0376
1977
74

50376
1977
74

N° d'ordre : 626

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité : Biochimie
Mention : Microbiologie

par

François STROZYK

PRODUCTION EN MASSE DE LYSOZYME DE PHAGE ET ETUDE DE SON ACTIVITE.

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Soutenue le 24.3.1977, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury :	MM.	J. GUILLAUME,	Président
		J.C. DERIEUX,	Rapporteur
		J. KREMBEL,	Examinateur
		M. DEMINATTI,	Examinateur.

030 021510 7

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Technologie et des Fermentations de l'Institut Pasteur de Lille et dans le service de Microbiologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Nous sommes heureux de vous exprimer ici toute notre gratitude pour nous avoir accueilli dans votre laboratoire. Nous désirons tout particulièrement vous remercier de nous avoir fait bénéficier de vos judicieux conseils tout au long de ce travail. Nous tenons à vous exprimer ici notre profond respect.

Nous remercions Monsieur J.C. DERIEUX de l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Nous remercions également Monsieur J. KREMBEL qui a bien voulu accepter de juger ce travail et de participer à notre jury.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur M. DEMINATTI de nous avoir permis de terminer ce travail, et d'avoir accepté d'être notre juge. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

Nous tenons également à exprimer ici, toute notre gratitude à Monsieur E. CIESIELSKI pour son aide précieuse et pour la gentillesse qu'il nous a toujours témoignée. Nous y avons été très sensible.

Enfin, nous adressons également nos remerciements à tous ceux dont l'amitié et l'affection nous ont soutenu et encouragé.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS

INTRODUCTION 1

I. La bactérie, sa paroi : substrat du lysozyme 4

1. Structure de la cellule 4

2. La paroi. Composition chimique 5

a) La couche basale 6

b) La couche spécifique 9

II. Le lysozyme 9

1. Généralités 9

2. Mode d'action du lysozyme 10

3. Action du lysozyme sur les bactéries 11

a) Bactéries à Gram positif 12

b) Bactéries à Gram négatif 12

III. Le phage 13

A. Morphologie et composition 13

B. Le cycle de développement 15

1. Reconnaissance de la cellule-hôte et adsorption . 15

2. Récepteurs 16

3. Injection de l'acide nucléique 16

4. Développement intracellulaire des phages 17

a) Changements dans le métabolisme bactérien 17

b) Synthèse des protéines virales 18

c) Synthèse du lysozyme dans la bactérie infectée 19

d) La lyse bactérienne 19

e) Modifications réactionnelles des bactéries infectées 21

MATERIEL ET METHODES

I. Phage et bactérie-hôte 22

II. Milieux de culture 22

III. Technique de numération des phages 25

1. Etablissement d'un stock à partir de boîtes de Pétri 25

2. Numération des phages 26

IV. Détermination de l'activité lytique 26

1. Micrococcus lysodeikticus 27

a) Préparation de poudres acétoniques 27

b) Mode opératoire 27

2. Escherichia coli 28

a) Préparation du substrat 28

b) Dosage enzymatique et courbe étalon 29

V. Dosage de la β-galactosidase 30

1. Réactifs 30

2. Mode opératoire 30

VI. Concentration des phages par le polyéthylène glycol . 31

VII. Purification du lysozyme de phage 31

1. La résine 31

2. Tampon d'élution 32

RESULTATS

Première partie : MISE AU POINT DE LA LYSE

I. Le milieu de culture 33

1. Choix du milieu de culture 33

2. Résultats 34

II. Optimisation du rendement en phages 36

1. Principe 36

2. Détermination du moment de l'inoculation. Concentration des bactéries 37

3. Détermination du rapport phages/bactéries 39

4. Influence de la source carbonée 39

5. Conclusion 41

III. Etude de la lyse 43

1. Description du phénomène 43

2. Mise en évidence de la lyse par dosage de la β-galactosidase 45

IV. Conclusion 47

Deuxième partie : ETUDE DU LYSOZYME

I. Le lysozyme 49

1. Mise en évidence 49

2. Dosage 49

II. Aspect qualitatif de l'activité enzymatique du lysat 50

1. Ultracentrifugation 52

2. Sédimentation des phages par le polyéthylène glycol53

3. Conclusion 53

III. Purification du lysozyme de phage 55

1. Considérations générales 55

2. Elimination du DNA 56

3. Concentration sur IRC - 50 57

4. Chromatographies 57

a) Première colonne 57

b) Deuxième colonne 59

5. Détermination du pH optimum 64

6. Stabilité de la solution enzymatique 64

7. Conclusion 66

Troisième partie : PROPRIETES BIOLