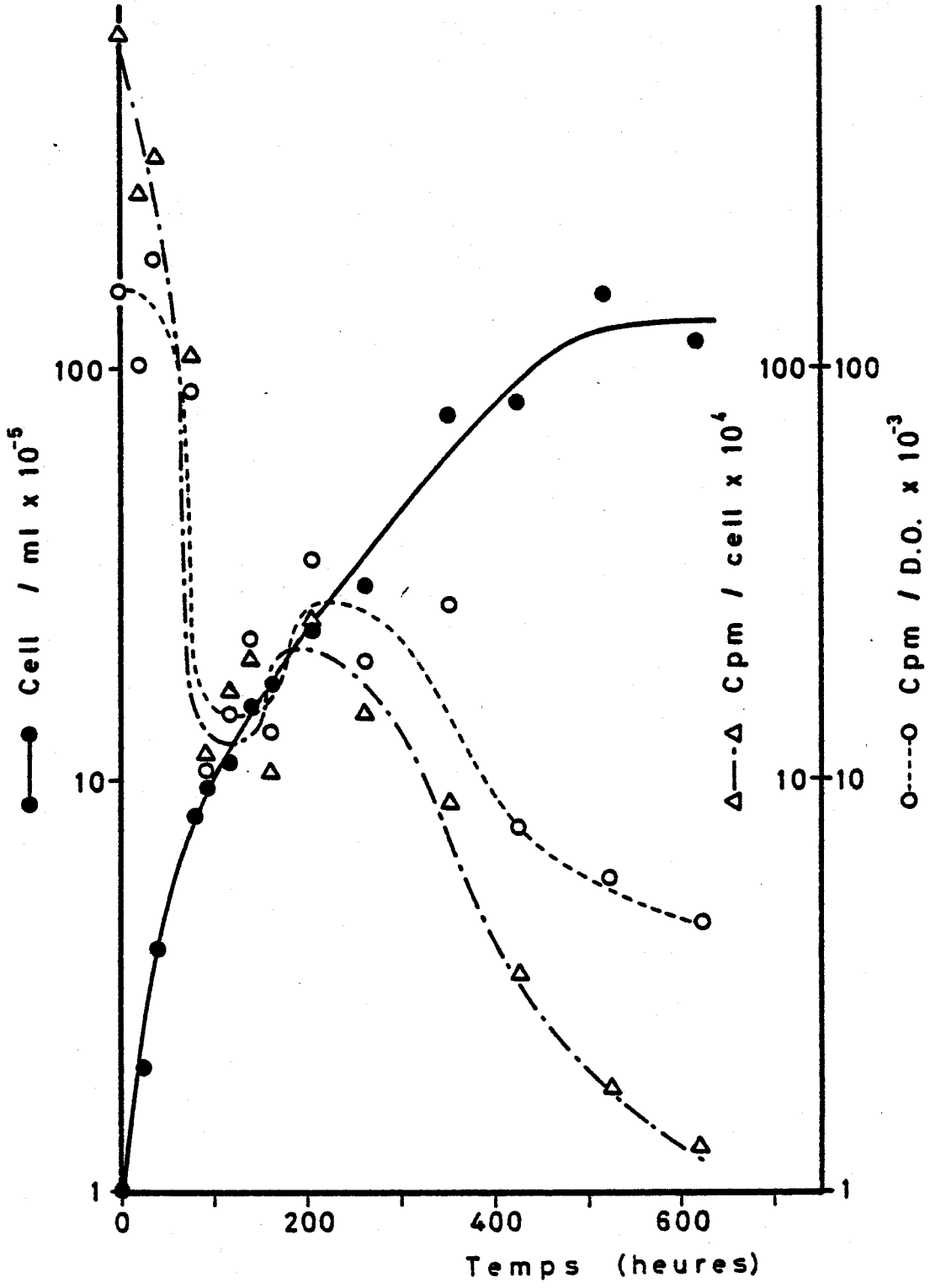


Fig. 55
Absorption de DNA³H de *S. flava* par les cellules de *P. helvetica* en fonction de la croissance.



culture a été poursuivie pendant 72 h. Après cette période de chasse, les cellules ont été centrifugées et le DNA a été extrait des cellules (comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes). Les analyses effectuées en fin de chasse ont été notées -B.

a) Analyse des échantillons prélevés en fin d'incubation avec le DNA radioactif bactérien

1. Analyse des surnageants

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du surnageant acellulaire correspondant au point 2-A, sont illustrés par la figure 56 (p. 154). La valeur de l'écart standard de la distribution de la radioactivité, qui superpose exactement celle de l'absorption en U.V., est normale et montre que le DNA bactérien n'a pas été dépolymérisé.

Des résultats identiques ont été obtenus avec les échantillons correspondant aux autres points (1-A et 3-A) de l'expérience.

2. Analyse de la radioactivité du lysat cellulaire purifié

Au point 1-A ($1,97 \times 10^5$ cellules par ml). La figure 57A (p. 155) illustre les résultats de la purification sur gel d'agarose du lysat des cellules.

Nous avons analysé par centrifugation en gradient de CsCl, les fractions 25 à 33, correspondant au pic radioactif. Les résultats montrent (figure 57B, p. 155) que la radioactivité est répartie sur tout le gradient et est portée par des molécules de très faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Au point 2-A ($3,41 \times 10^6$ cellules par ml). Les résultats de la filtration

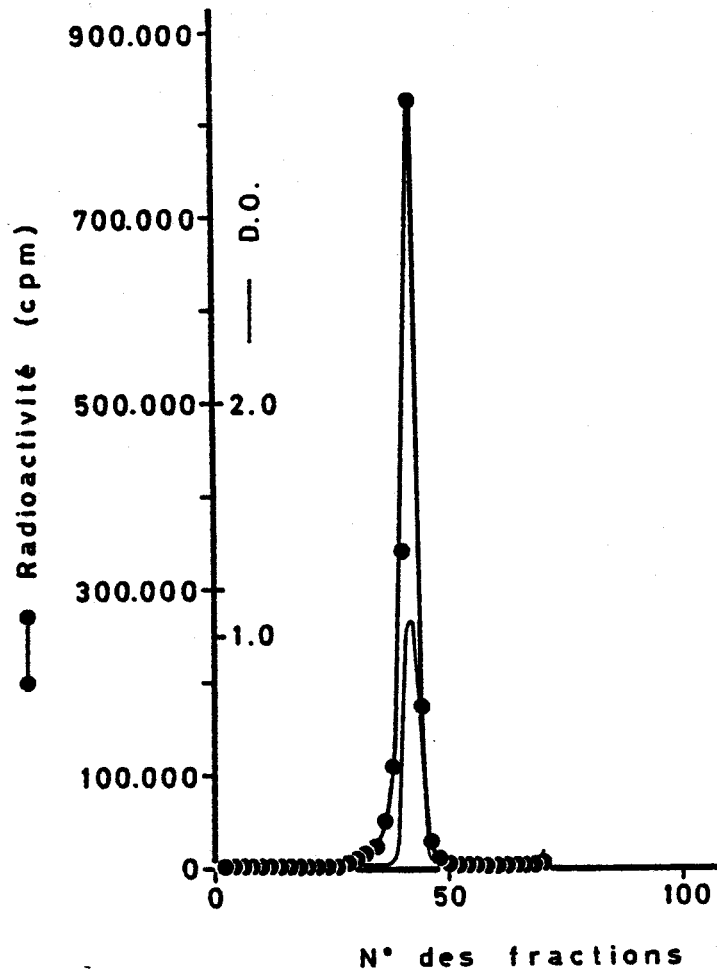


Fig. 56

Analyse en gradient de CsCl du milieu radioactif (contenant du DNA ^3H de *S. flava*) après incubation avec les cellules de *P. helvetica*.



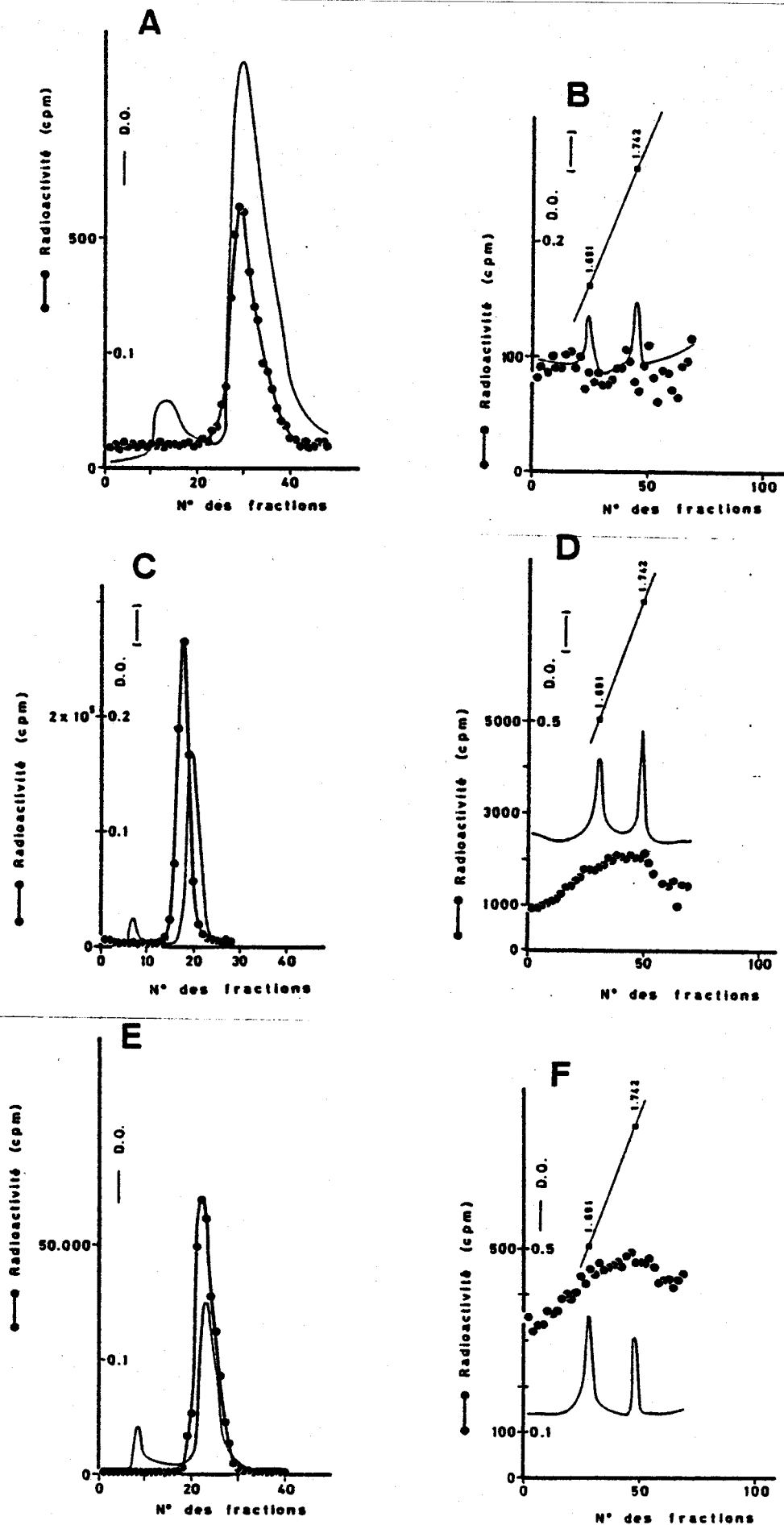


Fig. 57

Filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *P. helvetica*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava*, échantillons correspondant au point 1-A (A), au point 2-A (C), au point 3-A (E).

Analyse en gradient de CsCl

Fig. 57B : fractions 25 à 33 de la fig. 57A

Fig. 57D : fractions 16 à 20 de la fig. 57C

Fig. 57F : fractions 19 à 25 de la fig. 57E.

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).

moléculaire sur gel d'agarose du lysat cellulaire partiellement purifié sont illustrés par la figure 57C (p. 155).

Les résultats de l'analyse des fractions 16 à 20, correspondant au pic radioactif sont illustrés par la figure 57D (p.155). Dans ce cas, la courbe de distribution de la radioactivité est très large et hétérogène. La radioactivité est portée par des molécules dépolymérisées dont il est difficile d'estimer la densité.

Au point 3-A ($6,0 \times 10^6$ cellules par ml). Le lysat des cellules a été purifié par filtration sur gel d'agarose et les résultats obtenus sont illustrés par la figure 57E (p.155).

Les fractions 19 à 25 ont été analysées par centrifugation en gradient de CsCl. L'analyse des résultats obtenus, illustrés par la figure 57F (p. 155), montre que les molécules radioactives sédimentent en formant une distribution très large dans le gradient. Il s'agit dans ce cas de molécules dépolymérisées dont il est difficile d'estimer la densité.

b) Analyse des échantillons en fin de chasse (après 72 h de culture)

1. Analyse des surnageants

La figure 58 (p. 157) illustre les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du surnageant acellulaire, correspondant à l'échantillon du point 2-B.

Nous remarquons que la courbe de distribution de la radioactivité est très large et que les molécules radioactives sont de très faible poids

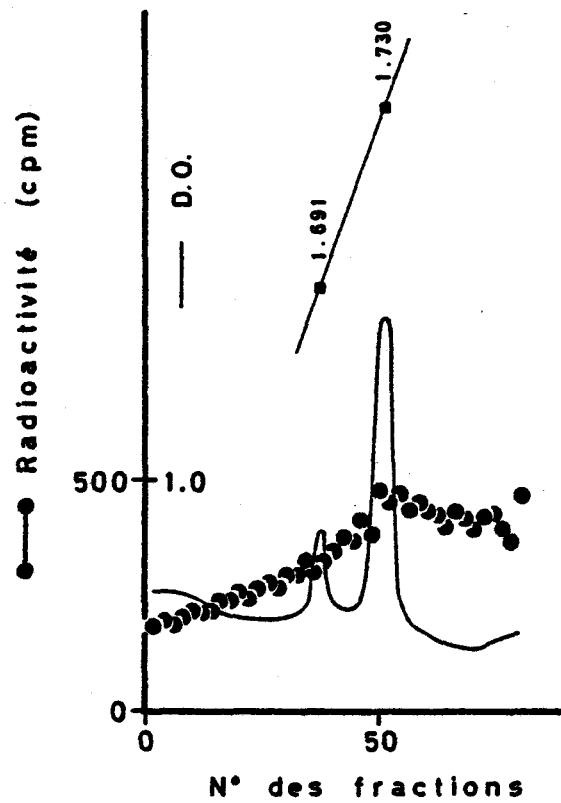


Fig. 58

Analyse en gradient de CsCl du surnageant acellulaire provenant de l'échantillon des cellules de *P. helvetica* incubées dans du milieu contenant du DNA ^3H de *S. flava* puis cultivées pendant 72 h dans du milieu contenant du DNA non-radioactif de *S. flava*.
 Référence de densité : DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



moléculaire. Par contre, le DNA non-radioactif de *S. flava* ajouté au milieu pendant la période de chasse sédimente dans le gradient en formant une distribution dont la déviation standard montre qu'il s'agit de molécules polymérisées, ce qui suggère qu'il n'y a pas ou peu de nucléases dans le milieu, ce qui suggère également que l'hydrolyse du DNA radioactif aurait eu lieu à l'intérieur des cellules plutôt que dans le milieu d'incubation.

Nous avons obtenu des résultats analogues lors de l'analyse des échantillons correspondant aux autres points de l'expérience (1-B et 3-B).

2. Analyse de la radioactivité du lysat cellulaire purifié

Au point 1-B. Dans ce cas, les cellules se sont divisées trois fois ; au début de l'expérience, la concentration cellulaire était égale à $1,95 \times 10^5$ cellules par ml, elle était de $8,15 \times 10^5$ cellules par ml en fin d'expérience.

La figure 59A(p. 159) illustre les résultats de la purification par filtration sur colonne de Sepharose 4B du lysat cellulaire. Les fractions 21 à 38 ont été analysées par centrifugation en gradient de CsCl ; les résultats sont illustrés par la figure 59B (p. 159). Nous voyons que les molécules radioactives sont de faible poids moléculaire et ne sédimentent pas dans le gradient.

Au point 2-B. La concentration cellulaire, égale au départ à $3,41 \times 10^6$ cellules par ml, était égale à $7,4 \times 10^6$ cellules par ml après les 72 h de culture. Les cellules se sont donc divisées deux fois.

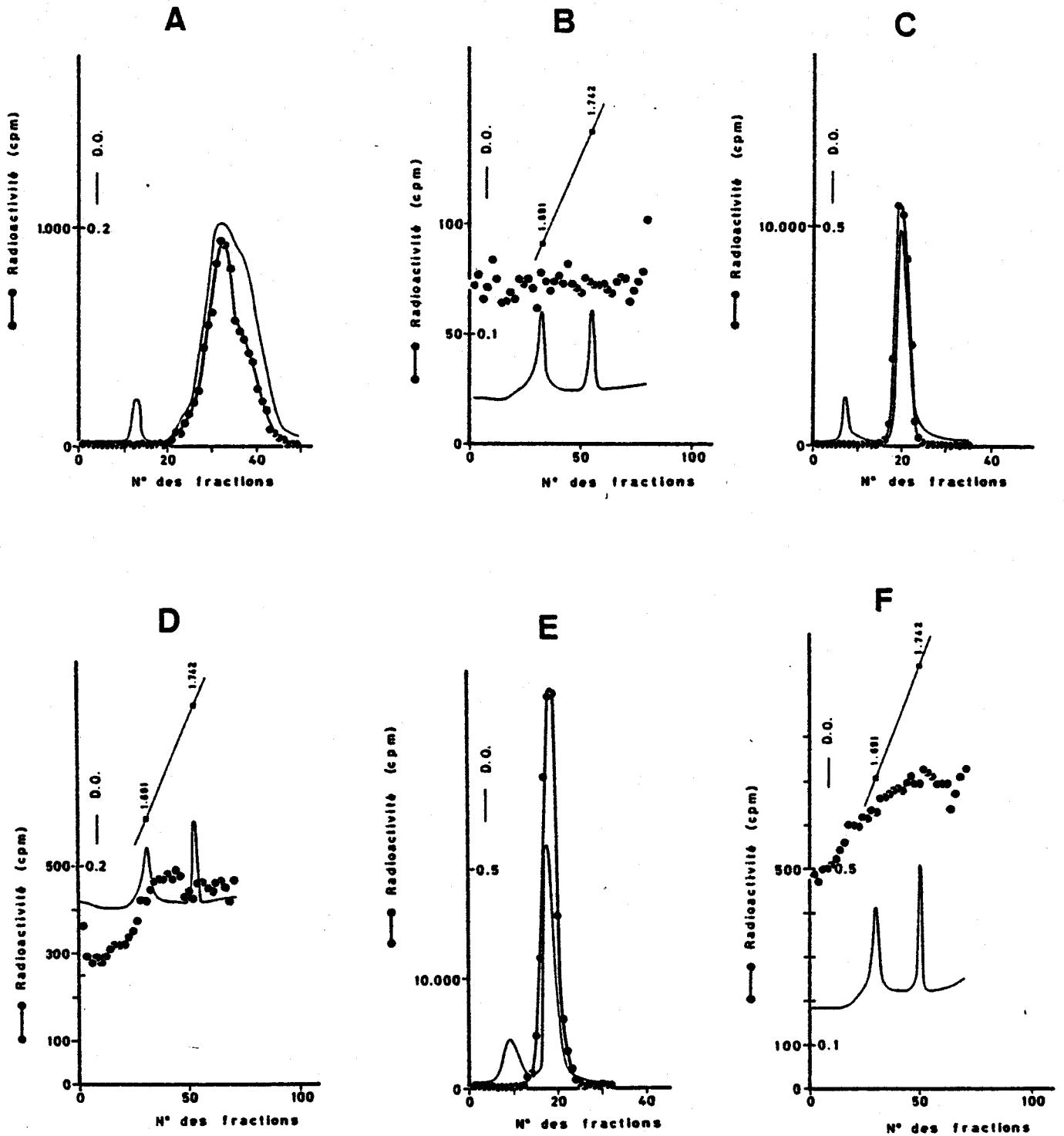


Fig. 59

Filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *P. helvetica*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava* et puis culture pendant 72 h en présence de DNA non-radioactif de *S. flava*, échantillons correspondant au point 1-B (A), au point 2-B (C), au point 3-B (E).

Analyse en gradient de CsCl

Fig. 59B : fractions 21 à 38 de la fig. 59A

Fig. 59D : fractions 18 à 28 de la fig. 59C

Fig. 59F : fractions 16 à 21 de la fig. 59E.

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



La figure 59C (p. 159) illustre les résultats de la purification par filtration sur gel d'agarose du lysat cellulaire. Les fractions 18 à 28, contenant les molécules radioactives, ont été analysées par centrifugation en gradient de CsCl. Les résultats sont illustrés par la figure 59D (p. 159). On voit que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Au point 3-B. Dans ce cas, toutes les cellules n'ont pas eu le temps de se diviser une fois, car nous avons une concentration cellulaire au départ égale à $6,0 \times 10^6$ cellules par ml, et égale à $8,7 \times 10^6$ cellules par ml en fin d'expérience (après 72 h de culture).

Le lysat cellulaire a été purifié par filtration sur gel d'agarose et les résultats sont illustrés par la figure 59E (p. 159). Les fractions 16 à 21, correspondant au pic radioactif, ont été analysées par centrifugation en gradient de CsCl. Nous voyons (figure 59F ,p. 159) que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

4. CONCLUSIONS

1. Il semble qu'on puisse dire que, durant la phase exponentielle de croissance des cellules de *P. helvetica*, il existe deux moments préférentiels de prise de DNA tritié de *S. flava*. Le premier au début de la culture, le second au milieu de la phase de croissance. C'est à ces moments qu'on observe la plus grande quantité de radioactivité portée par du matériel acido-insoluble fixé aux cellules.
2. L'analyse de ce matériel acido-insoluble radioactif, par centrifugation en gradient de CsCl, montre que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire dont la densité est difficile à déterminer.

Lorsque les cellules, incubées dans un milieu contenant du DNA radioactif de *S. flava* pendant 4 heures, sont ensuite remises en culture dans du milieu non-radioactif, l'analyse par ultra centrifugation en gradient de CsCl montre que la radioactivité est portée par des molécules de très faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

3. Dans nos conditions expérimentales, nous ne trouvons donc pas de molécules de DNA de *S. flava* dans les cellules de *P. helvetica*.

III. Prise et sort de DNA bactérien chez les algues

E. *Porphyridium cruentum*

1. CHOIX D'UN MILIEU D'INCUBATION

Les cellules de *P. cruentum* ont été incubées soit dans le milieu de culture (pH : 7,3), soit dans du tampon phosphate (pH : 7,3), contenant du DNA radioactif de *S. flava* ATCC 540 (radioactivité spécifique : 4×10^5 dpm/ μ g) à la concentration de 27 μ g/ml.

Les résultats de l'absorption du DNA bactérien ont été comparés : la radioactivité acido-précipitable, égale à 130 600 cpm lorsque l'incubation a lieu dans le milieu de culture, était égale à 150 600 cpm lorsque l'incubation a lieu dans le tampon phosphate. Les résultats ne sont donc pas très différents.

C'est le tampon phosphate qui a été utilisé pour nos expériences ultérieures.

2. PRISE DE DNA BACTERIEN EN FONCTION DU CYCLE CELLULAIRE

Il est possible de synchroniser les cellules de *P. cruentum* lorsque les cultures sont soumises à des alternances de périodes de 10 h de lumière (L) et de 10 h d'obscurité (O) et lorsque la concentration cellulaire est égale à environ $1-2 \times 10^6$ cellules par ml au début de la période de lumière (GENSE et al., 1969).

Des aliquotes de culture ont été prélevées à différents moments du cycle (toutes les 2 h) et après centrifugation, les cellules ont été incubées

pendant 4 h dans du tampon phosphate contenant du DNA tritié de *S. flava* (radioactivité spécifique : 4×10^5 dpm/ μ g), à la concentration de 30 μ g/ml. Le matériel a ensuite été traité comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes (XII).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XVI (p.164) et sont illustrés par la figure 60 (p.165).

Nous constatons qu'il existe apparemment deux moments préférentiels de prise de DNA bactérien, l'un situé au milieu de la phase L (de non-division cellulaire), l'autre situé aux environs du premier tiers de la phase O (de division cellulaire). C'est à ces moments que les valeurs de la radioactivité des fractions acido-précipitables sont les plus élevées (tableau XVI, p. 164).

Les expériences ont été répétées plusieurs fois dans des conditions semblables, et des résultats analogues ont toujours été obtenus.

3. ETUDE DE LA PRISE ET DU SORT D'UN DNA BACTERIEN PAR LES CELLULES

Suite aux résultats reportés ci-dessus, nous avons étudié la prise et le sort d'un DNA tritié bactérien par des cellules se trouvant soit au milieu de la phase L, à une concentration cellulaire égale à $2,8 \times 10^6$ cellules par ml (point 1), soit au premier tiers de la phase O, à une concentration cellulaire égale à $3,25 \times 10^6$ cellules par ml (point 2).

Les cellules ont été incubées à la lumière pour le point 1 (phase L) et à l'obscurité pour le point 2 (phase O), pendant 4 h dans du tampon phosphate contenant du DNA radioactif de *S. flava* à la concentration de

TABLEAU XVI

Résultats de l'étude de la prise de DNA tritié de *S. flava* par *P. cruentum*, à différents moments du cycle cellulaire

Point (phase)	1 (L)	2 (L)	3 (L)	4 (L)	5 (L)	6 (O)	7 (O)	8 (O)	9 (O)	10 (O)
Nombre d'heures après le début de la culture	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
Nombre de cellules par ml $\times 10^{-6}$	1,9	1,9	1,8	1,75	1,9	2,05	2,40	2,60	3,00	3,20
Radioactivité dans le surnageant après incubation cpm tot. $\times 10^{-6}$	10,8	9,0	9,2	10,2	8,9	9,0	9,7	10,5	9,6	10,8
Radioactivité dans le surnageant après DNase cpm tot. $\times 10^{-4}$	5,8	7,2	7,9	2,4	2,3	2,4	4,1	4,0	4,4	5,8
Radioactivité acido-soluble dans les cellules cpm totaux	8070	13 470	8380	9570	10 860	11 370	15 460	11 950	9390	6945
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules, cpm totaux	7080	17 330	14 320	20 580	13 280	15 540	52 240	20 640	24 780	17 810
Absorption à 258 nm de la fraction acido-insoluble unité D.O.	0,095	0,112	0,102	0,129	0,164	0,129	0,171	0,127	0,123	0,137
Radioactivité acido-insoluble par unité de D.O. cpm/D.O.	74 500	155 000	140 000	159 000	81 000	120 000	305 000	163 000	201 000	130 000
Radioactivité acido-insoluble par cellule cpm/cell.	0,00373	0,00912	0,00796	0,01176	0,00695	0,00758	0,02177	0,00794	0,00826	0,00557



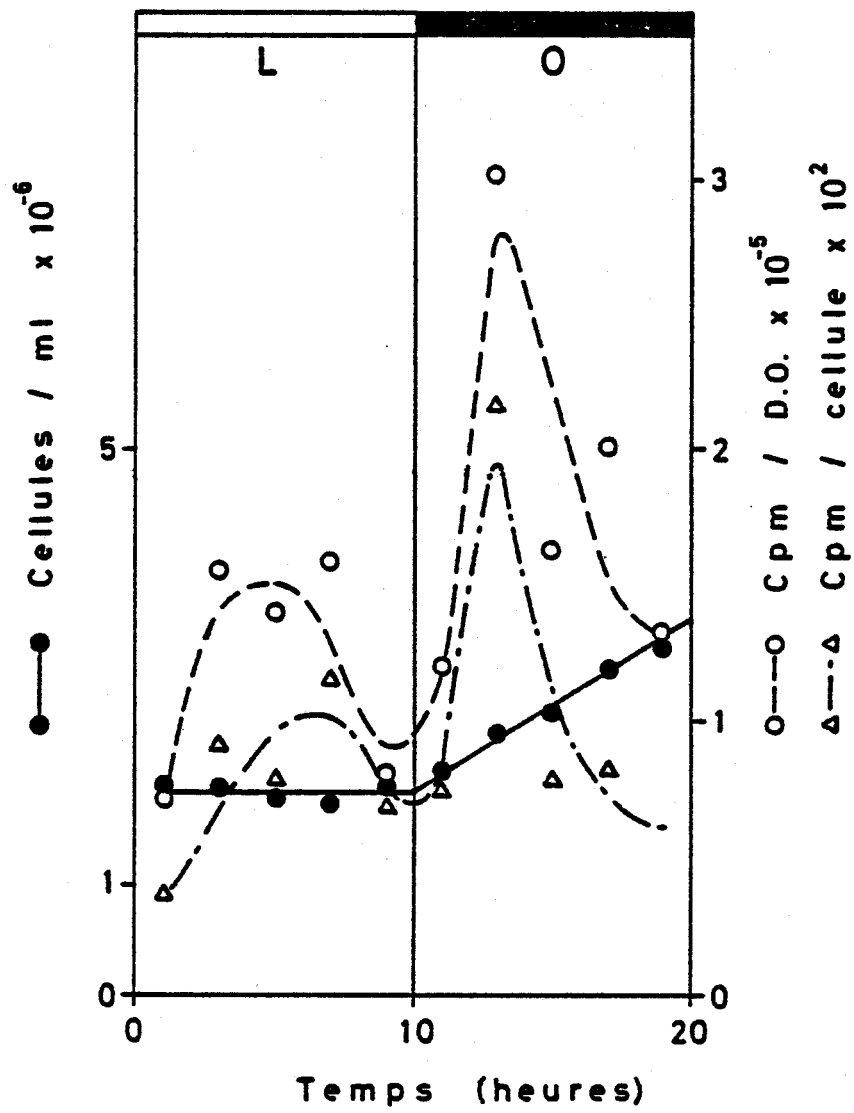


Fig. 60

Absorption de DNA ^3H de *S. flava* par les cellules de *P. cruentum* en fonction du cycle cellulaire.



de 40 µg/ml (radioactivité spécifique : 8×10^5 dpm/µg, poids moléculaire : 10×10^6 daltons). Ensuite, les cellules ont été lavées puis remises en suspension dans du milieu de culture.

Après prélèvement d'une aliquote (pour une analyse notée A), du DNA non-radioactif de *S. flava* (concentration : 30 µg/ml) et la culture a été poursuivie pendant 48 h avec des alternances de périodes de lumière et de périodes d'obscurité. L'analyse faite à la fin de cette chasse a été notée B.

Le DNA des différents échantillons a été extrait des cellules par le procédé décrit dans le chapitre matériel et méthodes (VI.B.2.), et analysé par centrifugation en gradient de CsCl.

a) Analyse des échantillons prélevés en fin d'incubation

1. Analyse des surnageants

La figure 61A (p. 167) illustre les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du surnageant d'incubation acellulaire, correspondant au point 2-A (phase 0). On peut voir que le DNA radioactif bactérien a été peu ou pas modifié pendant l'incubation avec les cellules ; en effet, la valeur de l'écart standard de la courbe de distribution de la radioactivité, qui superpose parfaitement la courbe de distribution des valeurs de l'absorption en U.V., est tout à fait comparable à celle observée lors de l'analyse du DNA polymérisé de *S. flava* avant l'incubation avec les cellules (figure 61B, p. 167).

Les résultats de l'analyse du surnageant acellulaire correspondant

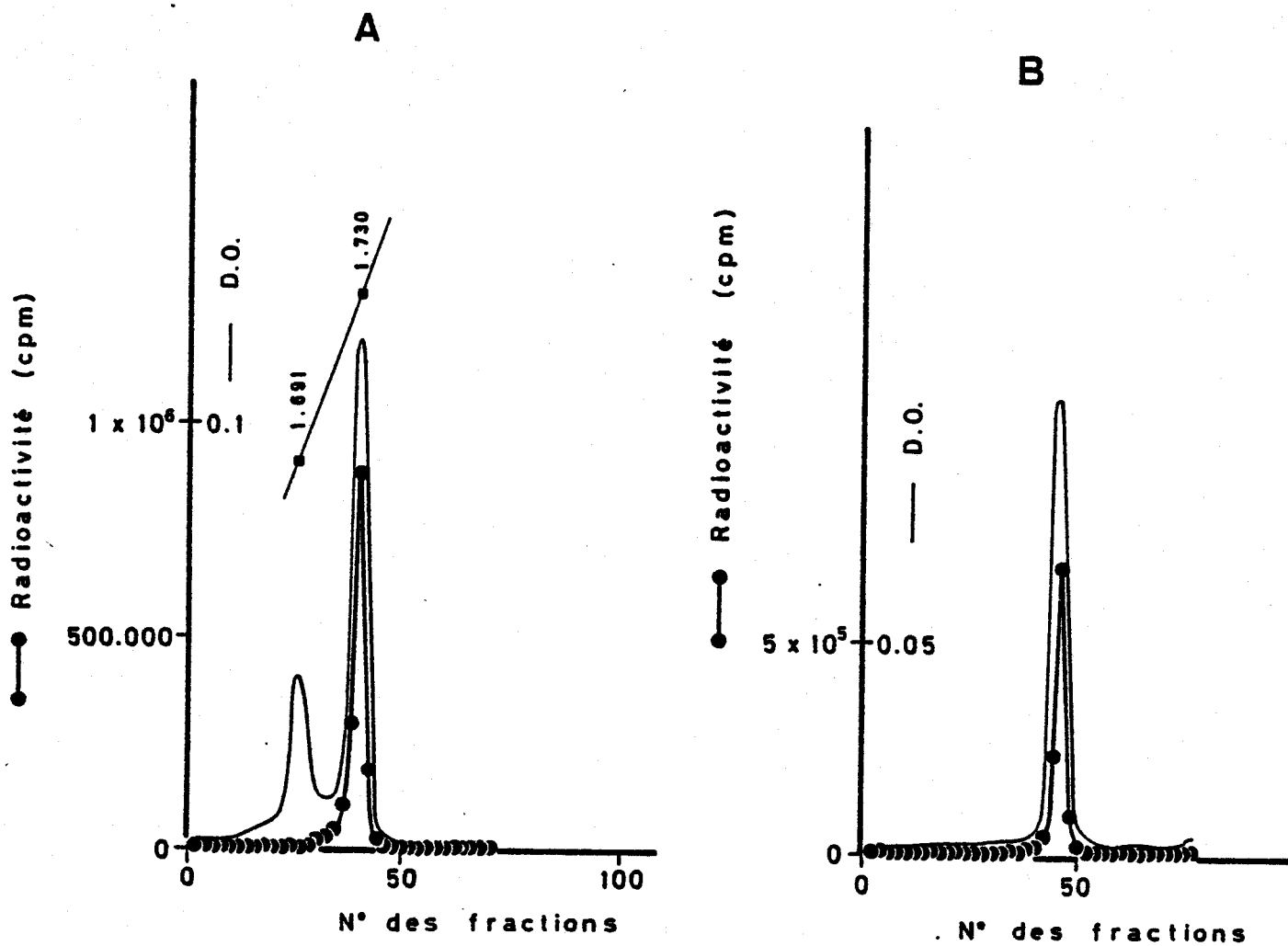


Fig. 61

Analyse en gradient de CsCl des milieux radioactifs (contenant du DNA ³H de *S. flava*) avant (B) et après (A) incubation avec les cellules de *P. cruentum*.
 Référence de densité : DNA de *C. perfringens* (1,691 g/cm³).

au point 1-A (phase L) sont identiques à ceux trouvés pour le point 2-A.

2. Analyse de la radioactivité du lysat cellulaire purifié

Echantillon correspondant au point 1-A ($2,8 \times 10^6$ cellules par ml). Les résultats de la purification du lysat cellulaire par filtration sur gel d'agarose sont illustrés par la figure 62A (p. 169). De la radioactivité est observée dans les fractions contenant les molécules exclues du gel.

Les résultats de l'analyse (par centrifugation en gradient de CsCl) des fractions 10 à 16, correspondant à ce premier pic, sont illustrés par la figure 62B (p. 169). On peut voir que les molécules radioactives sédi-mentent, dans le gradient à une position correspondant à une densité qui est égale à celle du DNA bactérien utilisé ($1,731 \text{ g/cm}^3$).

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 26 à 37, correspondant au 2^{ième} pic (figure 62A, p. 169) sont illustrés par la figure 62C (p. 169). On peut observer que la radio-activité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Echantillon correspondant au point 2-A ($3,25 \times 10^6$ cellules par ml). La figure 63A (p. 170) illustre les résultats de la purification par filtra-tion sur gel d'agarose du lysat cellulaire. Ici également, de la radio-activité est observée dans les fractions contenant le DNA et constituant le 1^{er} pic.

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 11 à 16 sont illustrés par la figure 63B (p. 170). Ils

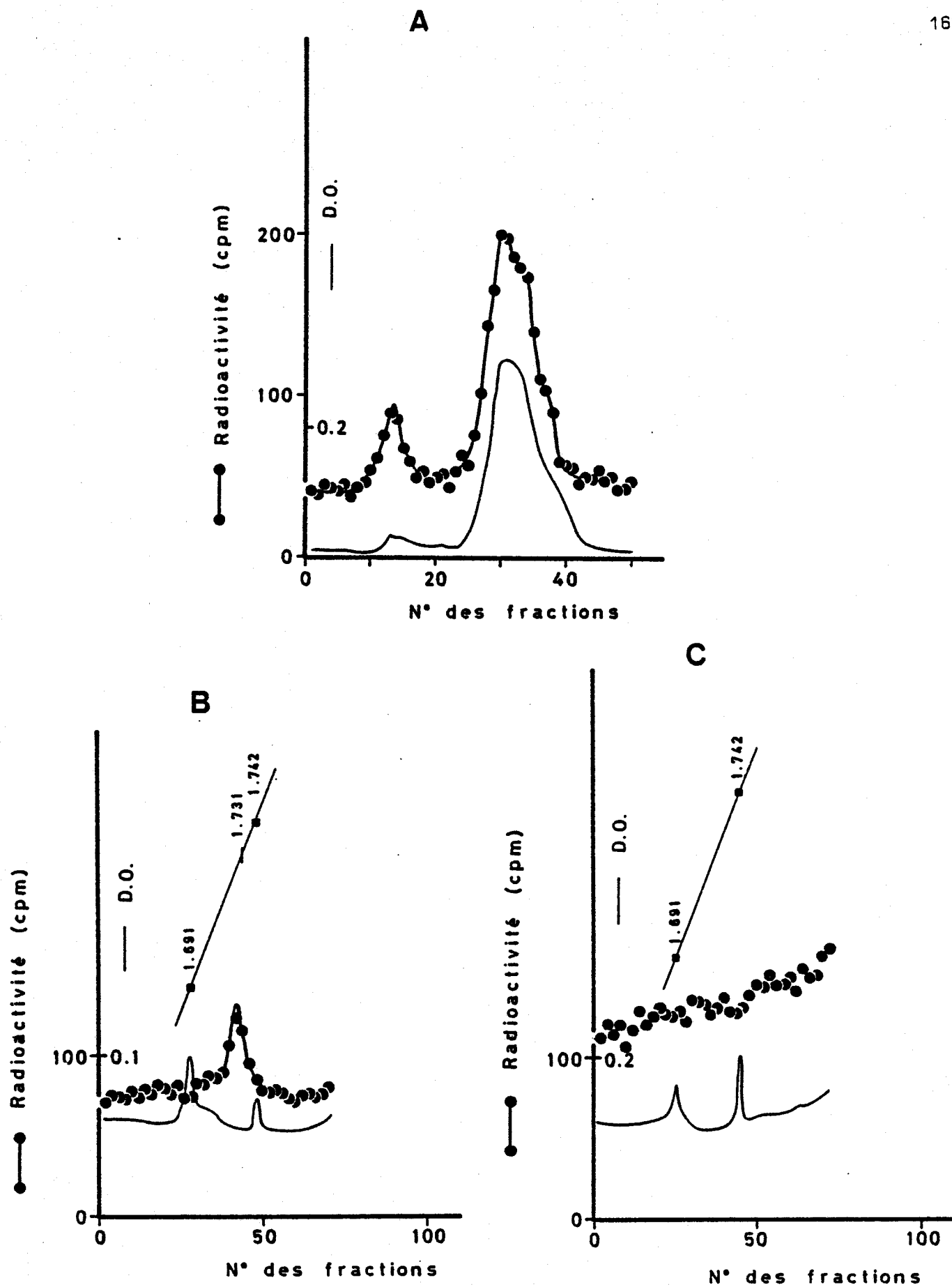


Fig. 62

Fig. 62A : filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *P. cruentum*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava*, échantillon correspondant au point 1-A.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 10 à 16 (B) et des fractions 26 à 37 (C).

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



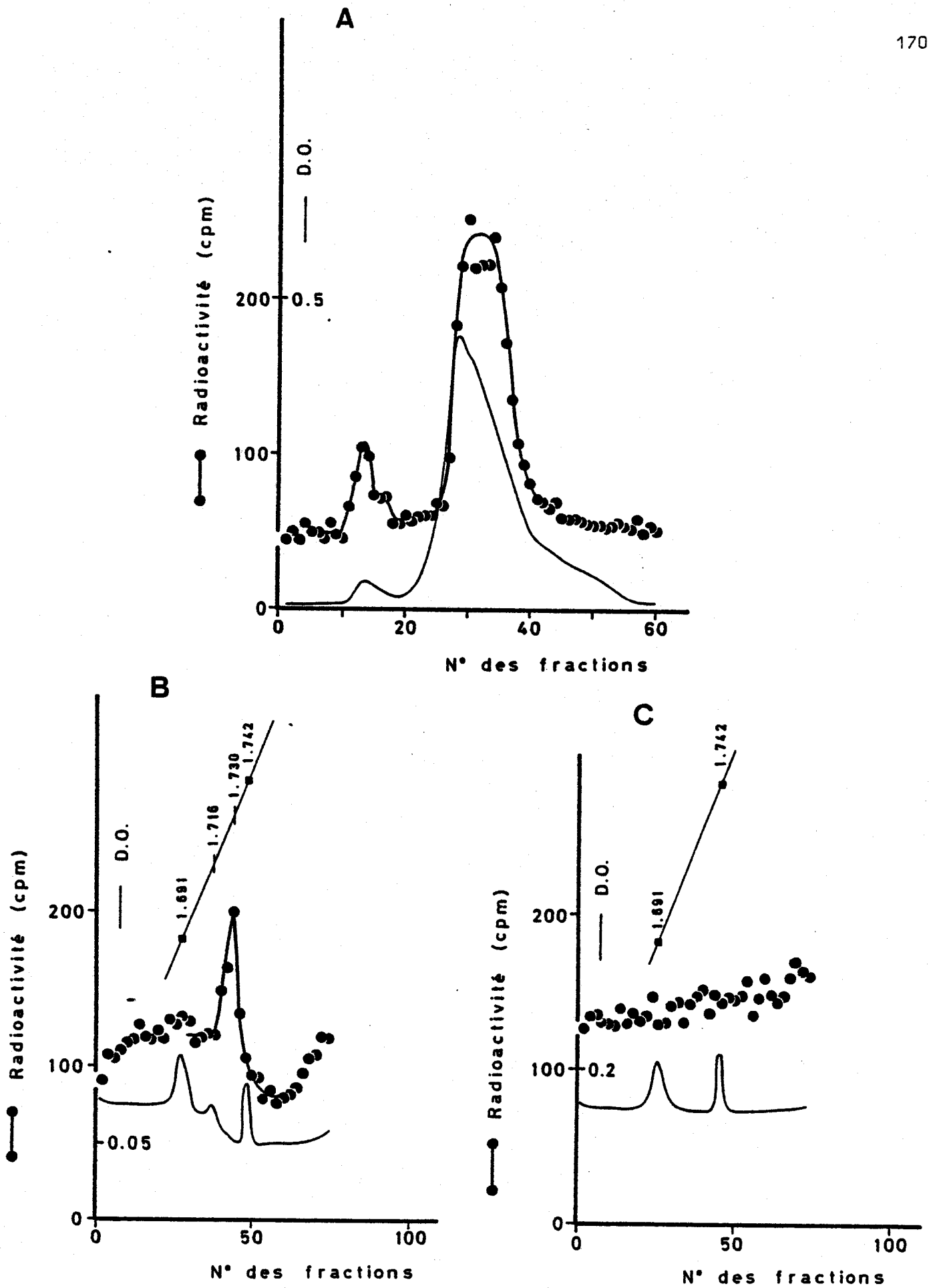


Fig. 63

Fig. 63A : filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *P. cruentum*, après incubation avec du DNA ³H de *S. flava*, échantillon correspondant au point 2-A.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 11 à 16 (B) et des fractions 28 à 36 (C).

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).



nous montrent que les molécules radioactives sédimentent dans le gradient à une position correspondant à une densité qui est égale à celle du DNA bactérien utilisé ($1,730 \text{ g/cm}^3$). En absorption U.V., à côté du pic correspondant au DNA utilisé comme marqueur de densité (DNA de *Cl. perfringens*, $d = 1,691 \text{ g/cm}^3$), on peut observer le pic correspondant aux molécules de DNA de l'algue ($d = 1,716 \text{ g/cm}^3$).

La figure 63C (p. 170) illustre les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 28 à 36, correspondant au 2^{ième} pic de la figure 63A (p. 170). On peut voir que la radioactivité se répartit sur tout le gradient et est portée par des molécules de faible poids moléculaire non-sédimentables.

b) Analyse des échantillons en fin de chasse (après 48 h de culture)

1. Analyse des surnageants

Les résultats de l'analyse par ultracentrifugation en gradient de CsCl du surnageant après centrifugation des cellules, correspondant au point 2-B, sont illustrés par la figure 64 (p. 172).

Nous remarquons que la radioactivité est répartie sur tout le gradient et est portée par des molécules de faible poids moléculaire. D'autre part, les molécules de DNA non-radioactif de *S. flava* ($d = 1,730 \text{ g/cm}^3$) ajouté dans le milieu de culture, ont été peu ou pas modifiées ; la valeur de l'écart standard de la courbe de distribution est en effet normale.

Des résultats identiques ont été obtenus lors de l'analyse du surnageant correspondant au point 1-B.

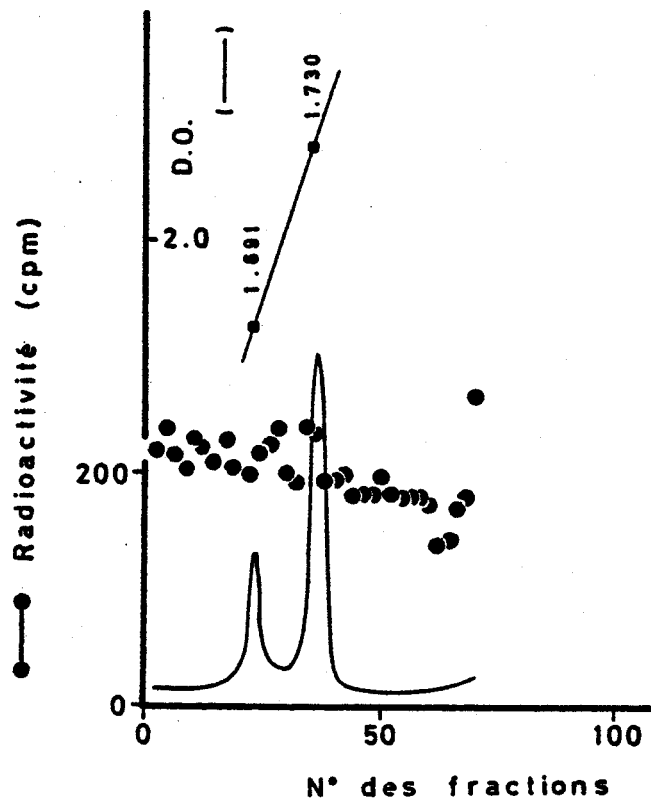


Fig. 64

Analyse en gradient de CsCl du surnageant acellulaire provenant de l'échantillon des cellules de *P. cruentum* incubées dans du milieu contenant du DNA ^3H de *S. flava* puis cultivées pendant 48 h dans du milieu contenant du DNA non-radioactif de *S. flava*.
 Référence de densité : DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



2. Analyse de la radioactivité du lysat cellulaire purifié

Echantillon correspondant au point 1-B. Partis d'une culture contenant 2,80 cellules par ml, nous avons obtenu en fin d'expérience (après 48 h) une concentration cellulaire égale à 4,41 cellules par ml. Les cellules se sont donc presque toutes divisées une fois.

Les résultats de la purification par filtration sur colonne d'agarose du lysat cellulaire sont illustrés par la figure 65A (p. 174). Dans les fractions 7 et 8, contenant le matériel de haut poids moléculaire exclu du gel, nous observons de la radioactivité.

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl de ces fractions sont illustrés par la figure 65B (p. 174). On peut voir que la radioactivité est portée par des molécules qui sédimentent dans le gradient à la densité du DNA bactérien utilisé ($1,730 \text{ g/cm}^3$). En absorption U.V., on observe le pic correspondant au DNA de l'algue dont la densité est égale à $1,716 \text{ g/cm}^3$, et celui correspondant au DNA de *Cl. perfringens* utilisé comme référence de densité.

Les résultats de l'analyse des fractions 16 à 22 correspondant au second pic de la figure 65A (p. 174), sont illustrés par la figure 65C (p. 174). Nous remarquons que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Echantillon correspondant au point 2-B. Les cellules se sont presque toutes divisées une fois. En effet, la concentration cellulaire, égale au départ à 3,25 cellules par ml, était égale à 6,23 cellules par ml (après 48 h de culture).

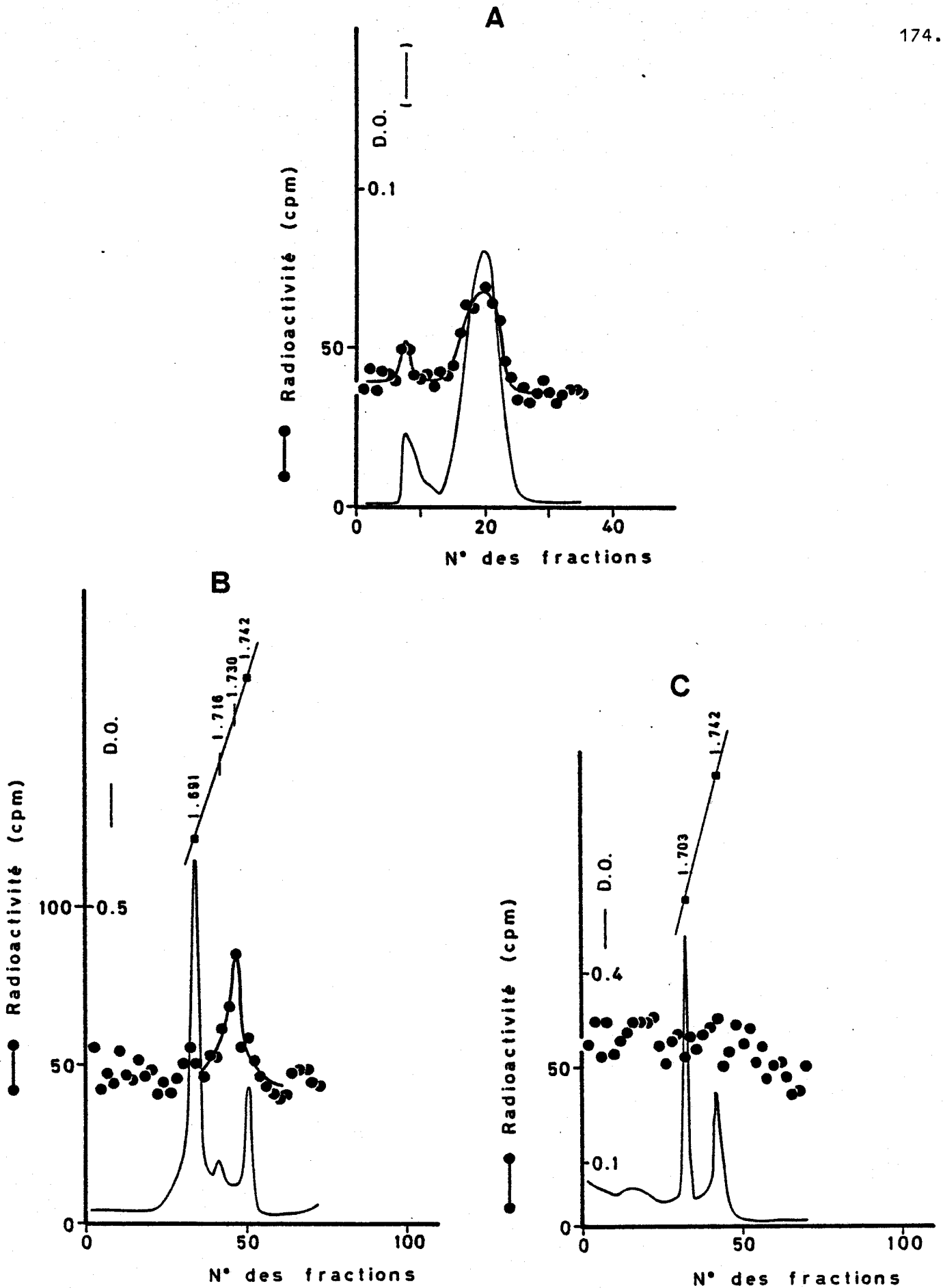


Fig. 65

Fig. 65A : filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *P. cruentum*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava* et puis culture pendant 48 h en présence de DNA non-radioactif de *S. flava*, échantillon correspondant au point 1-B.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 7 et 8 (B) et des fractions 16 à 22 (C).

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *B. subtilis* ($1,703 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).

BUS
LILLE

La figure 66A (p. 176) illustre les résultats de la purification par filtration sur gel d'agarose du lysat cellulaire. On peut observer en absorption dans l'U.V. deux pics qui sont superposés chacun par un pic de radioactivité.

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 6 à 9, contenant le matériel de haut poids moléculaire exclu du gel, sont illustrés par la figure 66B(p. 176). Nous voyons que les molécules radioactives sédimentent dans le gradient à une position qui correspond à une densité du DNA de *S. flava* ($1,730 \text{ g/cm}^3$).

Les résultats de l'analyse des fractions 13 à 22, correspondant au 2^{ième} pic de la figure 66A (p. 176), sont illustrés par la figure 66C (p. 176). On note que la radioactivité est répartie sur tout le gradient et qu'elle est portée par des molécules de faible poids moléculaire.

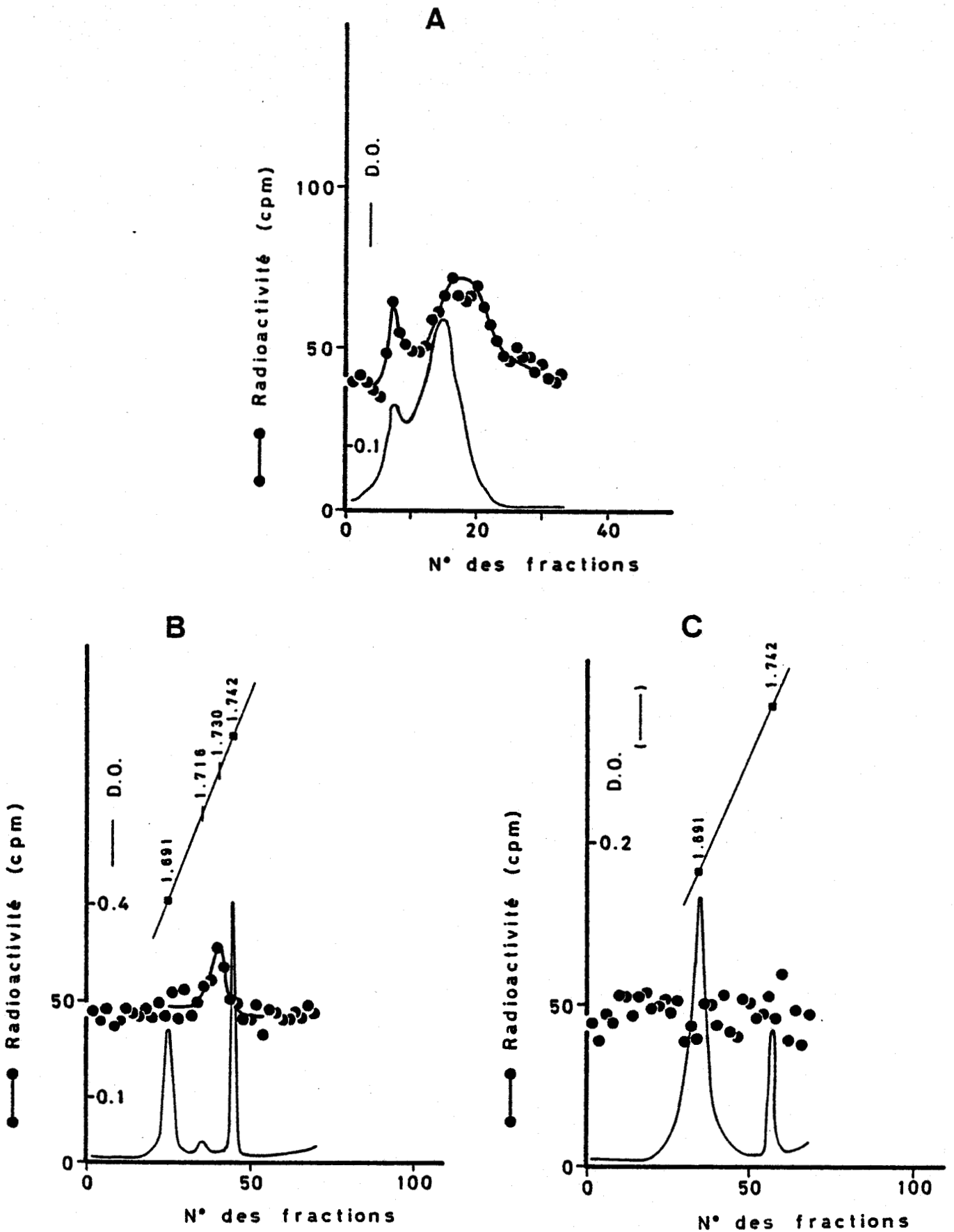


Fig. 66

Fig. 66A : filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *P. cruentum*, après incubation avec du DNA ^3H de *S. flava* et puis culture pendant 48 h en présence de DNA non-radioactif de *S. flava*, échantillon correspondant au point 2-B.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 6 à 9 (B) et des fractions 13 à 22 (C).

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



4. CONCLUSIONS

1. Il semble qu'il existe, au cours du cycle cellulaire de *P. cruentum*, deux moments préférentiels de prise de DNA de *S. flava* par les cellules. Lorsque les cellules sont synchronisées par des alternances de périodes de lumière et de périodes d'obscurité, ces moments préférentiels sont observés au milieu de la phase de non-division cellulaire (culture à la lumière) et au premier tiers de la phase de division cellulaire (culture à l'obscurité).

2. L'examen par centrifugation en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules en fin d'incubation avec du DNA radioactif de *S. flava*, montre que la radioactivité est portée par des molécules dont la densité est égale à celle du DNA bactérien utilisé. Ce résultat a été observé dans les deux cas étudiés : soit avec des cellules provenant d'une culture en période de lumière, soit avec des cellules prélevées d'une culture en période d'obscurité. La quantité de DNA radioactif, estimée à partir de l'activité spécifique du DNA utilisé, représente environ 0,08 % de la quantité totale de DNA.

Après une division cellulaire, l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules, montre que la radioactivité est portée par des molécules dont la densité est égale à celle du DNA bactérien utilisé. Dans ce cas, la quantité de DNA radioactif représente environ 0,04 % du contenu en DNA des cellules. Comme après une division cellulaire, la quantité de DNA cellulaire a doublé, il semble qu'il n'y ait pas eu de perte importante de DNA radioactif. L'analyse du

milieu acellulaire de culture en fin d'expérience montre que ce milieu est légèrement radioactif ; mais la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient de densité (molécules acido-solubles rejetées sans doute par les cellules).

3. Il semble donc que du DNA radioactif de *S. flava* peut pénétrer dans les cellules de *P. cruentum*, et y rester sans modification importante après un cycle cellulaire.

III. Prise et sort de DNA bactérien chez les algues

F. *Scenedemus obliquus*

1. CHOIX D'UN MILIEU D'INCUBATION AVEC LE DNA BACTERIEN

Des cellules de *S. obliquus* ont été incubées soit dans du milieu de culture (pH = 6,0), soit dans du tampon phosphate (pH = 6,0), contenant du DNA radioactif de *S. flava* (radioactivité spécifique : 4×10^5 dpm/ μ g ; concentration : 27 μ g/ml) pendant deux heures à 25 °C, avec une légère agitation et sous 4500 lux. Elles ont ensuite été centrifugées, lavées deux fois puis incubées pendant 15 min à 37 °C dans une solution de DNase. En fin d'incubation et après lavages, le matériel acido-insoluble est précipité par addition de TCA froid et est récupéré sur filtre.

La radioactivité est estimée par comptage en scintillation liquide. Elle est égale à 35 000 cpm lorsque les cellules sont incubées dans le milieu de culture et à 45 000 cpm lorsqu'elles sont incubées dans le tampon phosphate. La quantité de radioactivité étant plus élevée et significativement différente lorsque l'incubation a lieu dans le tampon phosphate, c'est ce milieu que nous avons choisi pour nos expériences ultérieures.

2. PRISE DE DNA ^3H BACTERIEN A DIFFERENTS MOMENTS DE LA CROISSANCE

A différents moments de la croissance, on prélève des aliquotes d'une culture. Les échantillons sont centrifugés, le surnageant est écarté et remplacé par un même volume de tampon phosphate contenant du DNA de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (radioactivité spécifique : $2,4 \times 10^6$ dpm/ μ g ;

concentration : 30 $\mu\text{g/ml}$). Les cellules sont remises en suspension puis incubées pendant deux heures à 25 °C avec agitation lente. En fin d'incubation, les cellules sont traitées comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes (XII).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XVII (p.181) et sont illustrés par la figure 67 (p. 182).

Nous voyons (figure 67 , p. 182) que la courbe des valeurs de la radioactivité acido-insoluble par unité de D.O. en fonction du temps écoulé après le début de la culture, varie inversement de celle de la concentration cellulaire (courbe de croissance).

Nous avons analysé, par centrifugation en gradient de CsCl, les sur-nageants acellulaires en fin d'incubation.

Les résultats de l'analyse de l'échantillon correspondant au point 4 (143 h) illustrés par la figure 68A(p.183) ont été comparés à ceux obtenus lors de l'analyse du milieu radioactif avant l'incubation avec les cellules (figure 68B ,p. 183). La comparaison des valeurs de la déviation standard des distributions de la radioactivité montre qu'il y a eu une très légère dépolymérisation du DNA bactérien lors de l'incubation avec les cellules.

Les résultats de l'analyse des échantillons, correspondant aux autres points de l'expérience sont identiques.

TABLEAU XVII

Résultats de l'étude de la prise de DNA radioactif de *M. lysodeikticus* par *S. obliquus*, à différents moments de la croissance

Point	1	2	3	4	5	6	7
Nombre d'heures après le début de la culture	23	71	95	143	220	287	431
Nombre de cellules par ml $\times 10^{-5}$	4,12	10,2	15,5	34,4	54,2	81,1	128
Radioactivité dans le surnageant après incubation (cpm totaux $\times 10^{-6}$)	22,1	23,4	17,0	22,4	30,2	21,7	20,5
Radioactivité dans le surnageant après DNase (cpm totaux $\times 10^{-6}$)	0,15	0,10	0,22	0,14	0,05	0,07	0,06
Radioactivité acido-soluble dans les cellules (cpm totaux)	53 400	23 532	4832	7032	2792	3824	4728
Radioactivité acido-insoluble dans les cellules (cpm totaux)	41 850	21 340	15 476	15 448	10 100	27 656	37 800
Absorption à 258 nm de la fraction acido-insoluble (unité D.O.)	0,078	0,14	0,293	0,455	0,662	0,950	1,43
Radioactivité acido-insoluble par unité de D.O. (cpm/D.O.)	536 500	152 400	52 800	33 900	15 200	29 100	26 400
Radioactivité acido-insoluble par cellule (cpm/cellule)	0,102	0,021	0,010	0,0045	0,0019	0,0034	0,0029

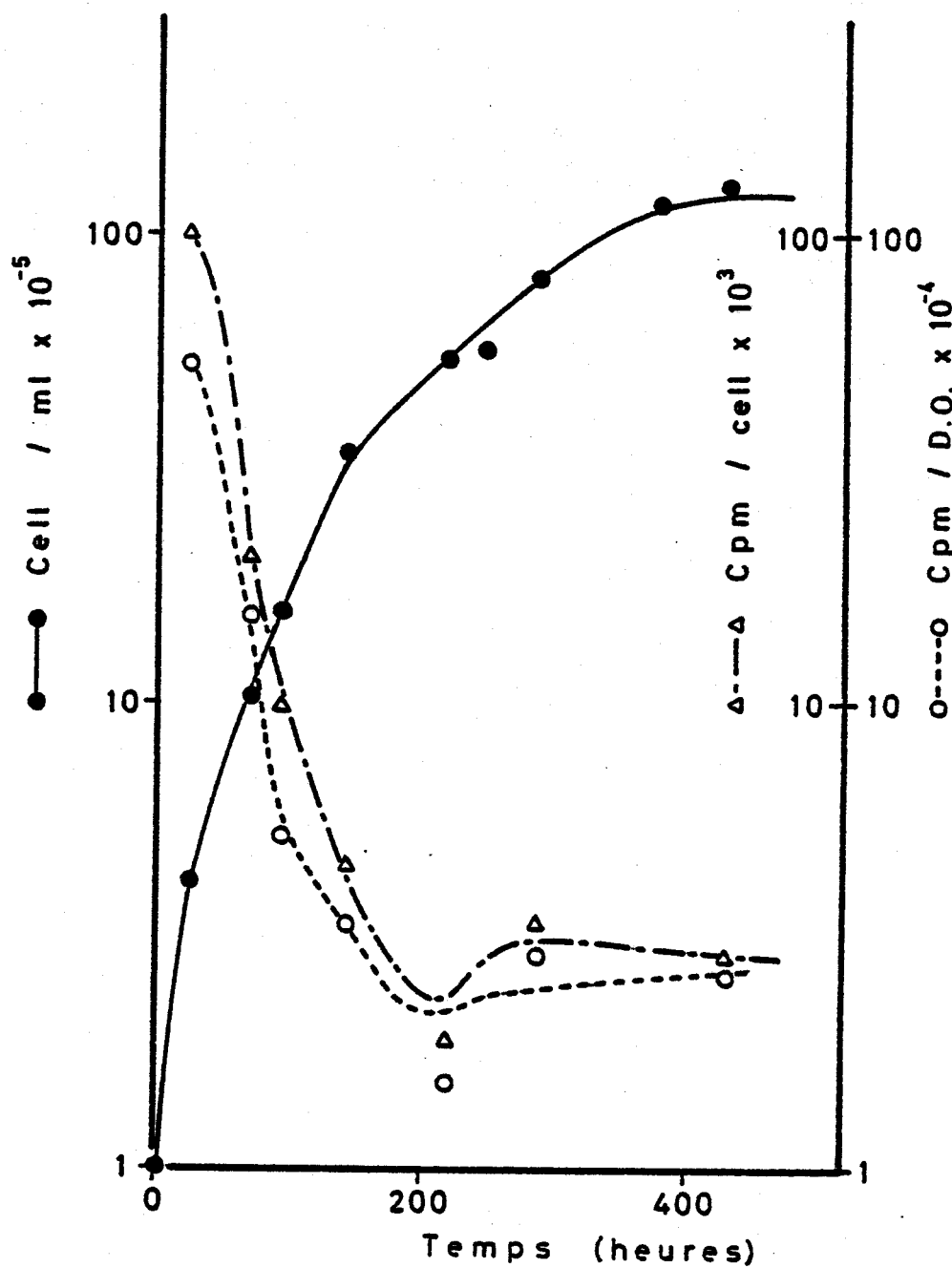


Fig. 67

Absorption de DNA ^3H de *M. lysodeikticus* par les cellules de *S. obliquus* en fonction de la croissance.

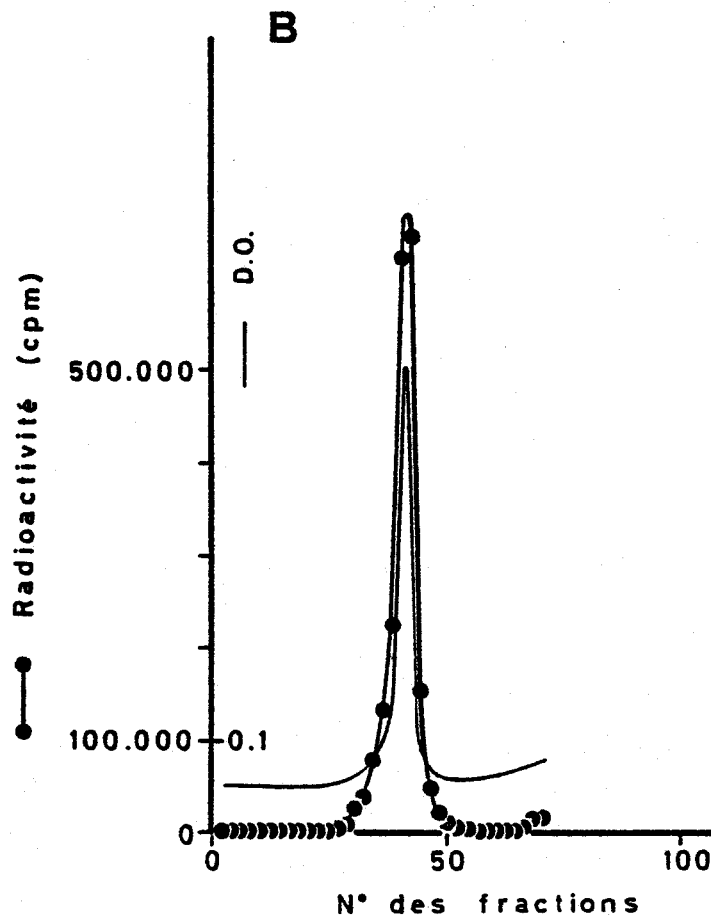
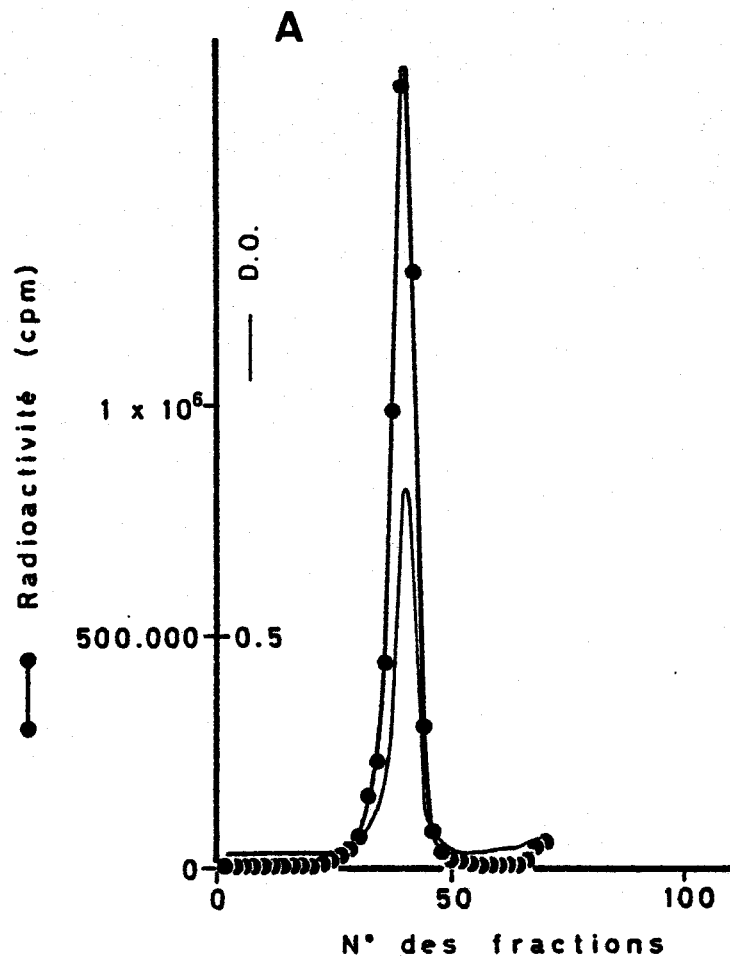


Fig. 68

Analyse en gradient de CsCl des milieux radioactifs (contenant du DNA ³H de *M. lysodeikticus*) avant (B) et après (A) incubation avec les cellules de *S. obliquus*.



3. ETUDE DE LA PRISE ET DU SORT D'UN DNA BACTERIEN

Nous avons étudié la prise et le sort d'un DNA radioactif bactérien à trois moments de la croissance, où les concentrations cellulaires de la culture sont respectivement égales à $2,9 \times 10^5$, à $1,95 \times 10^6$ et à $8,7 \times 10^6$ cellules par ml.

Les cellules sont centrifugées, le surnageant est écarté et remplacé par un même volume de tampon phosphate (pH = 6,0) contenant 35 $\mu\text{g/ml}$ de DNA ^3H de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (radioactivité spécifique $2,4 \times 10^6$ dpm/ μg , poids moléculaire : 10×10^6 daltons). Les cellules sont remises en suspension puis incubées à 25 °C pendant 2 h avec agitation modérée. En fin d'incubation, la suspension est centrifugée et après lavages, les cellules sont remises en suspension dans un même volume de milieu de culture. Une aliquote est prélevée en vue d'une analyse (notée-A) en fin d'incubation et le reste des cellules est cultivé pendant 72 h en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus* à la concentration de 30 $\mu\text{g/ml}$.

En fin d'expérience, la suspension est centrifugée, le surnageant et le culot de cellules sont congelés séparément en attendant d'être analysés (analyse notée-B).

a. Analyse des échantillons prélevés en fin d'incubation avec le DNA radioactif bactérien

1. Analyse des milieux d'incubation

Les surnageants d'incubation acellulaires ont été analysés par

centrifugation en gradient de CsCl. La figure 69 illustre les résultats de l'analyse de l'échantillon correspondant au point 2-A ($1,25 \times 10^6$ cellules par ml). La valeur de la déviation standard de la courbe de distribution de la radioactivité et de l'absorption U.V., est très voisine de celle observée lors de l'analyse du milieu avant l'incubation avec les cellules (figure 63B ,p. 183), ce qui est une bonne indication de ce que le DNA bactérien est peu modifié lors de l'incubation avec les cellules.

Des résultats identiques ont été obtenus lors de l'analyse des surnageants acellulaires correspondant aux autres points de l'expérience (1-A et 3-A).

2. Analyse du DNA extrait des cellules

Echantillon correspondant au point 1-A ($2,9 \times 10^5$ cellules/ml). Les résultats de la filtration sur agarose du lysat cellulaire partiellement purifié sont illustrés par la figure 70A , p. 187. On observe un seul pic en radioactivité.

Les fractions correspondant à ce pic ont été rassemblées et analysées par centrifugation en gradient de CsCl. Les résultats sont illustrés par la figure 70B. On voit que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Echantillon correspondant au point 2-A ($1,95 \times 10^6$ cellules/ml). La figure 71A (p.188) illustre les résultats de la purification du lysat cellulaire sur colonne de Sepharose 4B. On observe 3 pics en radioactivité.

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl

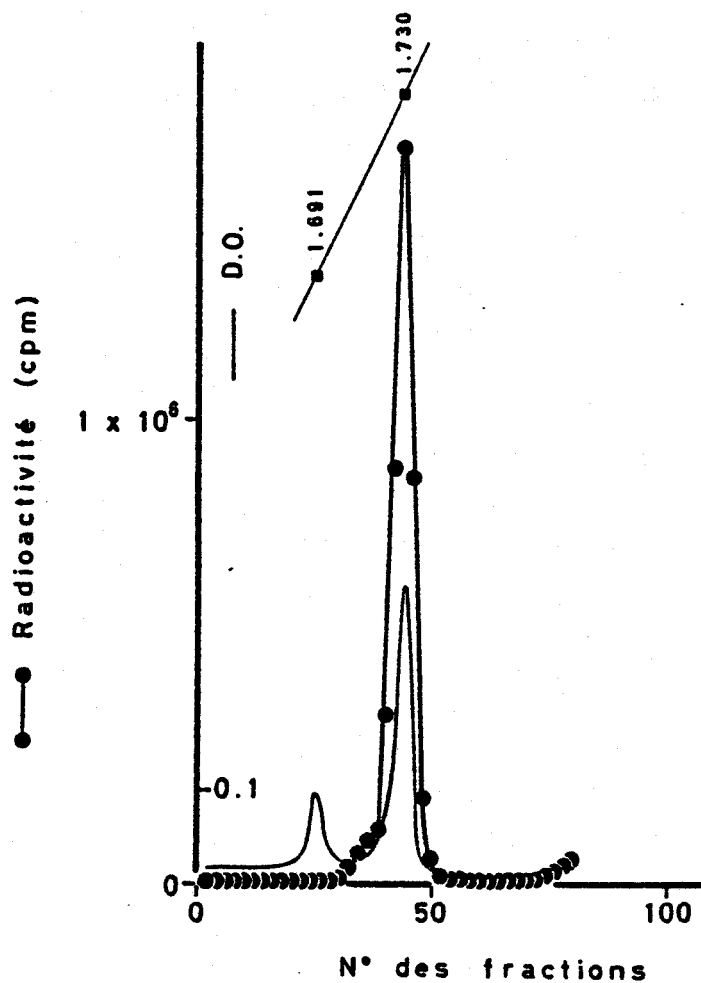


Fig. 69

Analyse en gradient de CsCl des milieux radioactifs (contenant du DNA de *M. lysodeikticus*) après incubation avec les cellules de *S. obliquus*.

Référence de densité : DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).

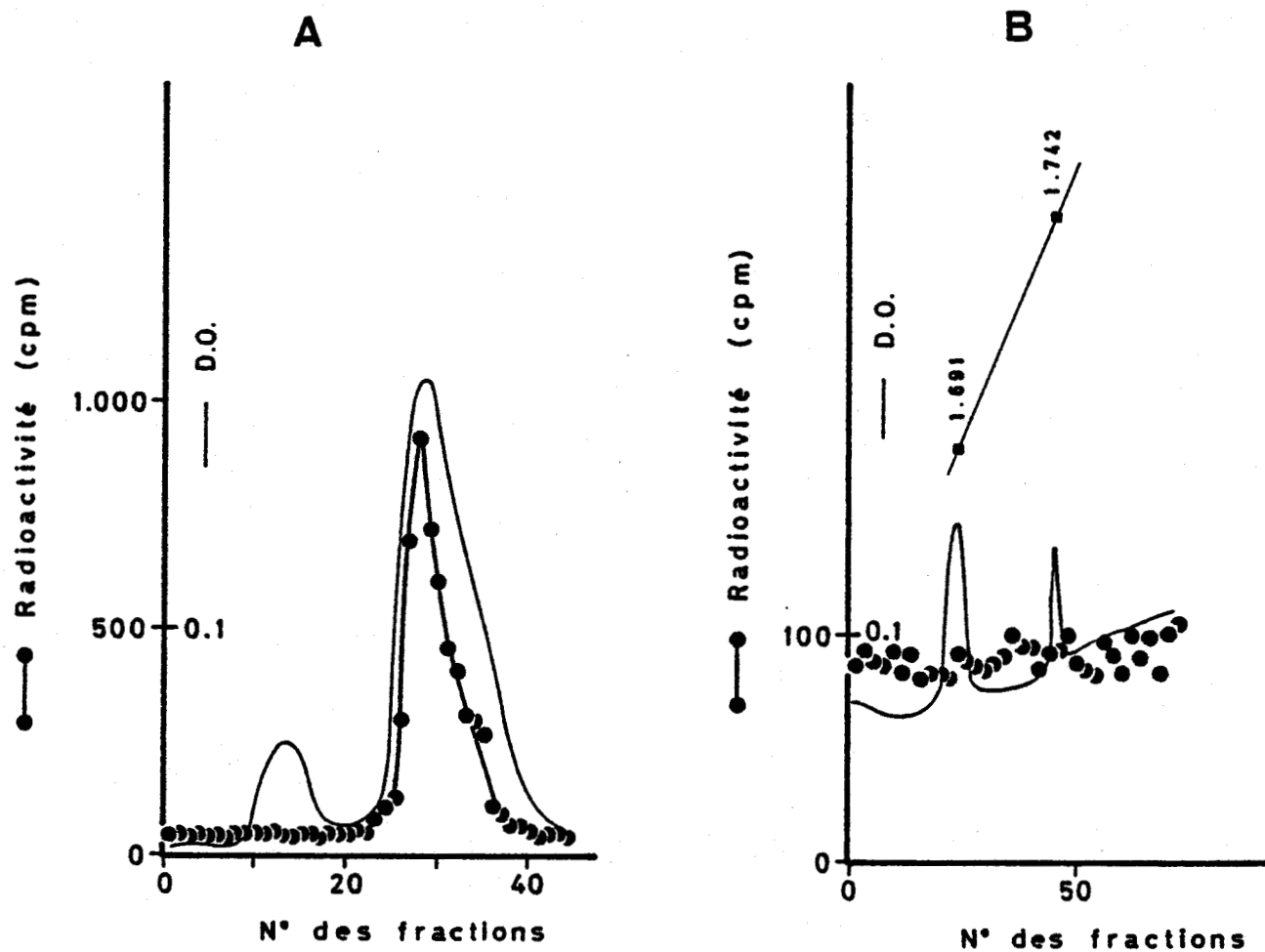


Fig. 70

Fig. 70A : filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *S. obliquus*, après incubation avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus*, échantillon correspondant au point 1-A.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 26 à 32 (B).

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



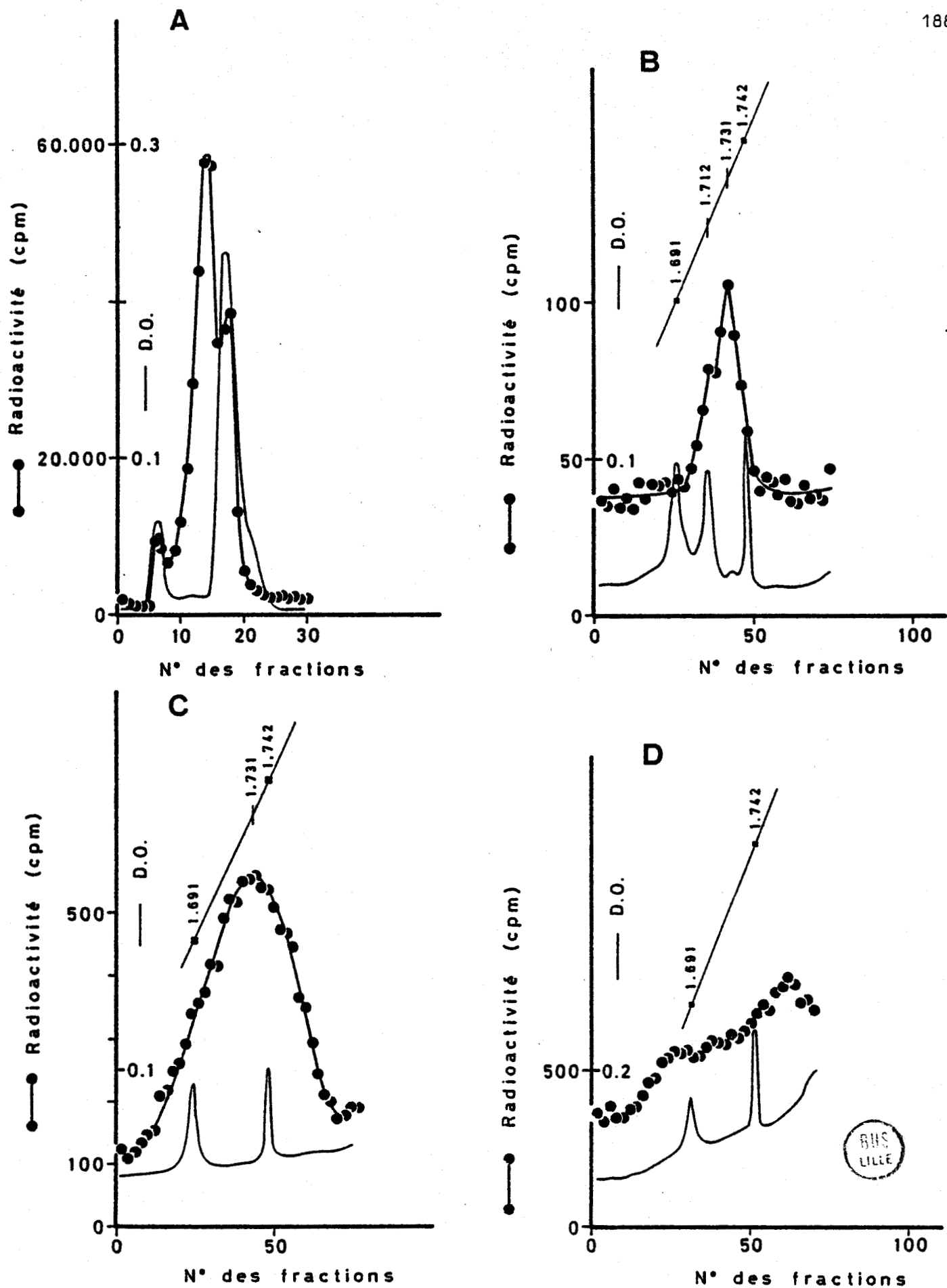


Fig. 71

Fig. 71A : filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *S. obliquus*, après incubation avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus*, échantillon correspondant au point 2-A.
 Analyse en gradient de CsCl des fractions 6 et 7 (B), des fractions 13 à 15 (C) et des fractions 17 et 18 (D).
 Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742\text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691\text{ g/cm}^3$).

des fractions 6 et 7 (correspondant au premier pic radioactif) sont illustrés par la figure 71B et montrent que la radioactivité est portée principalement par des molécules sédimentant dans le gradient à la densité du DNA de *M. lysodeikticus* ($1,731\text{g/cm}^3$). Sur la partie gauche de la courbe de distribution, on observe un épaulement dû à des molécules radioactives qui sédimentent dans le gradient au niveau de la densité $1,712\text{ g/cm}^3$, correspondant à la densité du DNA de *S. obliquus*. Nous avons vérifié que la radioactivité était portée par des molécules sensibles à la DNase.

La figure 71C illustre les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 13 à 15 (correspondant au 2^{ième} pic radioactif de la figure 71A): on peut voir que la courbe de distribution de la radioactivité est large et s'étend sur presque tout le gradient. Cette radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire dont la densité en gradient de CsCl est voisine de celle du DNA de *M. lysodeikticus* ($1,731\text{ g/cm}^3$).

Les fractions 17 et 18, correspondant au 3^{ième} pic radioactif (figure 71A), ont été analysées par centrifugation en gradient de CsCl et les résultats sont illustrés dans la figure 71D . Dans ce cas, la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Si on admet que la grande majorité de la radioactivité est portée par des molécules de DNA de *M. lysodeikticus*, connaissent son activité spécifique, on peut estimer qu'en fin d'incubation, le DNA bactérien représente environ 0,3 % de la quantité totale du DNA des cellules.

Les résultats de l'analyse des échantillons correspondant au point 3-A sont identiques à ceux trouvés pour les échantillons correspondant au point 2-A.

b. Analyse des échantillons en fin de chasse (après 72 h de culture)

1. Analyse des surnageants

Après centrifugation des cellules, les surnageants ont été analysés par centrifugation en gradient de CsCl. Les résultats, pour l'échantillon correspondant au point 2-B, sont illustrés par la figure 72 (p. 191). La valeur de l'écart standard de la distribution de la radioactivité montre qu'il s'agit de molécules légèrement dépolymérisées, relâchées par les cellules. Le DNA non-radioactif, ajouté au milieu de culture pour la chasse de 72 h, n'a pas ou peu subi de modifications.

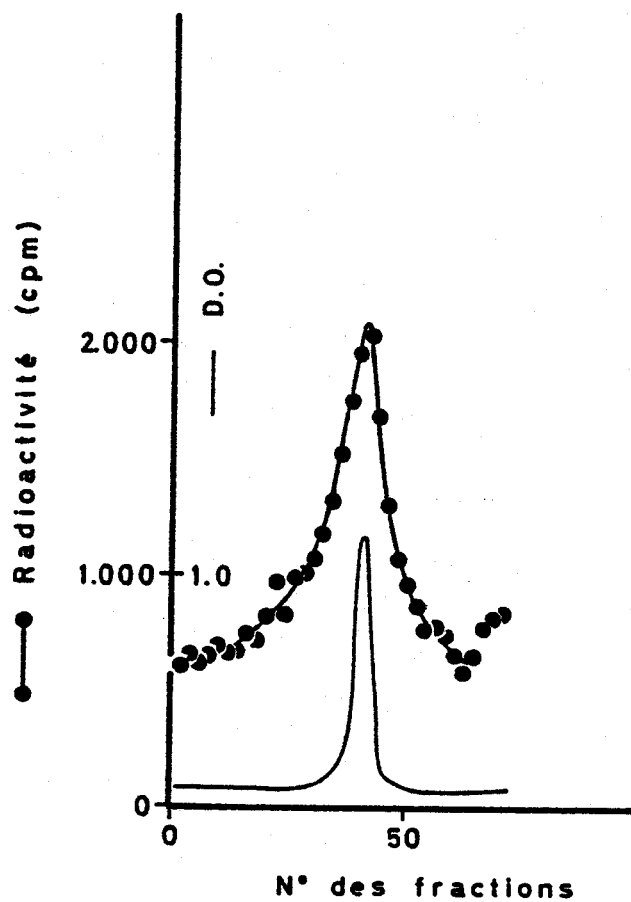
L'analyse des surnageants correspondant aux autres points de l'expérience (1-B et 3-B) donne les mêmes résultats.

2. Analyse du DNA extrait des cellules

Echantillon correspondant au point 1-B. Les cellules se sont divisées au moins deux fois, car la concentration cellulaire de la culture, égale à $2,9 \times 10^5$ au début, était égale à $1,46 \times 10^6$ cellules par ml en fin de chasse.

La figure 73A illustre les résultats de la purification sur gel d'agarose du lysat cellulaire. On observe un seul pic en radioactivité.

Les fractions 17 à 20, correspondant à ce pic, ont été rassemblées et analysées par centrifugation en gradient de CsCl. Les résultats, illustrés



BHS
LILLE

Fig. 72

Analyse en gradient de CsCl du surnageant acellulaire provenant de l'échantillon des cellules de *S. obliquus* incubées dans du milieu contenant du DNA ^3H de *M. lysodeikticus* puis cultivées pendant 72 h dans du milieu contenant du DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*.

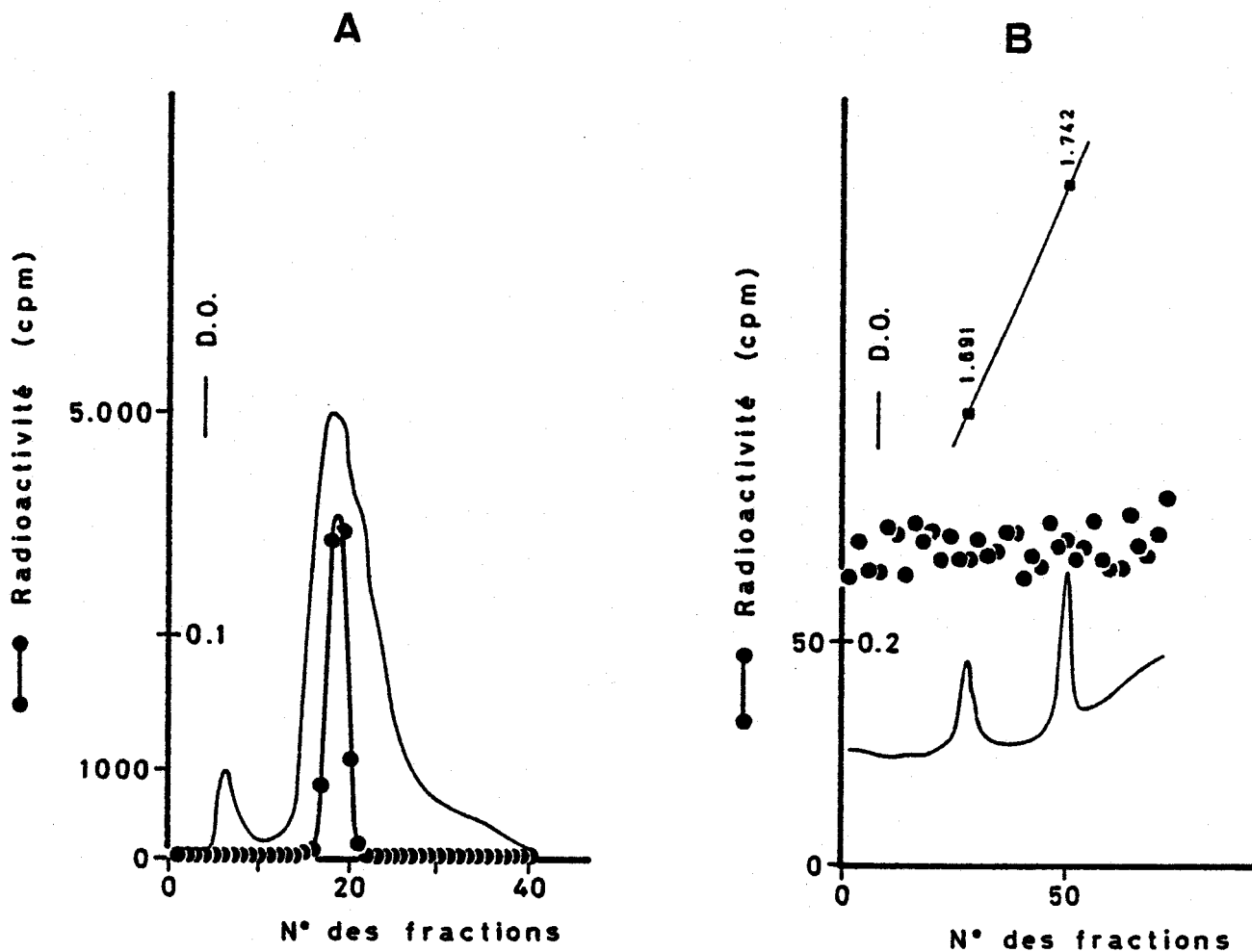


Fig. 73

Fig. 73A : filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *S. obliquus*, après incubation du DNA ^3H de *M. lysodeikticus* et puis culture pendant 72 h en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*, échantillon correspondant au point 1-B.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 17 à 20 (B).

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



par la figure 73B, montrent que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Echantillon correspondant au point 2-B. La concentration cellulaire, au départ égale à $1,95 \times 10^6$ cellules/ml, était égale à $6,55 \times 10^6$ cellules/ml en fin d'expérience ; toutes les cellules se sont donc divisées au moins une fois.

La figure 74A illustre les résultats de la filtration sur gel d'agarose du lysat cellulaire partiellement purifié. On observe 3 pics en radioactivité.

Les résultats de l'analyse des fractions 6 et 7 par centrifugation en gradient de CsCl sont illustrés par la figure 74B (p. 194). On observe une distribution de la radioactivité consistant en un pic principal de molécules dont la densité en gradient de CsCl est égale à $1,731 \text{ g/cm}^3$ (densité du DNA bactérien utilisé) et un pic secondaire de molécules dont la densité est égale à environ $1,712 \text{ g/cm}^3$ (densité du DNA de *S. obliquus*). Nous avons vérifié, dans ce cas également, que la radioactivité était portée par des molécules sensibles à la DNase.

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 12 à 14, correspondant au 2^{ième} pic radioactif de la figure 74A, sont illustrés par la figure 74C (p.194). On voit que la radioactivité est portée par des molécules de poids moléculaire assez faible, qui sédimentent dans le gradient en formant une distribution assez large, et dont la densité moyenne est voisine de celle du DNA de *M. lysodeikticus* ($1,731 \text{ g/cm}^3$).

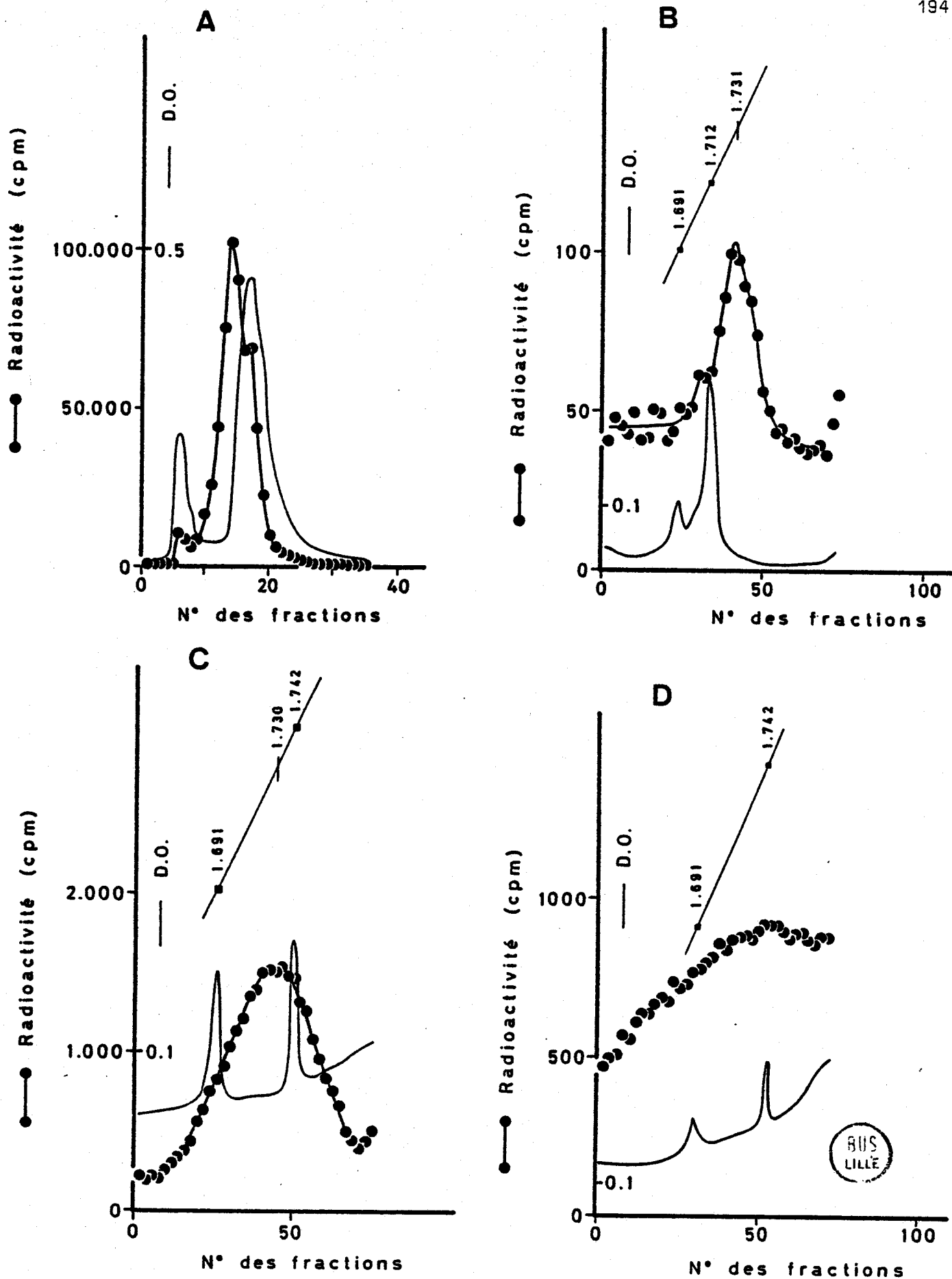


Fig. 74

Fig. 74A : filtration moléculaire sur gel d'agarose du lysat de cellules de *S. obliquus*, après incubation avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus* et puis culture pendant 72 h en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*, échantillon correspondant au point 2-B.

Analyse en gradient de CsCl des fractions 6 et 7 (B), des fractions 12 à 14 (C) et des fractions 16 à 18 (D).
Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm 3), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm 3).

Les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl des fractions 16 à 18 correspondant au 3^{ième} pic radioactif de la figure 74A (p.194) sont illustrés par la figure 74B et montrent que la radioactivité est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient.

Connaissant la radioactivité spécifique du DNA de *M. lysodeikticus*, on peut estimer que la radioactivité portée par les molécules qui sédimentent à la densité du DNA bactérien, représente une quantité de DNA de *Micrococcus* qui serait égale à environ 0,1 % de la quantité totale de DNA.

Lors de l'analyse de l'échantillon correspondant au point 3-B de l'expérience, des résultats identiques ont été obtenus.

Ces expériences ont été répétées plusieurs fois dans les mêmes conditions avec d'autres préparations de DNA radioactif de *M. lysodeikticus*, et des résultats semblables ont toujours été obtenus.

En conclusion de cette étude biochimique, il semble qu'on puisse dire que les cellules de *S. obliquus*, se trouvant au milieu ou en fin de phase de croissance exponentielle, peuvent absorber du DNA de *M. lysodeikticus* et le garder au moins en partie sans grande modification après une ou plusieurs divisions cellulaires.

4. ETUDE PAR AUTORADIOGRAPHIE ET PAR HYBRIDATION MOLECULAIRE

Au vu de ces résultats, nous nous sommes rendu compte qu'une étude par autoradiographie du phénomène était nécessaire. En effet, qu'elle que soit la localisation de la radioactivité (membranaire, cytoplasmique ou nucléaire),

l'analyse par ultracentrifugation en gradient de CsCl donnerait les mêmes résultats.

D'autre part, comme c'est en se basant sur le critère de densité que nous sommes arrivés à la conclusion que les cellules étaient capables d'absorber et de garder du DNA bactérien exogène, il devenait souhaitable de confirmer cette observation en utilisant une autre technique basée sur un autre paramètre si c'était possible.

L'analyse par hybridation moléculaire des molécules radioactives extraites des cellules en fin d'expérience nous offrait cette possibilité. Cette méthode d'analyse est en effet basée sur un tout autre critère et est, de plus, hautement spécifique.

A. Etude autoradiographique

En fin d'incubation avec du DNA radioactif de *M. lysodeikticus* et en fin de chasse avec du DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*, une aliquote des cellules a été prélevée pour une étude par autoradiographie, une partie des cellules étant déposée sur des lames de microscope (frottis) et l'autre partie étant préparée pour faire des coupes histologiques (voir le chapitre matériel et méthodes, XV).

L'analyse par ultracentrifugation en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules, faite en parallèle, a confirmé les résultats obtenus précédemment, à savoir que la radioactivité est portée principalement par des molécules qui ont une densité égale à celle du DNA de *M. lysodeikticus*.

1. Cellules en fin d'incubation avec le DNA ^3H de *M. lysodeikticus*

L'examen des frottis montre que la radioactivité, visualisée par la présence des grains d'argent, est localisée au niveau des cellules (photo 1).

Cette observation est confirmée par l'examen des coupes qui permet de dire que la radioactivité est intracellulaire (photo 2, p. 199)

2. Cellules en fin d'expérience, après 72 h de chasse en présence de DNA bactérien non-radioactif

L'examen des frottis (photo 3, p. 200) montre que la radioactivité est localisée au niveau des cellules.

L'examen des coupes (photo 4, p. 201) montre que la radioactivité est intracellulaire.

La petite taille des cellules ne permet pas une localisation plus spécifique au microscope optique.

b. Analyse par hybridation moléculaire

Cette étude a été entreprise dans le but de caractériser et d'identifier les molécules radioactives extraites des cellules en fin d'expérience et qui en gradient de CsCl ont la même densité que celle du DNA de *M. lysodeikticus* utilisé pour l'incubation.

Nous avons tout d'abord défini les limites de la méthode dans nos conditions expérimentales en dénaturant puis en renaturant une faible quantité (1 μg) de DNA tritié de *M. lysodeikticus* en présence d'un excès (13 μg) de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*.

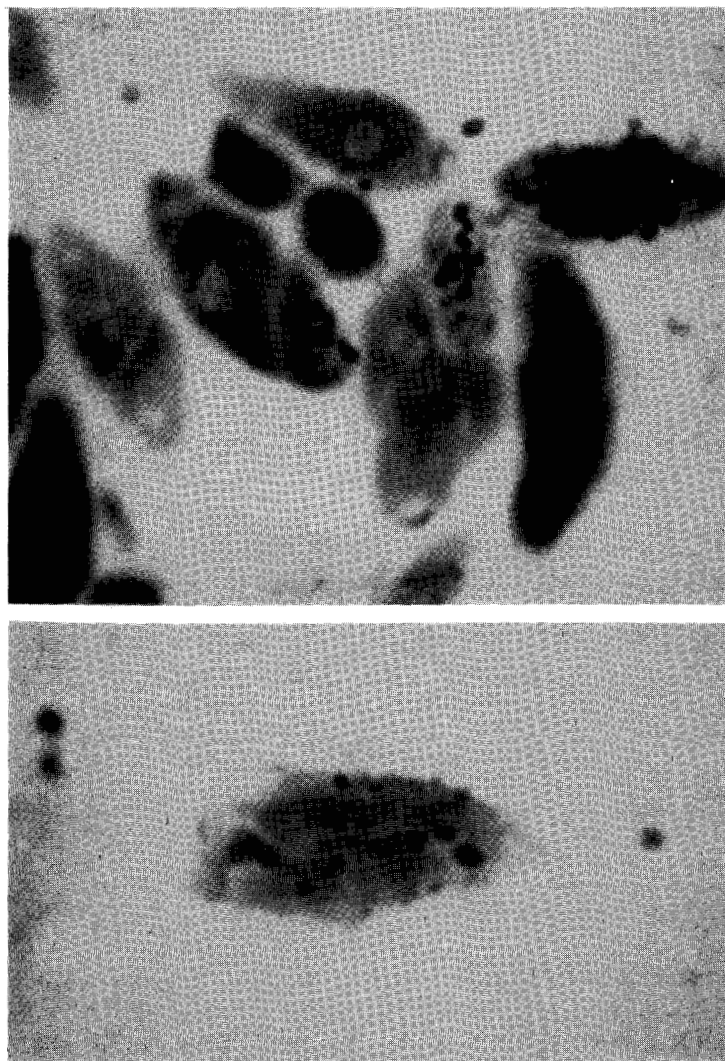


PHOTO 1

Autoradiographies de frottis de cellules de *S. obliquus*, incubées pendant 2 heures avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus*

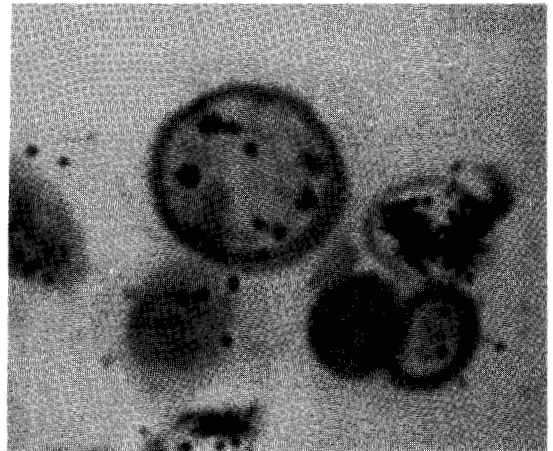
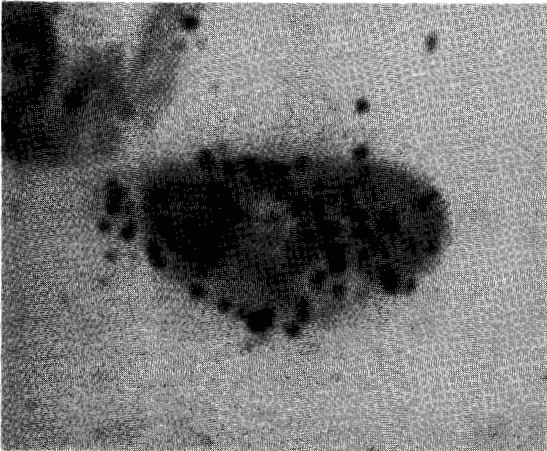
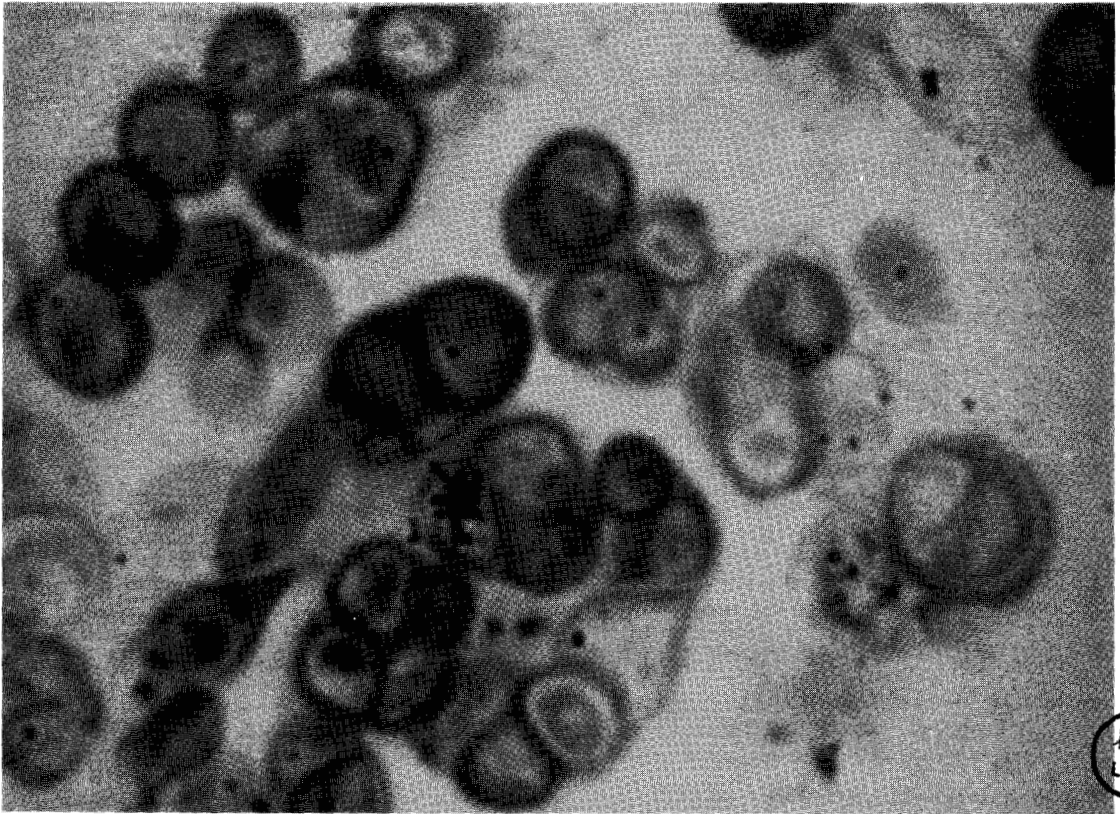


PHOTO 2

Autoradiographies de coupes semi-fines de cellules de *S. obliquus*,
incubées pendant 2 heures avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus*

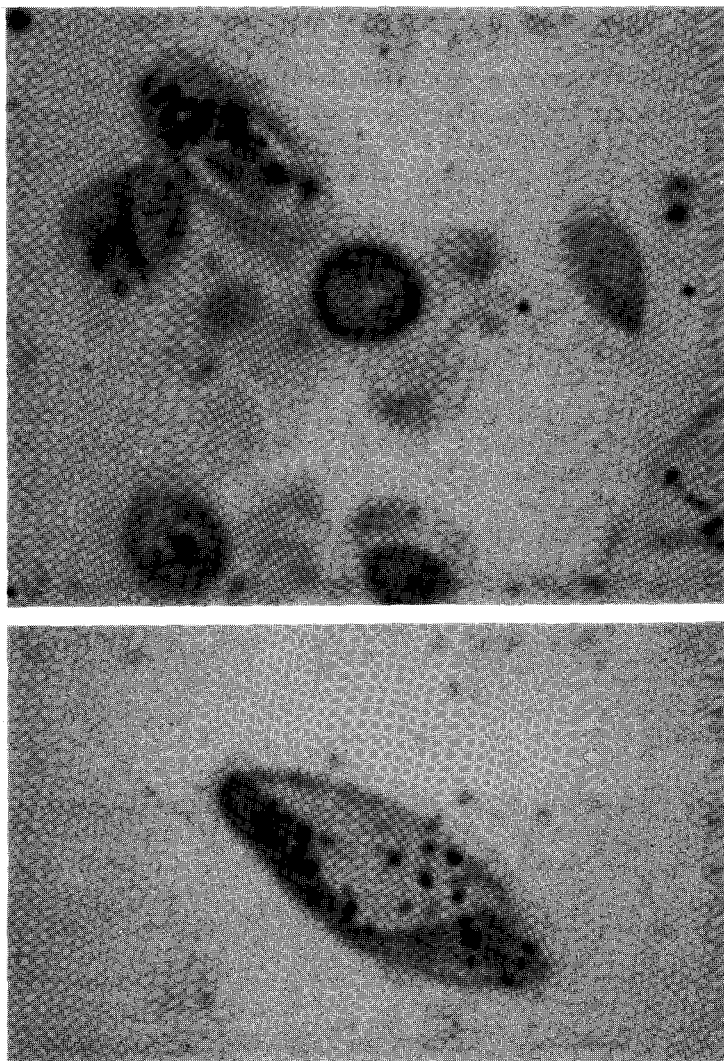


PHOTO 3

Autoradiographies de frottis de cellules de *S. obliquus*, incubées pendant 2 heures avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus* puis cultivées pendant 72 heures en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*



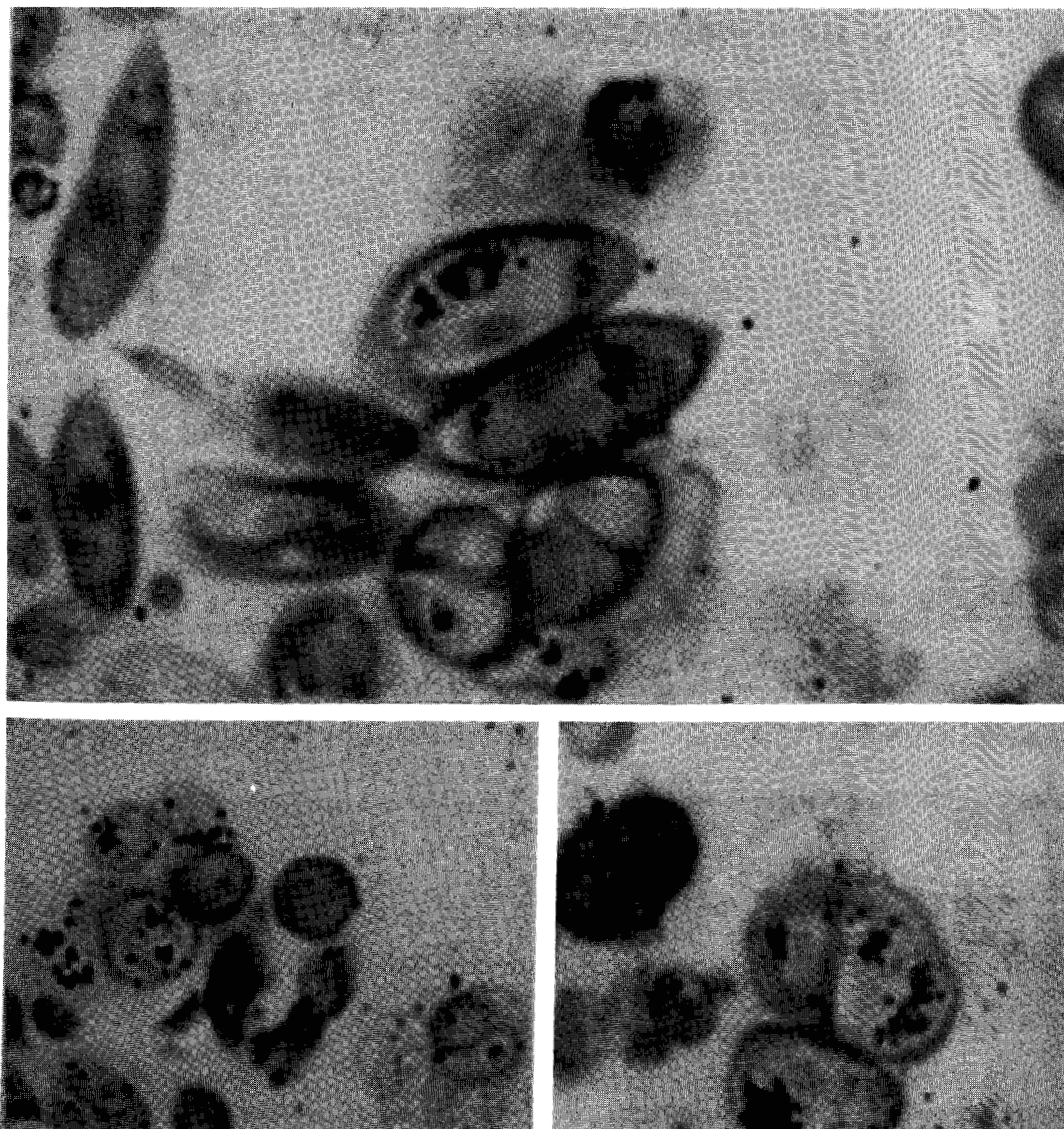


PHOTO 4

Autoradiographies de coupes semi-fines de cellules de *S. obliquus*, incubées pendant 2 heures avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus* puis cultivées pendant 72 heures en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*



La fraction hybride réassociée a été isolée par chromatographie sur hydroxylapatite et caractérisée par la détermination de la température de fusion par élution thermique.

Les résultats sont illustrés par la figure 75A et on peut voir que dans nos conditions expérimentales environ 57 % de la radioactivité mise en réaction est portée par des molécules hybrides renaturées double-chaîne et que la température de fusion de l'hybride est égale à 85 °C.

Les résultats obtenus lors de la dénaturation et réassociation des molécules radioactives extraites des cellules, en présence d'un excès (13 µg) de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus* sont illustrés par la figure 75B (p. 203).

Environ 37,5 % de la radioactivité mise en expérience sont portés par des molécules hybrides double-chaîne. La température de fusion de l'hybride, estimée par élution thermique, est égale à 87 °C, température très voisine de celle observée lors de la fusion de l'hybride formé par réassociation de DNA tritié et non-radioactif de *M. lysodeikticus* (figure 75A, p.203).

Les pourcentages de réassociation dans les deux expériences sont comparables si l'on tient compte du fait que dans le second cas, la radioactivité mise en expérience est portée par deux types de molécule (figure 74B), les unes dont la densité est égale ou voisine de celle du DNA de l'algue et qui représentent donc environ 20 % de la population, les autres dont la densité est égale ou voisine de celle du DNA de *M. lysodeikticus*.

Dans une troisième expérience, nous avons dénaturé puis renaturé du DNA radioactif de *S. obliquus* en présence d'un excès (13 µg) de DNA

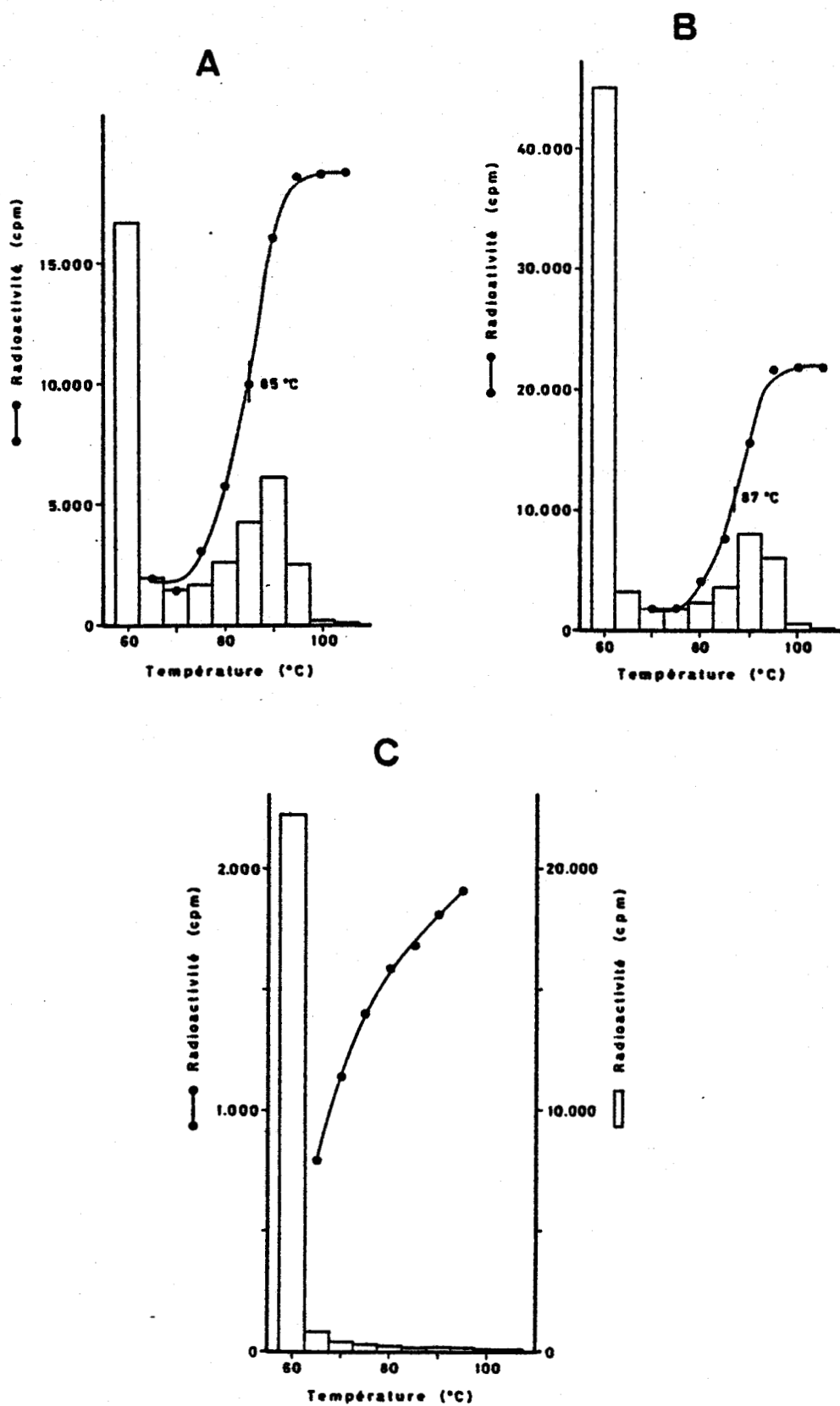


Fig. 75

Analyse par thermo-chromatographie sur HAP après réassociation moléculaire.

A : DNA ^3H de *M. lysodeikticus*

B : DNA extrait des cellules après incubation avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus* et puis culture pendant 72 h en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*

C : DNA ^3H de *S. obliquus*

dénaturés et renaturés en présence d'un excès de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*.



non-radioactif de *M. lysodeikticus*.

Les résultats sont illustrés par la figure 75C (p. 203). On peut constater que 93 % de la radioactivité mise en expérience sont portés par des molécules dénaturées non réassociées et que les 7 % restant sont portés par des molécules "faux-hybrides". Lors de l'élution thermique, en effet, on n'observe pas l'allure sigmoïde caractéristique des courbes de fusion de DNA bi-caténares.

5. PRISE ET SORT DE DNA ^3H de *B. subtilis*

Pour nos expériences précédentes, nous avons toujours utilisé du DNA de *M. lysodeikticus* dont la densité ($1,731 \text{ g/cm}^3$) était plus élevée que celle du DNA de l'algue ($1,712 \text{ g/cm}^3$).

Il était intéressant d'utiliser un DNA bactérien d'une autre densité et de voir si nous obtiendrions le même genre de résultat. Nous avons choisi le DNA de *B. subtilis* qu'on peut obtenir porteur d'une activité spécifique élevée et dont la densité ($1,703 \text{ g/cm}^3$) est nettement différente de celle de DNA de *S. obliquus*.

Nous avons suivi exactement le même protocole expérimental que lors des essais avec le DNA de *M. lysodeikticus*. Des cellules provenant d'une culture en phase de croissance exponentielle (concentration cellulaire = $1,6 \times 10^6$ cellules/ml), ont été incubées pendant 2 heures à 25°C dans du tampon phosphate (pH = 6,0) contenant du DNA radioactif de *B. subtilis* (radioactivité spécifique = $3,9 \times 10^6$ dpm/ μg ; concentration = $30 \mu\text{g/ml}$). En fin d'incubation, la suspension a été centrifugée, le surnageant a été

congelé en attendant d'être analysé et les cellules, après lavages, ont été remises en suspension dans un même volume de milieu de culture. Une aliquote a été prélevée en vue de l'analyse des cellules en fin d'incubation avec le DNA radioactif, et le restant a été cultivé à 25 °C pendant 72 heures en présence de DNA non-radioactif de *B. subtilis* (concentration = 30 µg/ml). Le surnageant acellulaire de l'échantillon prélevé en fin d'incubation avec le DNA radioactif a été analysé par centrifugation en gradient de CsCl.

Les résultats sont illustrés par la figure 76A (p. 206) et comparés à ceux obtenus lors de l'analyse du milieu radioactif avant l'incubation avec les cellules (figure 76B ,p. 206). La comparaison des déviations standard des courbes de distribution de la radioactivité et de l'absorption en U.V. montre que le DNA bactérien a été légèrement dépolymérisé lors de l'incubation avec les cellules.

Le DNA extrait des cellules a été purifié par filtration moléculaire sur gel d'agarose et analysé par centrifugation en gradient de CsCl.

Les résultats sont illustrés par la figure 77(p. 207) et on voit que la radioactivité est portée par des molécules assez dépolymérisées qui sédimentent dans le gradient en formant une distribution assez large dont le mode se situe aux environs de la densité de 1,703 g/cm³, densité égale à celle du DNA bactérien utilisé.

Des résultats identiques ont été obtenus lors de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules, après la période de chasse de 72 h en présence de DNA non-radioactif de *B. subtilis*.

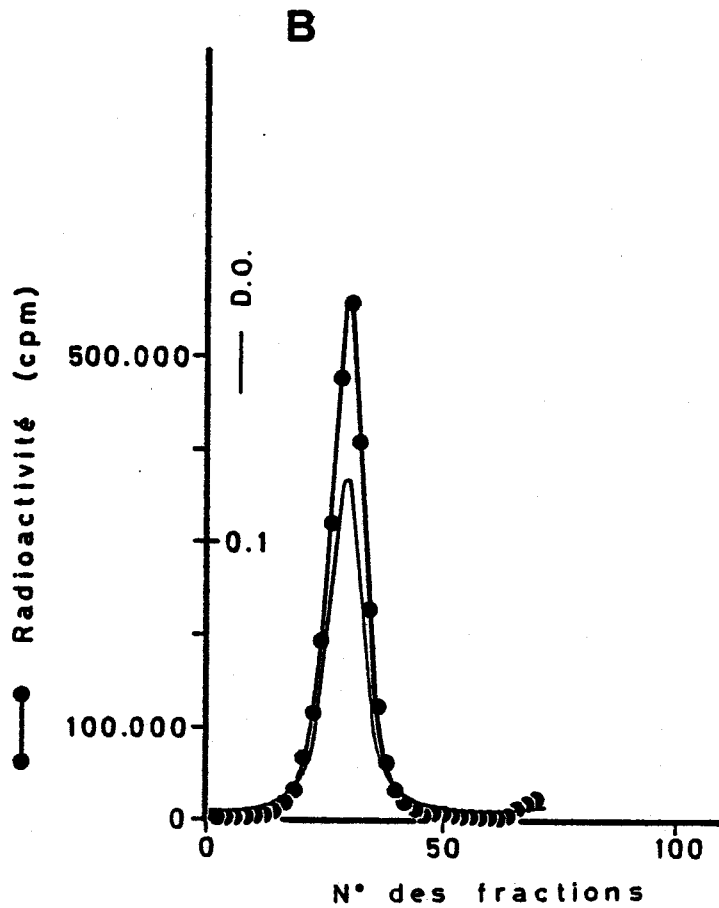
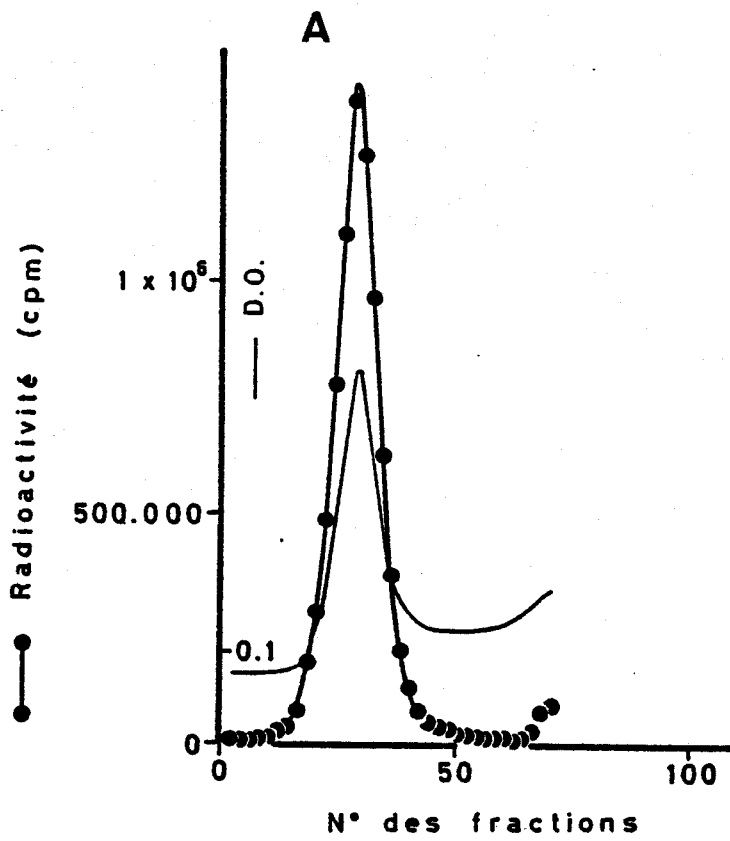


Fig. 76

Analyse en gradient de CsCl des milieux radioactifs (contenant du DNA ³H de *B. subtilis*) avant (B) et après (A) incubation avec les cellules de *S. obliquus*.



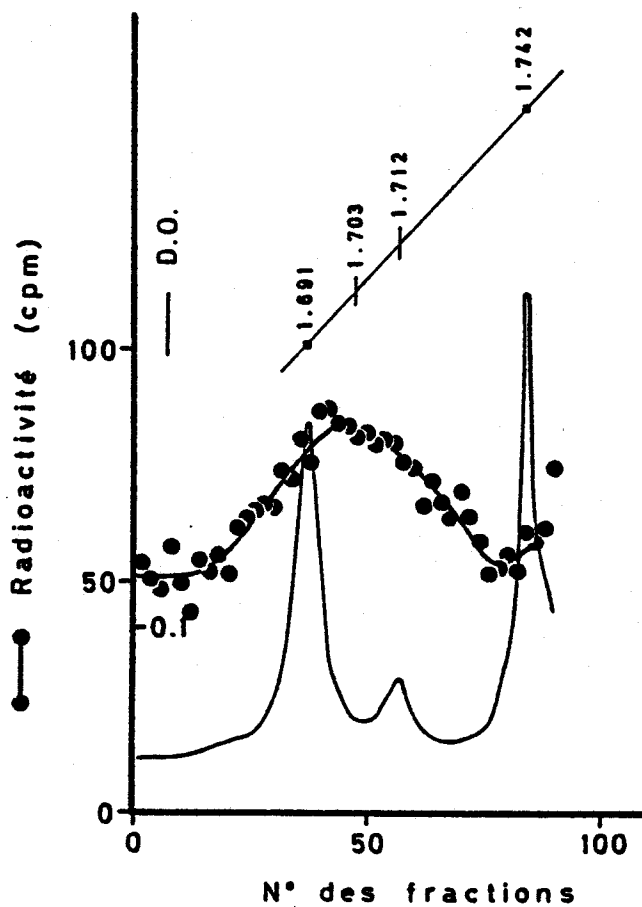


Fig. 77

Analyse en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules de *S. obliquus* en fin d'incubation avec du DNA ^3H de *B. subtilis*.

Références de densité : DNA de phage 2C ($1,742 \text{ g/cm}^3$), DNA de *Cl. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



Ces résultats montrent donc que la densité des molécules radioactives, extraites des cellules en fin d'expérience, correspond principalement à la densité du DNA utilisé pour l'incubation.

6. ACTION DE LA DNase

Dans les expériences précédentes, les cellules, après l'incubation dans du tampon phosphate contenant le DNA tritié bactérien (*M. lysodeikticus* ou *B. subtilis*), n'ont pas été traitées par la DNase, comme cela se fait normalement avec les bactéries.

Nous avons remarqué en effet que des algues traitées par la DNase se décoloraient et ne se développaient plus.

Nous avons cependant étudié l'action de la DNase sur des cellules en fin d'expérience, c'est-à-dire, après la période de chasse de 72 heures en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*. Les cellules ont été centrifugées, lavées puis incubées pendant 15 min à 37 °C avec une solution de DNase (concentration = 20 µg/ml) contenant également du MgSO₄ (concentration : 5 mM).

Le DNA extrait des cellules a été purifié par filtration sur gel d'agarose puis analysé par centrifugation en gradient de CsCl. Les résultats de cette analyse sont illustrés par la figure 78 (p.209). On voit que la radioactivité est portée par deux espèces moléculaires dont l'une, formant le pic principal, sédimente dans le gradient à une position qui correspond à celle du DNA de l'algue (1,712 g/cm³), et l'autre à une position qui correspond à celle du DNA de *M. lysodeikticus* (1,731 g/cm³).

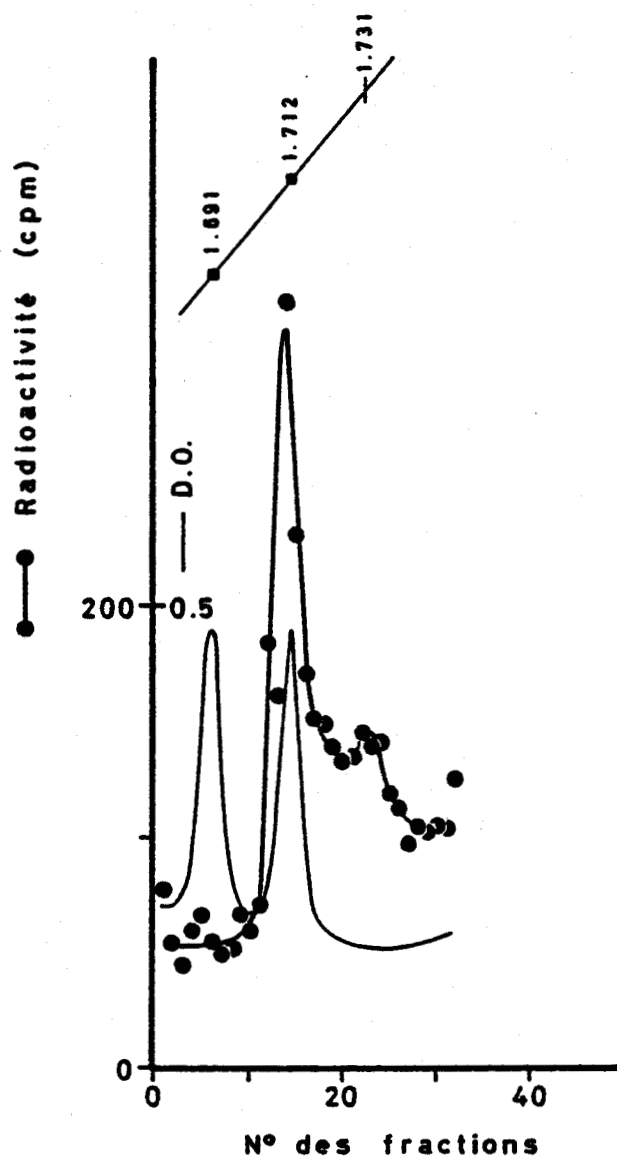


Fig. 78

Analyse en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules de *S. obliquus* incubées avec du DNA ^3H de *M. lysodeikticus* puis cultivées pendant 72 h en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus* et enfin traitées par la DNase.

Référence de densité : DNA de *C. pertringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



Si on compare ces résultats à ceux obtenus lors de l'analyse dans les mêmes conditions du DNA extrait d'algues non traitées en fin d'expérience par la DNase (comme ceux illustrés par la figure 74B, p.194), on voit que lorsque les algues sont traitées par la DNase, le pic qui sédimmente en gradient de CsCl à la position qui correspond à celle du DNA de *M. lysodeikticus* est beaucoup moins important.

Il semble donc qu'une partie de la radioactivité est portée par des molécules qui, bien qu'intracellulaires comme semble l'indiquer l'étude par autoradiographie, sont accessibles à la DNase exogène.

7. RECHERCHE DE CONTAMINANTS EVENTUELS

La stérilité des cultures a été vérifiée régulièrement par prélèvement d'aliquotes et étalement sur milieu riche pour bactéries ou champignons.

Nous avons de plus testé les cultures pour la présence éventuelle de virus et/ou de mycoplasmes, qui exigent des conditions et milieux de culture spéciaux.

Les cellules (21) ont été cultivées en présence d'adénine-2-³H (15 Ci/mM, 0,2 mCi/ml) jusqu'au début de la phase stationnaire ; un jour avant l'arrêt de la culture, de l'uridine-5-³H (28 Ci/mM, 2 mCi/100 ml) est ajouté à la culture.

La suspension est centrifugée à basse vitesse pour sédimenter les cellules. Le surnageant est ensuite centrifugé à haute vitesse, et le culot,

remis en suspension dans du tampon TNE, est analysé par centrifugation en gradient de sucrose 15-65 %.

Les résultats sont illustrés par la figure 79A ,p. 212 .
Le gradient a été caractérisé par la détermination de l'indice de réfraction de certaines fractions.

On observe deux pics de distribution de la radioactivité acido-insoluble, l'un dont la densité en gradient de sucrose est voisine de $1,080 \text{ g/cm}^3$, l'autre dont la densité est voisine de $1,265 \text{ g/cm}^3$.

Le DNA purifié et les cellules de *S. obliquus*, centrifugés en gradient de sucrose 15-65 % dans les mêmes conditions, sédimentent à des densités respectivement égales à $1,095$ et $1,255 \text{ g/cm}^3$.

Les fractions 6 à 15 (figure 79A ,p. 212), correspondant au 1^{er} pic radioactif, ont été rassemblées, dialysées contre du tampon TNE, et analysées par centrifugation en gradient de CsCl en vue de l'identification du matériel radioactif. Les résultats, illustrés par la figure 79B ,p 212 montrent que les molécules radioactives sédimentent dans le gradient en formant une distribution assez large dont le mode est situé à une position correspondant à une densité voisine de $1,717 \text{ g/cm}^3$, densité qui est assez proche de celle du DNA de l'algue. La RNase est sans effet sur ce matériel qui par contre est hydrolysé par action de la DNase.

Les fractions 37 à 53, correspondant au second pic radioactif de la figure 79A , ont également été rassemblées et dialysées contre du tampon TNE.

Dans ces fractions qui présentaient une légère coloration verte, par examen

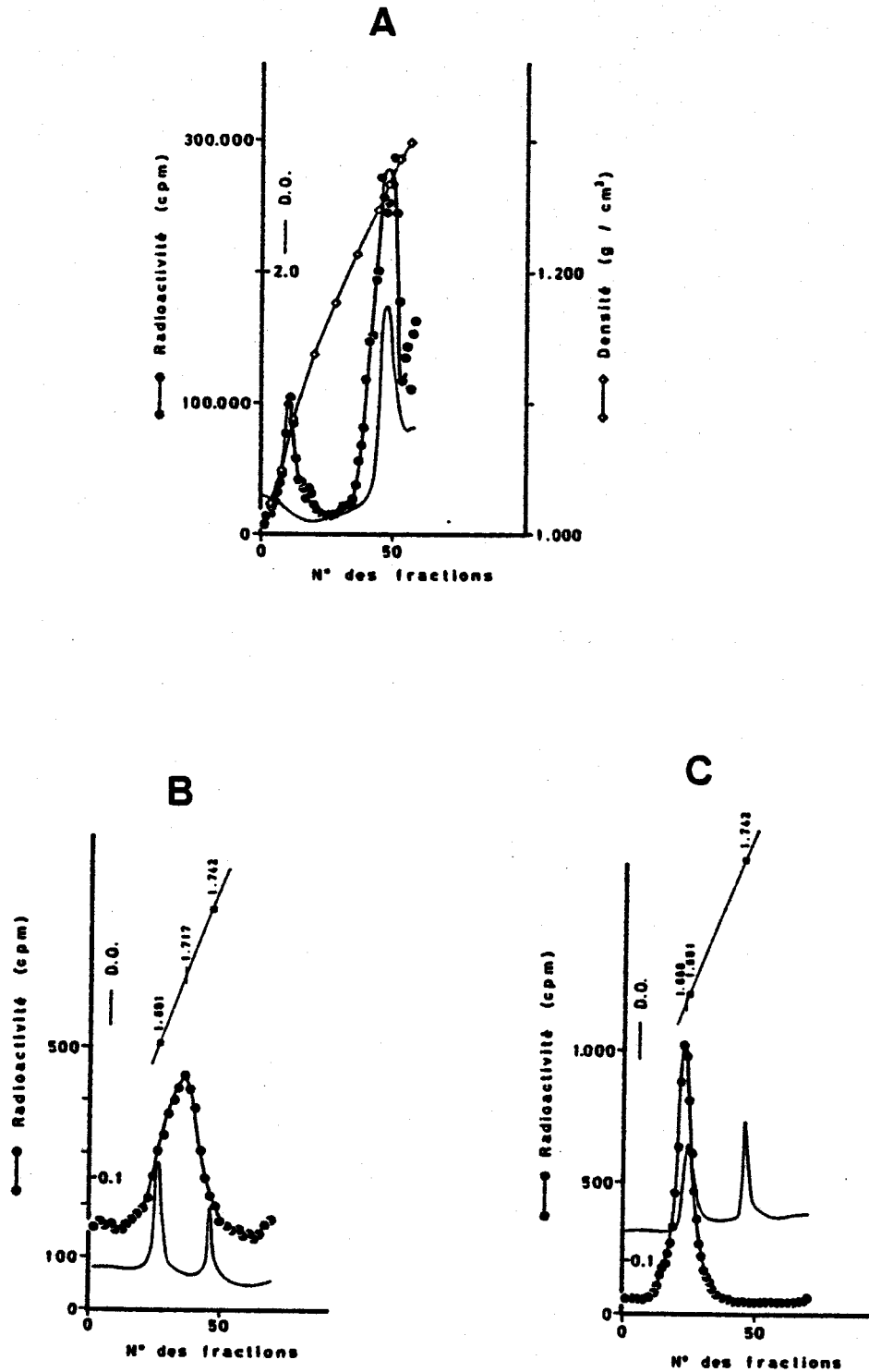


Fig. 79

Fig. 79A : analyse en gradient de sucrose 15-65% du culot de centrifugation du surnageant cellulaire d'une culture radioactive de *S. obliquus*.

Le gradient est caractérisé par la détermination de l'indice de réfraction de certaines fractions. Analyse en gradient de CsCl

Fig. 79B : fractions 6 à 15 de la fig. 79A

Fig. 79C : fractions 37 à 53 de la fig. 79A.

Références de densité : DNA de phage 2C (1,742 g/cm³), DNA de *Cl. perfringens* (1,691 g/cm³).



au microscope optique, nous avons décelé la présence de débris cellulaires et même de cellules. Ces matériaux ont été éliminés soit par une nouvelle centrifugation à basse vitesse, soit par filtration sur filtre Milipore 0,22 μm . Le surnageant et le filtrat ont été analysés et nous avons observé que la RNase et la DNase étaient sans effet sur le matériel radioactif. L'analyse par centrifugation en gradient de CsCl (figure 79C ,p. 212) montre que la radioactivité sédimente dans le gradient en formant une distribution assez étroite, à une position où la densité est égale à environ 1,688 g/cm^3 .

Nous avons aussi observé qu'après incubation à 37 °C pendant 60 min de ce matériel avec de la proteinase K (concentration = 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), le matériel radioactif devenait sensible à la DNase tandis que la RNase n'avait pas d'effet.

En résumé, ce matériel radioactif possède les caractéristiques suivantes :

densité en gradient de sucrose 1,265 g/cm^3

densité en gradient de CsCl 1,688 g/cm^3

n'est pas retenu par le filtre Millipore dont les pores ont un diamètre de 0,22 μm

est insensible à la DNase et à la RNase

semble être complexé à des protéines qui sont sensibles à l'action de la proteinase K.

après action de la proteinase K, devient sensible à la DNase tout en restant résistant à l'action de la RNase.

Ces différents caractères permettent d'exclure un ensemble d'organismes parasites tels que bactéries, champignons et virus à DNA ou à RNA. Par contre, il pourrait s'agir de mycoplasmes. Ces organismes ont été observés chez beaucoup d'espèces végétales. Les résultats de notre étude ne permettent cependant pas de donner une conclusion définitive.

Mais ces études permettent de donner une réponse claire à la question que nous nous étions posée, les cellules de *S. obliquus* ne sont-elles pas porteuses d'organismes parasites se développant en symbiose avec elles et qui pourraient donner lieu à une interprétation fautive de résultats que nous avons observés ? Même si de tels organismes existent, la réponse est nette et négative, du moins dans l'état actuel de nos connaissances. Ces examens biochimiques ont été complétés par une étude du matériel en microscope électronique.

La souche de *S. obliquus* n'avait pas encore fait l'objet d'une étude de ce genre. Par contre, les souches *S. pannonicus*, *S. longus* ont été étudiées par STAEHELIN et PICKETT-HEAPS (1975) et PICKETT-HEAPS et STAEHELIN (1975) et *S. obtusiusculus* par NILSHAMMAR et son groupe (1972, 1974, 1975 et 1976).

Nous avons essayé de préparer les cellules de *S. obliquus* pour l'examen en microscope électronique, en utilisant les procédés utilisés par ces auteurs. Nous n'avons pas obtenu de très bons résultats et nous avons dû modifier les méthodes. Deux procédés nous ont donné satisfaction, l'un par une technique de filtration sur filtre Millipore (les algues, en couche mince, sont traitées sur le filtre), l'autre par une technique en tube à essai (les algues sont traitées en culot).

Avec le premier procédé, les structures sont bien préservées dans toutes les cellules, tandis qu'avec le second procédé, les résultats sont très bons pour 30 % des cellules.

L'examen des coupes fines en microscope électronique a permis un certain nombre d'observations intéressantes : la plupart des cellules sont individuelles, mais nous avons également observé (photo 5, p. 216) des cellules autospores ; ce genre de cellules a été décrit et étudié par NILSHAMMAR (1975) chez *S. obtusiusculus*.

Nous avons observé des cénobes (photo 6), qui sont des groupes de 4 cellules, qui ont également été décrites chez *S. pannonicus* et *S. longus* par STAEHELIN et PICKETT-HEAPS (1975).

Sur la photo 7, on reconnaît les organelles et les structures observées normalement dans une algue verte unicellulaire, et on voit que la paroi cellulaire est constituée de 3 couches, comme celle de *S. obtusiusculus* (NILSHAMMAR et WALLEES, 1974). Nous avons également noté, assez rarement la présence de petits corps polyédraux, non encore décrits chez *Scenedesmus*. Ces structures sont assez semblables à celles décrites comme étant des corps lamellaires chez une algue rouge (McBRIDE et COLE, 1969), ou les lomasomes dans l'hyphe d'un champignon (WEISBERG et TURIAN, 1973). Nous avons examiné un grand nombre de cellules (plus de 20 000), et nous n'avons jamais observé de structure qui aurait pu faire penser à la présence de virus ou de mycoplasme. Dans 2 ou 3 cellules, nous avons observé la présence de "structures" qui pourraient être semblables aux particules "virus-like" (BROWN, 1972 ; TOTH et WILCE, 1972 ; CHAPMAN et LANG, 1973).

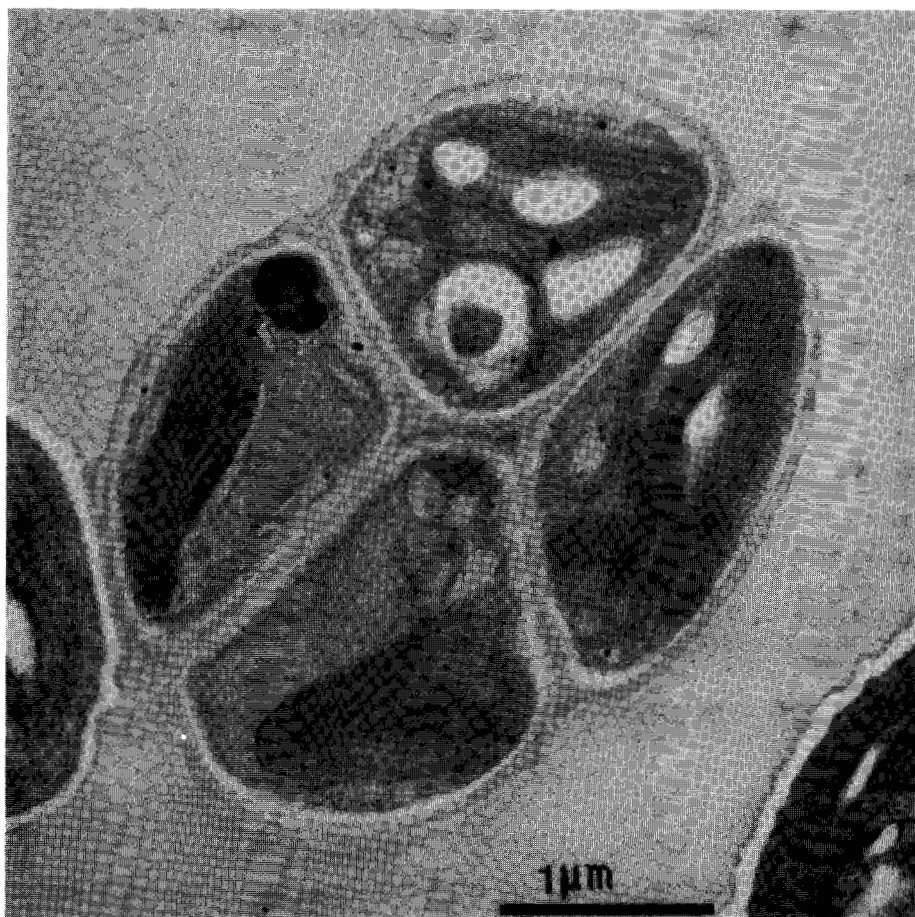


PHOTO 5

Photographie au microscope électronique de *S. obliquus* (autospore)



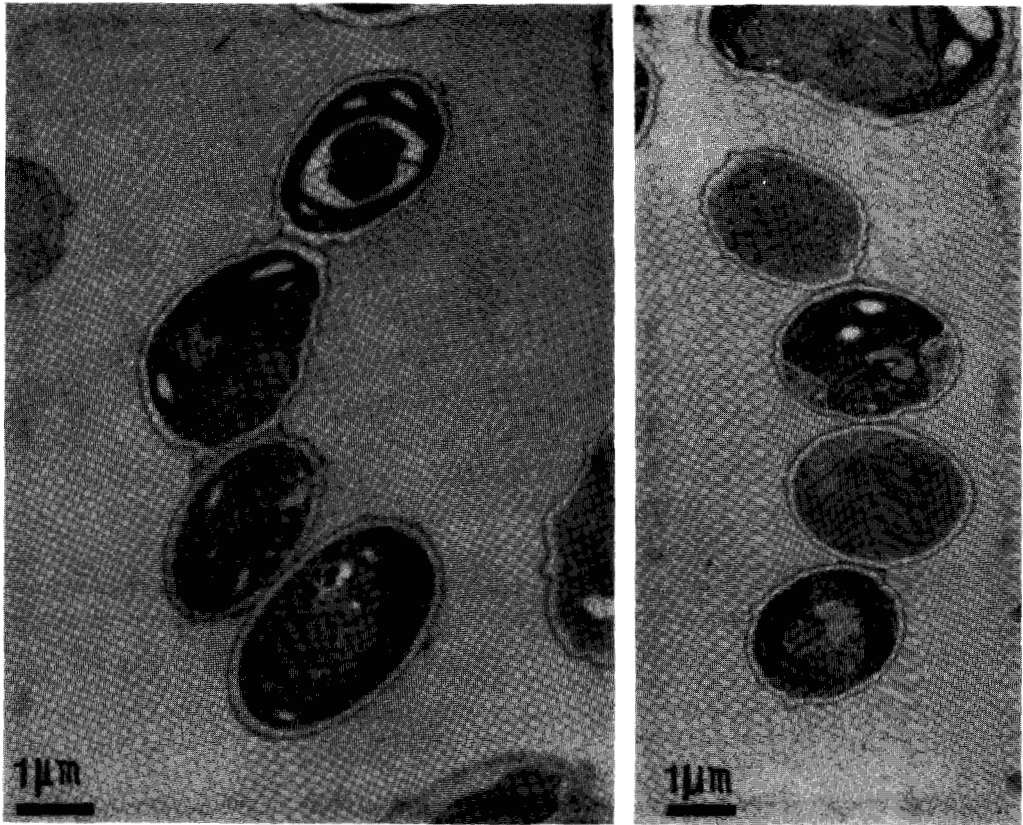
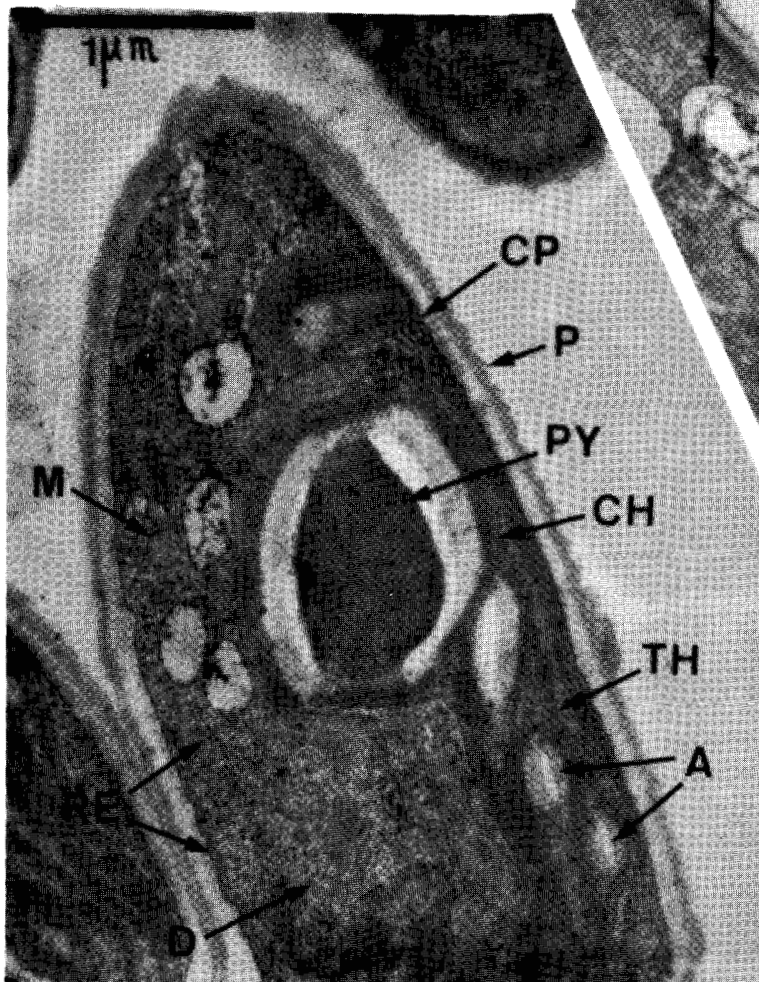
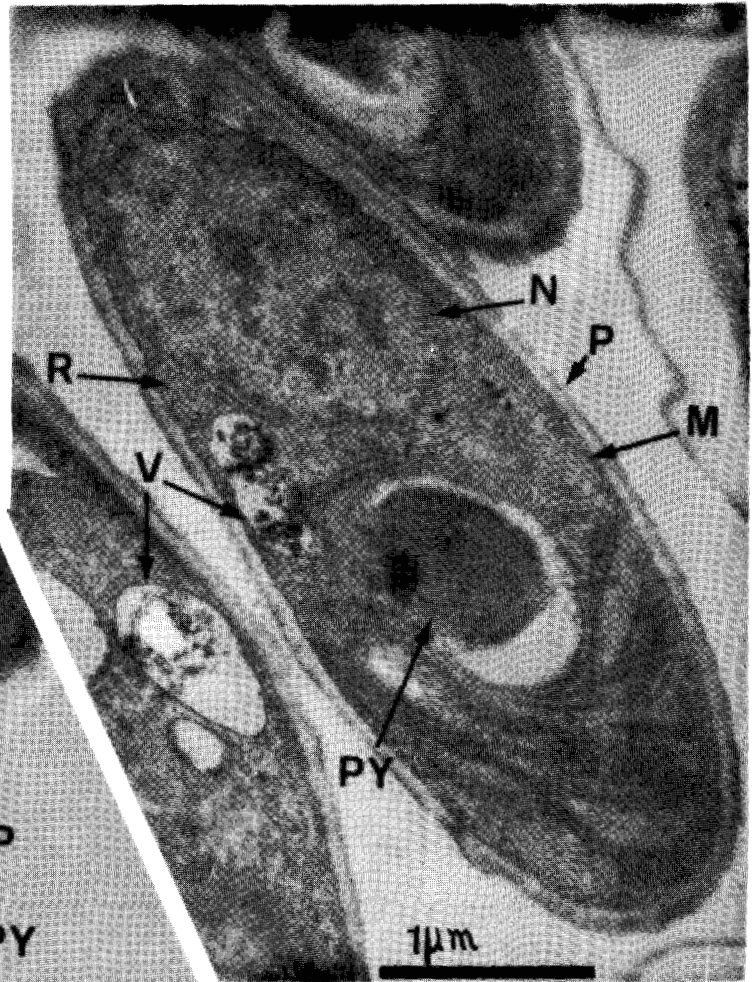


PHOTO 6

Photographie au microscope électronique de *S. obliquus* (cenobes)



N : noyau
 M : mitochondrie
 PY : pyrénôïde
 V : vacuole
 R : ribosomes
 P : paroi cellulaire



M : mitochondrie
 CH : chloroplaste
 TH : thylacoïdes
 PY : pyrénôïde
 D : dictyosome
 RE : réticulum endoplasmique
 A : amidon
 CP : corps paramural
 P : paroi cellulaire

PHOTO 7

Photographie au microscope électronique de *S. obliquus*



8. EFFET DE L'IRRADIATION AUX R.X.

On sait que chez beaucoup d'organismes, l'irradiation modifie la perméabilité cellulaire et il nous a paru intéressant de voir si l'irradiation pouvait modifier dans un sens ou dans l'autre le phénomène que nous avons étudié.

L'irradiation par les R.X. des cellules a été faite en nous basant sur les travaux de OZENDA (1965) et en extrapolant à *S. obliquus* les résultats observés avec *S. crassus* pour qui la dose létale à 50 % est d'environ 7500 R.

Les cellules, directement après l'incubation à différentes doses, sont incubées avec du DNA de *M. lysodeikticus* dans des conditions identiques à celles décrites auparavant.

L'analyse en gradient de CsCl des DNA purifiés extraits des cellules irradiées et non-irradiées, a donné des résultats identiques, à savoir que la radioactivité sédimente dans le gradient en formant 2 pics, dont le principal à une position où la densité est égale à $1,731 \text{ g/cm}^3$ (densité du DNA bactérien utilisé), le second à une position où la densité est égale à $1,712 \text{ g/cm}^3$ (densité du DNA de l'algue).

Connaissant l'activité spécifique du DNA bactérien utilisé, il est possible d'estimer que le DNA bactérien représente environ 0,1 % du DNA total.

Ce pourcentage est le même, que les cellules aient été irradiées ou non.

9. ESSAIS D'INCUBATION AVEC DU DNA BACTERIEN COMPLEXE

Dans nos expériences précédentes, nous avons choisi comme milieu d'incubation du tampon phosphate (pH = 6,0) dans lequel était dissous à la concentration voulue le DNA tritié bactérien.

Des travaux récents (GRAHAM et VAN DER EB, 1973) ont montré que lorsque le DNA est dissous dans du tampon HeBS*, l'addition de CaCl₂ (concentration = 0,12 M) entraîne la formation de phosphate de Ca insoluble qui complexe le DNA.

Dans ces conditions, la prise d'un DNA viral par des cellules en culture est augmentée par un facteur 100 environ.

Nous avons essayé de voir si dans ces conditions expérimentales la prise de DNA bactérien exogène par les cellules serait augmentée.

Les cellules (concentration cellulaire : $1,8 \times 10^6$ cellules/ml) ont été incubées pendant 2 h avec 30 µg/ml de DNA ³H de *M. lysodeikticus* (radioactivité spécifique = $1,4 \times 10^6$ dpm/µg) complexé avec du phosphate de Ca dans du milieu HeBS. En fin d'incubation, les cellules ont été lavées puis remises en culture (après prélèvement d'une aliquote) pour 72 h dans du milieu contenant du DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus* à la concentration de 30 µg/ml.

En fin d'incubation avec le DNA ³H bactérien et en fin d'expérience (après 72 h de culture), les cellules ont été lavées et incubées dans une solution de DNase avant d'être analysées, et des étalements sur lames de microscope ont été faites en vue d'une étude par autoradiographie.

* HeBS : 8,0 g/l NaCl/0,37 g/l KCl/0,125 g/l Na₂HPO₄·2H₂O/ 1,0 g/l dextrose /5,0 g/l Hepes

a) Analyse de l'échantillon en fin d'incubation

Le DNA extrait des cellules a été purifié par filtration sur gel d'agarose puis analysé par centrifugation en gradient de CsCl.

Les résultats, illustrés par la figure 80A (p. 222), montrent que la radioactivité est portée par des molécules qui sédimentent à une position dont la densité correspond à celle du DNA de *M. lysodeikticus* (1,730 g/cm³).

Par le calcul, on peut estimer que la radioactivité représente une quantité de DNA bactérien égale à environ 20 % du DNA total.

b) Analyse de l'échantillon après 72 heures de culture

La figure 80B illustre les résultats de l'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules et purifié par filtration sur colonne de Sepharose 4B. On voit que la radioactivité est portée par des molécules qui sédimentent à une densité égale à la densité du DNA bactérien utilisé (1,730 g/cm³).

Dans ce cas, la quantité de DNA radioactif représente environ 5 % du DNA total. Tout en tenant compte que la quantité de DNA cellulaire a doublé en cours d'expérience (72 h de culture), on voit qu'une partie de la radioactivité (environ la moitié) a été relâchée par les cellules. Cette observation est confirmée par l'analyse du surnageant acellulaire en fin de chasse.

L'examen des frottis après autoradiographie montre que la radioactivité visualisée par la présence des grains d'argent est principalement

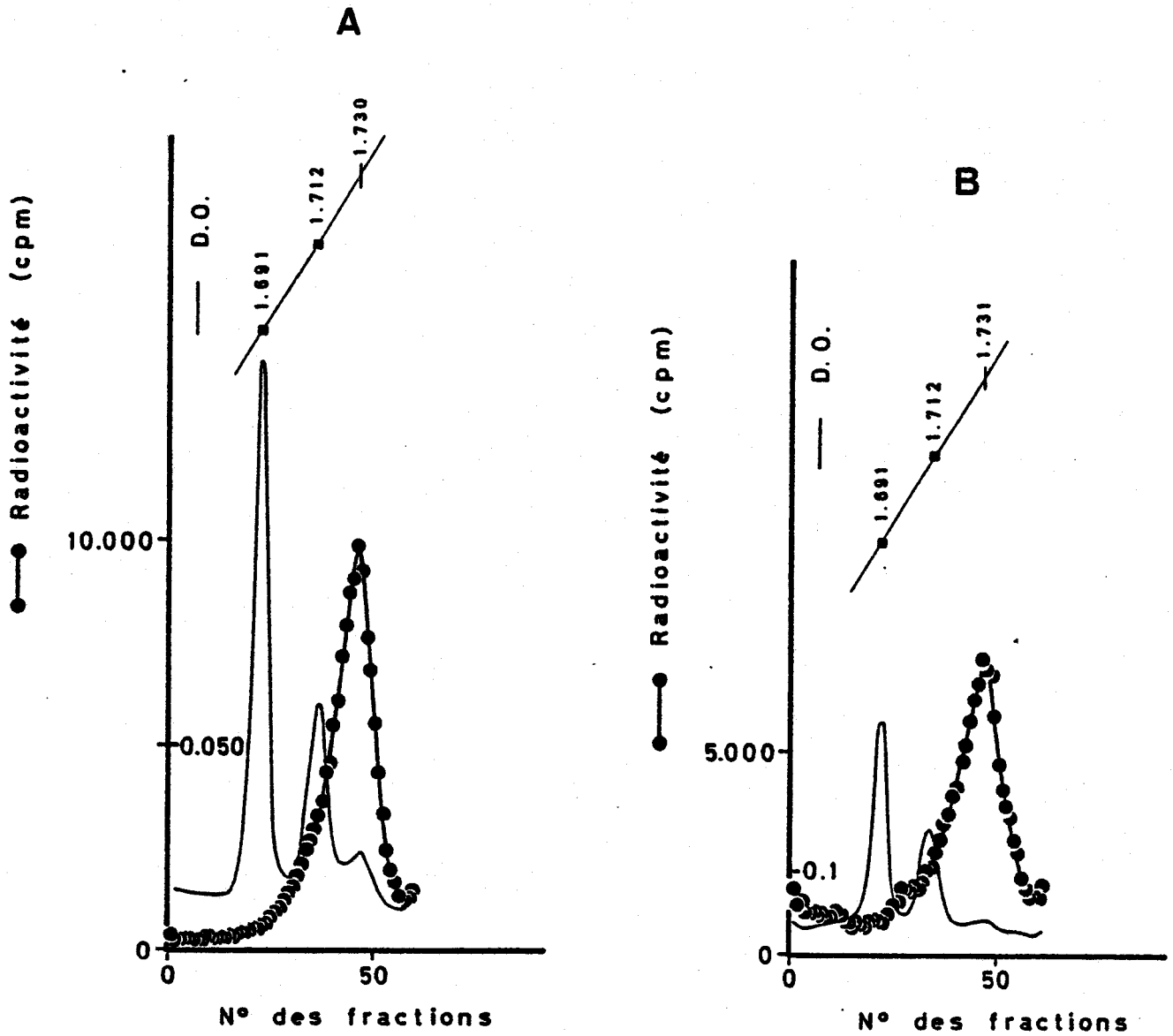


Fig. 80

Analyse en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules de *S. obliquus*.

A : en fin d'incubation avec le DNA ^3H de *M. lysodeikticus* complexé au phosphate de Ca.

B : après incubation avec le DNA ^3H de *M. lysodeikticus* complexé au phosphate de Ca et après 72 h de culture en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*.

Référence de densité : DNA de *C. perfringens* ($1,691 \text{ g/cm}^3$).



localisée au niveau des cellules, et il semble que le nombre de grains par cellule et le nombre de cellules porteuses de grains soient plus élevés que lorsque les cellules sont incubées dans les autres conditions.

10. CONCLUSIONS

1. Il semble que les cellules de *S. obliquus* absorbent mieux le DNA de *M. lysodeikticus* lorsqu'elles se trouvent au début de la phase exponentielle de croissance, sans toutefois qu'on puisse parler de phase préférentielle de prise.
2. L'analyse par centrifugation en gradient de CsCl du DNA extrait des cellules en fin d'incubation avec le DNA ^3H de *M. lysodeikticus* montre que la radioactivité est portée principalement par des molécules polymérisées dont la densité est égale à celle du DNA de *M. lysodeikticus*. On observe également dans la distribution un léger épaulement à la densité du DNA de l'algue. L'analyse du DNA extrait des cellules en fin d'expérience après 72 h de culture en présence de DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus* donne qualitativement les mêmes résultats. La quantité de DNA radioactif, estimée à partir de la radioactivité spécifique du DNA ^3H de *M. lysodeikticus* utilisé, représente environ 0,30 %, en fin d'incubation (de 2 h), et environ 0,1 %, en fin d'expérience (72 h) après environ 1 division cellulaire, du DNA total.
3. L'examen de frottis et de coupes après autoradiographie montre que la radioactivité est principalement intracellulaire.
4. L'analyse par hybridation moléculaire a montré qu'après dénaturation et renaturation en présence d'un excès de DNA de *M. lysodeikticus* non-radioactif, il y a par réassociation formation d'hybrides dont le point de fusion, estimé par élution thermique sur colonne d'hydroxylapatite, était égal à celui du DNA de *M. lysodeikticus*.

5. L'étude de la prise et du sort de DNA de *B. subtilis*, dont la densité est différente de celle du *M. lysodeikticus*, a donné des résultats comparables à ceux obtenus avec la DNA de *M. lysodeikticus*. L'analyse du DNA extrait des cellules en fin d'expérience a montré que la radioactivité est portée par des molécules dont la densité est égale à celle du DNA bactérien utilisé. Dans ce cas toutefois, le DNA de *B. subtilis*, extrait des cellules, est dépolymérisé.
6. Il ne semble pas exister chez *S. obliquus* de contaminants qui pourraient donner lieu à une interprétation erronée des résultats observés.
7. L'irradiation par des R.X. des cellules avant l'incubation avec le DNA bactérien exogène ne semble pas modifier, ni qualitativement ni quantitativement, le phénomène observé.
8. Il semble qu'en incubant les cellules dans un milieu où le DNA bactérien est complexé avec du phosphate de Ca insoluble, le phénomène de prise de DNA puisse être augmenté par un facteur de 50 environ.

CONCLUSIONS GENERALES

La première partie de notre travail a consisté à étudier et à caractériser le matériel utilisé, et tout d'abord les organismes récepteurs.

Après avoir arrêté notre choix à cinq espèces d'algues eucaryotes unicellulaires, *Euglena gracilis*, *Ochromonas danica*, *Polyedriella helvetica*, *Porphyridium cruentum* et *Scenedesmus obliquus* qui sont, croyons-nous, représentatives des différentes familles d'algues unicellulaires, nous avons recherché et défini les conditions de culture : milieu - illumination - aération - température etc.

A cette série d'algues, nous avons ajouté l'algue procaryote unicellulaire *Anacystis nidulans* qui avait déjà fait l'objet de recherches génétiques, dont il existait des mutants bien caractérisés et chez qui la transformation induite par du DNA exogène avait été réalisée. Comme l'étude biochimique de la prise de DNA hétérologue n'avait pas été faite chez cette algue, nous espérons en faire le contrôle "positif" tout en étant conscient que les résultats ne pourraient pas nécessairement être extrapolés aux organismes que nous nous proposons d'étudier. En effet, nous passons d'un monde, celui des procaryotes où le matériel génétique est rassemblé dans un chromosome plus ou moins libre à l'intérieur de la cellule, dans un autre monde, celui des eucaryotes où le matériel génétique est réparti sur plusieurs chromosomes eux-mêmes isolés au sein d'une structure bien spéciale, le noyau.

A partir de culots de cellules, nous avons extrait le DNA dans le

but de le caractériser.

Nous avons vérifié que le matériel étudié était représentatif aussi bien qualitativement que quantitativement de ce qui existe à l'intérieur des cellules.

Pour *A. nidulans* et *E. gracilis*, nous avons confirmé les valeurs de la densité citées dans la littérature.

Pour *O. danica*, *P. helvetica* et *P. cruentum*, on observe, à côté du DNA principal, un DNA satellite dont nous avons déterminé la densité et le pourcentage.

Pour *S. obliquus*, nous n'avons jamais observé qu'une seule espèce de DNA et ce résultat est en désaccord avec ceux publiés par SSYMANK et al. (1976), qui dans la souche D3 (provenant de l'allothèque de Göttingen) ont signalé la présence d'un DNA satellite dont la densité est de 20 mg/cm^3 inférieure à celle du DNA principal.

Chez *A. nidulans*, en recherchant une méthode de lyse qui permettait une extraction quantitative du DNA, nous avons observé qu'après l'action combinée de plusieurs agents lytiques, deux types de polysaccharides étaient libérés dans le milieu. Ces polysaccharides ont en gradient de CsCl des densités proches de celle du DNA et peuvent de ce fait simuler des DNA satellites. L'un de ces polysaccharides présent en quantité assez importante a été analysé. Il est constituée presque exclusivement de glucose et offre beaucoup de ressemblance avec le glycogène. Il sert vraisemblablement, comme ce dernier, de substance de réserve aux cellules.

Il a été montré que les polysaccharides isolés à partir du manchon ou de la paroi cellulaire d'*A. nidulans*, étaient de nature complexe (DREWS et MEYERS, 1964 ; FOGG et al., 1973) et composés principalement de mannose (DREWS et GOLLWITZER, 1965).

Pour pouvoir étudier la prise d'un DNA exogène, il faut qu'il soit différent des DNA des cellules hôtes. Notre choix s'est porté sur le DNA de *Micrococcus* dont la densité en gradient de CsCl est nettement différente de celles des DNA principaux et satellites des organismes récepteurs.

Il est possible d'obtenir le DNA de *Micrococcus* porteur d'une radioactivité spécifique élevée, de 0,5 à 3×10^6 dpm/ μ g. Ce DNA se prépare assez facilement et on peut l'obtenir hautement polymérisé (poids moléculaire de 10 à 60×10^6 daltons). En fin de préparation, chaque lot a été analysé en vue de déterminer le poids moléculaire, la radioactivité spécifique, la densité.

En étudiant l'infection de la souche *M. lysodeikticus* M L 1 par le phage N1 (LEE et al., 1968), LEE et DAVIDSON (1968) ont signalé la présence de minicercles dans le DNA de cette souche. Nous avons recherché les formes circulaires dans le DNA des différentes souches dont nous disposions. Par centrifugation en gradient de CsCl en présence de bromure d'éthidium, nous avons montré l'existence dans toutes nos souches de molécules de DNA circulaire dont la densité en gradient de CsCl est comparable à celle du DNA chromosomique, excepté pour la souche ATCC 4698, souche sauvage chez qui la densité du DNA des formes circulaires est de 6 mg/cm^3 inférieure à celle du DNA du chromosome.

L'intégrité des molécules de DNA de nos préparations a été testée par centrifugation à pH alcalin et par l'étude du pouvoir transformant.

Par la technique de KLOOS (1969a) et avec une souche de *M. lysodeikticus* auxotrophe pour le tryptophane, nous avons obtenu, avec diverses préparations de DNA, des pourcentages de transformation élevés (0,1 %) qui étaient comparables à ceux obtenus par KLOOS.

Lors des essais préliminaires dans le but de définir les conditions d'incubation les plus favorables (milieu - température - concentration cellulaire - concentration en DNA exogène - durée d'incubation etc.), nous avons utilisé une technique d'analyse simple - le Schmidt-Thanhauser, pour la détermination de la radioactivité acido-insoluble liée aux cellules.

Pour l'étude de la prise de DNA exogène, nous avons utilisé l'ultracentrifugation en gradient de CsCl qui permet une caractérisation des molécules radioactives (densité - état de polymérisation).

L'identification des molécules radioactives extraites des cellules a parfois été complétée par hybridation moléculaire suivie d'une analyse par thermo-chromatographie sur hydroxylapatite des hybrides après réassociation moléculaire. Cette méthode a une spécificité et une sensibilité plus grandes que les méthodes précédentes.

Avec *A. nidulans*, nous avons pu étudier en parallèle les aspects biochimiques et génétiques de la prise de DNA exogène - homologue ou hétérologue.

Nous avons observé un moment préférentiel de prise de DNA exogène

qui se situe au même moment que la phase de compétence décrite par ORKWISZEWSKI et KANEY (1974). Nous avons obtenu, avec du DNA d'*A. nidulans*, des pourcentages élevés de transformation (0,2 %), comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs avec d'autres mutants.

Par contre, les essais de transformation induite par du DNA de *M. lysodeikticus* ont été négatifs. Le DNA extrait des cellules après l'incubation avec du DNA tritié de *M. lysodeikticus* était radioactif, mais l'analyse en gradient de CsCl a montré que la radioactivité est portée par des molécules qui ont la densité du DNA d'*A. nidulans*. D'autre part, l'analyse par hybridation moléculaire a montré que la radioactivité est portée par des molécules qui ne se réassocient pas après dénaturation avec du DNA non-radioactif de *M. lysodeikticus*. Ceci permet de supposer que le DNA bactérien est hydrolysé dans les cellules et que les produits de dégradation servent aux synthèses endogènes.

Avec les algues eucaryotes (tout comme avec *A. nidulans*) l'analyse du milieu d'incubation a montré que le DNA bactérien était peu modifié, ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas ou peu de nucléases excrétées dans le milieu par les cellules.

Chez *E. gracilis* et *P. helvetica*, les résultats obtenus se ressemblent. En fin d'incubation, la radioactivité présente dans les cellules est portée par des molécules de faible poids moléculaire qui ne sédimentent pas dans le gradient de CsCl, provenant d'une dégradation intracellulaire du DNA bactérien.

Des résultats analogues ont été obtenus par LURQUIN et BEHKI (1975)

qui, utilisant l'algue verte eucaryote *Chlamydomonas reinhardi*, ont observé une faible prise de DNA bactérien par les cellules. Le DNA étranger est rapidement hydrolysé à l'intérieur des cellules et, pour cette algue, les produits de dégradation sont réutilisés pour les synthèses de DNA endogène.

Pour *O. danica*, la situation est légèrement différente. En fin d'incubation, la radioactivité présente dans les cellules est portée par des molécules de poids moléculaire assez faible qui ont en gradient de CsCl la même densité que celle du DNA bactérien utilisé. Mais lorsque ces cellules sont remises en culture pour une ou deux générations dans du milieu de culture normal, le DNA bactérien est rejeté et on n'observe pratiquement plus de radioactivité dans les cellules.

Chez l'algue rouge *P. cruentum*, le sort du DNA bactérien est différent. En fin d'incubation, la radioactivité extraite des cellules est portée par des molécules polymérisées qui ont la même densité que celle du DNA bactérien utilisé et cette radioactivité représente une quantité de DNA égale à environ 0,08 % du DNA total. Lorsque ces cellules sont remises en culture dans du milieu normal pour une génération, on voit que la radioactivité est portée par des molécules qui ont la même densité que celle du DNA bactérien et qui représentent une quantité de DNA égale à environ 0,04 % du DNA total. Dans ce cas, il semble que le DNA étranger ne soit ni modifié ni rejeté par les cellules.

Qualitativement, des résultats semblables ont été obtenus avec l'algue verte *S. obliquus*, mais dans ce cas, le DNA étranger représente environ 0,1 % du DNA total, après division cellulaire.

La quantité de radioactivité présente dans les cellules en fin d'expérience a permis quelques examens complémentaires.

C'est ainsi que l'autoradiographie soit sur frottis soit sur coupes histologiques a montré que la radioactivité était principalement localisée à l'intérieure des cellules. Vu la petite taille des cellules et la difficulté de différentier le noyau, nous n'avons pas pu nous rendre compte si la localisation était nucléaire ou cytoplasmique.

Les molécules radioactives ont aussi été analysées par hybridation moléculaire et l'analyse a montré qu'une partie importante des molécules radioactives, après dénaturation et renaturation, étaient réassociées pour former un hybride dont la température de fusion déterminée par élution thermique était voisine sinon identique à celle du DNA de *M. lysodeikticus* analysé dans les mêmes conditions.

Lorsque, au lieu de DNA de *M. lysodeikticus*, on utilise un autre DNA bactérien dont la densité est différente (DNA de *S. subtilis*, $d = 1,703 \text{ g/cm}^3$), on observe le même genre de résultats, les molécules radioactives extraites des cellules en fin d'expérience ayant la densité du DNA bactérien utilisé.

Par des études biochimiques et par examen en microscope électronique, nous avons pu éliminer la présence, dans les algues *S. obliquus*, d'organismes contaminants qui pourraient donner lieu à une fausse interprétation des résultats.

Parmi les agents extérieurs qui pourraient modifier le phénomène, nous avons étudié les effets de l'irradiation par les rayons X. Dans nos

conditions expérimentales, c'est-à-dire, l'irradiation des cellules de *S. obliquus* avant l'incubation dans le milieu contenant le DNA bactérien radioactif, le phénomène n'est pas modifié ni qualitativement, ni quantitativement.

Par contre, nous avons observé que lorsque le DNA bactérien est complexé avec du phosphate de calcium, on observe une prise beaucoup plus importante, jusqu'à 50 fois plus, de DNA étranger par les cellules de *S. obliquus*.

Il semble donc, que dans nos conditions expérimentales, certaines algues soient capables de prendre et de garder du DNA exogène bactérien.

Nous ne savons pas si ce DNA étranger est capable de s'exprimer, et c'est cet aspect du problème qui retiendra notre attention dans le futur.

Le fait de pouvoir introduire chez ces organismes des informations génétiques qui pourraient améliorer leur qualité nutritive, qui pourraient les rendre plus indépendants du milieu extérieur, qui pourraient les rendre résistants vis-à-vis de certaines agressions du milieu extérieur, n'est plus tout à fait du domaine de la science fiction.

RESUME GENERAL

1. Il existe chez *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, souche sauvage, des plasmides dont la fonction n'est pas connue et dont le DNA a une densité légèrement inférieure à celle du DNA du chromosome.
2. Chez *Sarcina flava*, des formes circulaires de DNA existent également, mais la densité est la même que celle du DNA du chromosome.
3. Le DNA principal et le DNA satellite (quand il existait), ont été caractérisés chez cinq espèces d'algues eucaryotes.
4. Chez *Anacystis nidulans*, algue bleue procaryote, il existe un moment préférentiel de prise de DNA exogène - homologue ou hétérologue, qui semble coïncider avec la phase de compétence décrite par certains auteurs. Nos essais de transformation hétérologue ont été négatifs et l'analyse biochimique a montré que le DNA bactérien absorbé par les cellules était très rapidement dégradé à l'intérieur de celles-ci.
5. Nous n'avons pas observé dans nos conditions expérimentales, de présence de DNA polymérisé bactérien dans les cellules d'algues eucaryotes *Euglena gracilis* et *Polyedriella helvetica*.
6. Avec *Ochromonas danica*, on observe une absorption de DNA bactérien, mais les molécules étrangères sont rejetées lorsque les cellules sont remises en culture dans du milieu normal.

7. Avec *Porphyridium cruentum* et *Scenedesmus obliquus*, on observe une absorption de DNA bactérien. Lorsque les cellules sont remises en culture dans du milieu normal, des molécules radioactives ayant la densité du DNA étranger sont encore observées dans les cellules après une ou deux divisions. La radioactivité représente une quantité de DNA bactérien égale à environ 0,04 % et à 0,1 % respectivement, du DNA total.
8. Chez *Scenedesmus obliquus*,
- a) une localisation intracellulaire de la radioactivité a pu être montrée par autoradiographie sur coupes ;
 - b) les recherches de contaminants éventuels par étude biochimique et par examen des cellules en microscopie électronique ont été négatives ;
 - c) la densité des molécules radioactives extraites des cellules en fin d'expérience correspond à la densité du DNA avec lequel les cellules ont été incubées (1,731 g/cm³ quand il s'agit de DNA de *Micrococcus lysodeikticus*, 1,703 g/cm³ quand l'expérience a été menée avec du DNA de *Bacillus subtilis*) ;
 - d) l'irradiation par les R.X. des cellules avant l'incubation avec le DNA bactérien radioactif, ne modifie pas le phénomène ni qualitativement, ni quantitativement ;
 - e) une augmentation très importante de la quantité de DNA absorbée par les cellules est observée lorsque le DNA bactérien est complexé avec du phosphate de calcium.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER, H.I., FISHER, W.D., COHEN, A. and HARDIGREE, A.A., (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 321
- ALLEN, M.M., (1968), J. Phycol., 4, 1
- ALLOWAY, J.L., (1933), J. Exptl. Med., 57, 265
- ALTMANN, R., (1889), Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 524
- ASATO, Y. and FOLSOME, C.E., (1970), Genetics, 65, 407
- ASTIER, C. et ESPARDELLIER, F., (1976), C.R. Acad. Sc. Paris, 282, 795
- AVERY, O.T., MAC LEOD, C.M. and MAC CARTY, M., (1944), J. Exptl. Med., 79, 137
- BAUER, W. and VINOGRAD, J., (1968), J. Mol. Biol., 33, 141
- BAZIN, M.J., (1968), Nature, Lond. 218, 282
- BERNARDI, G., (1965), Nature, 206, 779
- BHARGAVA, P.M. and SHANMUGAM, G., (1971), Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 11, 103
- BODMER, W.F., (1965), J. Mol. Biol., 14, 534
- BOIVIN, A., VENDRELY, R. et VENDRELY, C., (1948), C.R. Acad. Sc., 223, 1061
- BORENFREUND, E., ROSENKRANZ, H.S. and BENDICH, A., (1959), in F. Stohlman (Ed.), The Kinetics of Cellular Proliferation, Grune et Stratton, New York and London, p. 130
- BOYCE, R.P. and SETLOW, R.B., (1962), Biochim. Biophys. Acta, 61, 618
- BRACHET, J., (1933), Arch. Biol., 44, 519
- BRAWERMAN, G. and EISENSTADT, J.M., (1964), Biochim. Biophys. Acta, 91, 477
- BRITTEN, R.J. and KOHNE, D.E., (1968), Science, 161, 529
- BRITTEN, R.J., GRAHAM, D.E. and NEUFELD, B.R., (1974), in L. Grossman and K. Moldave (Eds.), Methods in Enzymology, Academic Press, New York and London, vol. 29, p. 363

- BROWN, R.M., (1972), *Adv. Virus Res.*, 17, 243
- BURCZYK, J., (1973), *Folia Histochem. Cytochem.*, 11, 135
- CHAPMAN, R.L. and LANG, N.J., (1973), *J. Phycol.*, 9, 117
- CHARLES, D., (1977a), *Plant Sci. Letters*, 8, 35
- CHARLES, D., (1977b), in A. Portolés, R. Lopez and M. Espinosa (Eds.), *Modern Trends in Bacterial Transformation and Transfection*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 107
- CHARLES, P., (1967), Thèse de Doctorat, Université de Lille
- CHARLES, P., (1972), in L. Ledoux (Ed.), *Uptake of Informative Molecules by Living Cells*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, p. 10
- CHARLES, P., (1975), in L. Ledoux (Ed.), *Genetic Manipulations with Plant Material*, Plenum Press, New York and London, p. 405
- CLARKE, J.L., (1851), *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 141, 607
- CLEWELL, D.B. and HELINSKI, D.R., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 62, 1159
- CLOWES, R.C., (1972), *Bacteriol. Rev.*, 36, 361
- COOK, J.R., (1971), in A. San Pietro (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York and London, vol. 23, p. 74
- COUNTS, W.B. and FLAMM, W.G., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, 114, 628
- CRAIG, I.W., LEACH, C.K. and CARR, N.G., (1969), *Arch. Mikrobiol.*, 65, 218
- CRAMER, M. and MYERS, J., (1952), *Arch. Mikrobiol.*, 17, 384
- CRAWFORD, L.V. and WARING, M.J., (1967), *J. Mol. Biol.*, 25, 23
- CROTHERS, D.M. and ZIMM, B.H., (1965), *J. Mol. Biol.*, 12, 525
- DAVERN, C.I., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 55, 792
- DAWSON, M.H. and SIA, R.H.P., (1931), *J. Exptl. Med.*, 54, 681
- DMITRIEV, A.P. and GRODZINSKY, D.M., (1975), *Plant Sci. Letters*, 4, 77

- DOBSON, R.L. and COOPER, M.F., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 254, 393
- DREWS, G. and GOLLWITZER, W., (1965), *Arch. Mikrobiol.*, 51, 179
- DREWS, G. and MEYER, H., (1964), *Arch. Mikrobiol.*, 48, 259
- DUBNAU, D., GOLDWHAITE, C., SMITH, I. and MARMUR, J., (1967), *J. Mol. Biol.*, 27, 163
- EDELMAN, M., (1975), *Anal. Biochem.*, 65, 293
- EDELMAN, M., COWAN, C.A., EPSTEIN, H.T. and SCHIFF, J.A., (1964), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 52, 1214
- EDELMAN, M., SWINTON, D., SCHIFF, J.A., EPSTEIN, H. and ZELDIN, B., (1967), *Bacteriol. Rev.*, 35, 315
- EDMUNDS, L.N., (1964), *Science*, 145, 266
- EDMUNDS, L.N., (1965), *J. Cell. Comp. Physiol.*, 66, 147
- EDWARDS, M.R., BERNS, D.S., GHIORSE, W.C. and HOLT, S.C., (1968), *J. Phycol.*, 4, 283
- EIGNER, J., (1968), in L. Grossman and K. Moldave (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York and London, vol. 12, part B, p. 386
- EIGNER, J. and DOTY, P., (1965), *J. Mol. Biol.*, 12, 549
- EPHRUSSI-TAYLOR, H. and FREED, B.H., (1964), *J. Bacteriol.*, 87, 1211
- FEULGEN, R., BEHRENS, M. and MAHDIAASSAN, S., (1937), *Z. Physiol.*, 246, 203
- FEULGEN, R. and ROSSENBECK, H., (1924), *Hoppe-Seyler's Ztschr.*, 135, 203
- FLAMM, W.G., BIRNSTIEL, M.L. and WALKER, P.M.B., (1969), in G.D. Birnie and S.H. Fox (Eds.), *Subcellular Components. Preparation and fractionation*, Butterworth, London, p. 125
- FLAMM, W.G., BIRNSTIEL, M.L. and WALKER, P.M.B., (1972), in G.D. Birnie (Ed.), *Isopycnic centrifugation of DNA. Methods and Application, Subcellular Components, Preparation and fractionation*, Butterworth, London, p. 279

- FLEMING, A., (1922), Proc. R. Soc. B., 93, 306
- FOGG, G.E., STEWART, W.D.P., FAY, P. and WALSBY, A.E., (1973), The Blue-green Algae, Academic Press, London
- GANTT, E. and CONTI, S.F., (1969), J. Bact., 97, 1486
- GENSE, M.T., GUERIN-DUMARTRAIT, E., LECLERC, J-C. et MIHARA, S., (1969), Phycologia, 8, 135
- GLASER, V.M., AL-NURI, M.A., GROSHEV, V.V. and SHESTAKOV, S.V., (1973), Arch. Mikrobiol., 92, 217
- GRAHAM, F.L. and VAN DER EB, A.J., (1973), Virology, 52, 456
- GRIFFITH, F., (1928), J. Hyg., Camb. 27, 113
- GUDE, W.D., (1968), Autoradiographic Techniques, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.
- HERDMAN, M., (1973a), in L. Archer (Ed.), Bacterial Transformation, Academic Press, p. 369
- HERDMAN, M., (1973b), Molec. Gen. Genetics, 120, 369
- HERDMAN, M. and CARR, N.G., (1971), J. Gen. Microbiol., 68, XIV
- HEYN, R.F., HERMAN, A.K. and SCHILPEROORT, R.V., (1974), Plant Sci. Letters, 2, 73
- HOTCHKISS, R.D., (1949), Colloque Intern. CNRS, 8, 57
- HOTCHKISS, R.D., (1952), in Mc Elroy and Glass (Eds.), Phosphorus Metabolism, vol. 2, p. 426
- HOUGH, L., JONES, J.K.N. and WADMAN, W.H., (1952), J. Chem. Soc., 3393
- HUGHES, E.D., GORHAM, P.R. and ZEHNDER, A., (1958), Can. J. Microbiol., 4, 225
- HUMPHREYS, G.O., WILLSHAW, G.A. and ANDERSON, E.S., (1975), Biochim. Biophys. Acta, 383, 457

- JACOB, F. and WOLLMAN, E.L., (1958), C.R. Acad. Sc. Paris, 247, 154
- JOFTES, D.R. and WARREN, S., (1955), J. Biol. Photogr. Assoc., 23, 145
- JOHANSEN, D.A., (1940), Plant Microtechnique, Mc Graw-Hill Book Company, New York and London, p. 244
- JONES, R.F., SPEER, H.L. and KURY, W., (1963), Physiol. Plant., 16, 636
- KADO, C.I. and YIEN, Y., (1971), Anal. Biochem., 39, 339
- KANE, C.M. and KLOOS, W.E., (1970), Genet. Res. Camb., 15, 339
- KASAMATSU, H. and ROWND, R., (1970), J. Mol. Biol., 51, 473
- KELLY, M.S. and PRITCHARD, R.H., (1965), J. Bacteriol., 89, 1314
- KLOOS, W.E., (1969a), J. Bact., 98, 1397
- KLOOS, W.E., (1969b), J. Gen. Microbiol., 59, 247
- KLOOS, W.E. and SCHULTES, L.M., (1969), J. Gen. Microbiol., 55, 307
- KRATZ, W.A. and MYERS, J., (1955), Am. J. Botany, 42, 282
- KRAUS, I.M., (1961), Nature, 192, 1055
- KUMAR, H.D., (1962), Nature, Lond., 196, 1121
- KUNG, S.D., MOSCARELLO, M.A. and WILLIAMS, J.P., (1972), Plant Physiol., 49, 331
- KURNICK, N.B., (1955), Internat. Rev. Cytol., 4, 221
- LACKS, S., (1962), J. Mol. Biol., 5, 119
- LAVALLE, R. et JACOB, F., (1961), C.R. Acad. Sc. Paris, 252, 1678
- LEACH, C.K. and HERDMAN, M., (1973), in N.G. Carr and B.A. Whitton (Eds.) The Biology of Blue-green Algae, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 186
- LEDERBERG, J., (1952), Physiol. Rev., 32, 403
- LEDOUX, L., (1965), Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 4, 231

- LEDOUX, L., (1968), L'Absorption des Acides Désoxyribonucléiques par les Tissus vivants, Vaillant-Carmanne, Liège
- LEDOUX, L. and CHARLES, P., (1972), in L. Ledoux (Ed.), Uptake of Informative Molecules by Living Cells, North Holland Publishing Company, Amsterdam, p. 29
- LEE, C.S., DAVIDSON, N. and SCALETTI, J.V., (1968), Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 752
- LEE, C.S. and DAVIDSON, N., (1968), Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 757
- LE PECQ, J.-B., (1971), in D. Glick (Ed.), Methods in Biochemical analysis, vol. 20, p. 41
- LERMAN, L.S. and TOLMACH, L.J., (1957), Biochim. Biophys. Acta, 26, 68
- LERMAN, L.S. and TOLMACH, L.J., (1959), Biochim. Biophys. Acta, 33, 371
- LESSLER, M.A., (1953), Internat. Rev. Cytol., 2, 231
- LEUCHTENBERGER, C., (1954), Science, 120, 1022
- LEVENE, P.A. and BASS, L.W., (1931), The Nucleic Acids, New York, Chemical Catalog Co
- LEVENE, P.A. and JACOBS, W.A., (1909), Ber. dtsh.chem. Ges., 42, 2102, 2469, 2474, 2703
- LISTE DES SOUCHES, (1971), The culture Centre of Algae and Protozoa, Cambridge, U.K., p.4
- LOEB, J.E. and CHAUVEAU, J., (1969), Biochim. Biophys. Acta, 182, 225
- LURQUIN, P.F., (1976), in D. Dudits, G.F. Farkas and P. Maliga (Eds.), Cell Genetics in Higher Plants, Akademiai Kiadó (Budapest), Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, p. 77
- LURQUIN, P.F. and BEHKI, R.M., (1975), Mutation Res., 29, 35
- LURQUIN, P.F., TSHITENGE, G., DELAUNOIT, G. and LEDOUX, L., (1975), Anal. Biochem., 65, 1

- MARMUR, J., (1961), *J. Mol. Biol.*, 3, 208
- MC BRIDE, D.L. and COLE, K., (1969), *Phycologia*, 8, 177
- MC CARTY, M., TAYLOR, H.E. and AVERY, O., (1946), *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 11, 177
- MESELSON, M., STAHL, F.W. and VINOGRAD, J., (1957), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 43, 581
- MIESCHER, F., (1897), *Die histochemischen und physiologischen Arbeiten*, Leipzig
- MIYAZAWA, Y. and THOMAS, C.A., (1965), *J. Mol. Biol.*, 11, 223
- MOSELEY, B.E.B. and SETLOW, J.K., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 61, 176
- MÜLLER, H.M., (1961), *Planta*, 56, 555
- MUNCK-PETERSEN, A., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 142, 228
- NILSHAMMAR, M., (1975), *Cytobiologie*, 11, 419
- NILSHAMMAR, M., (1976), *Protoplasma*, 87, 263
- NILSHAMMAR, M. and WALLEES, B., (1974), *Protoplasma*, 79, 317
- NILSHAMMAR, M., WALLEES, B. et KYLIN, A., (1972), *Z. Pflanzenphysiol.*, 66, 193
- NISIOKA, T., MITANI, M. and CLOWES, R.C., (1969), *J. Bact.*, 97, 376
- NOVICK, R.P., CLOWES, R.C., COHEN, S.N., CURTISS III, R., DATTA, N. and FALKOW, S., (1976), *Bact. Rev.*, 40, 168
- OKUBO, S. and NAKAYAMA, H., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 32, 825
- ORKWISZEWSKI, K.G. and KANEY, A.R., (1974), *Arch. Mikrobiol.*, 98, 31
- OZENDA, P., (1965), *Trav. Biol. Vég.*, p. 341
- PICKETT-HAEPS, J.D. and STAEHELIN, L.A., (1975), *J. Phycol.*, 11, 186
- PIKALEK, P., (1967), *Nature, Lond.* 215, 666

- PRITCHARD, D.G., HALPERN, R.M. and SMITH, R.A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 228, 127
- RADLOFF, R., BAUER, W. and VINOGRAD, J., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 57, 1514
- RESTAINO, L. and FRAMPTON, E.W., (1975), *J. Bacteriol.*, 124, 155
- REYNOLDS, E.S., (1963), *J. Cell. Biol.*, 17, 208
- RHOADES, M., MAC HATTIE, L.A. and THOMAS, C.A., (1968), *J. Mol. Biol.*, 37, 21
- SCHAEFFER, P., (1956), *Ann. Inst. Pasteur*, 91, 192
- SCHAEFFER, P. and IONESCO, H., (1959), *C.R. Acad. Sc. Paris*, 249, 481
- SCHILDKRAUT, C.L., MARMUR, J. and DOTY, P., (1962), *J. Mol. Biol.*, 4, 430
- SCHMIDT, G. and THANNHAUSER, S.J., (1945), *J. Biol. Chem.*, 161, 83
- SHESTAKOV, S.V. and KHYEN, N.T., (1970), *Molec. Gen. Genetics*, 107, 372
- SHIVELY, J.M., BALL, F., BROWN, D.H. and SAUNDERS, R.E., (1973), *Science*, 182, 584
- SINGH, H.N. and SINHA, R., (1965), *Nature, Lond.* 207, 782
- SMILLIE, R.M. and KROTKOV, G., (1960), *Arch. Biochem. Biophys.*, 89, 83
- SPIZIZEN, J., (1959), *Fed. Proc.*, 18, 957
- SPURR, A.R., (1969), *J. Ultrast. Res.*, 26, 31
- SSYMANK, V., STEUP, M. and SENGER, H., (1976), *Plant and Cell Physiol.*, 17, 787
- STAEHELIN, L. A. and PICKETT-HEAPS, J.D., (1975), *J. Phycol.*, 11, 163
- STANIER, R.Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M. and COHEN-BAZIRE, G., (1971), *Bact. Rev.*, 35, 171
- STEWART, W.D.P. and SINGH, H.N., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 62, 62
- SWIFT, H., (1955), in E. Chargaff and J.N. Davidson (Eds.), *The Nucleic Acids*, New York, Academic Press, vol. 2, p. 51

- THOMAS, R., (1955), *Biochim. Biophys. Acta*, 18, 467
- TODARO, G.J., AARONSON, S.A. and RANDS, E., (1971), *Exptl. Cell. Res.*, 65, 256
- TOTH, R. and WILCE, R.T., (1972), *J. Phycol.*, 8, 126
- VAN BAALEN, C., (1965), *J. Phycol.*, 1, 19
- VINOGRAD, J. and HEARST, J.E., (1962), *Fortschr. Chem Org. Naturstoffe*, 20, 372
- WARING, M.J., (1965), *J. Mol. Biol.*, 13, 269
- WATANABE, T. and TAKANO, T., (1963), *Med. Biol., Tokyo*, 65, 111
- WEISBERG, S.H. and TURLAN, G., (1973), *Protoplasma*, 79, 377
- WILCZOCK, T., (1961), *Néoplasma*, 8, 5
- WOLK, C.P., (1973), *Bacteriol. Rev.*, 37, 32
- YOUNG, F.E. and JACKSON, A.P., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 23, 490
- ZAENEN, I., VAN LAREDEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M. and SCHELL, J., (1974), *J. Mol. Biol.*, 86, 109
- ZAMMENHOF, S., ALEXANDER, H.E. and LEIDY, G., (1953), *J. Exptl. Med.*, 98, 373
- ZIMM, B.H. and CROTHERS, D.M., (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 48, 905

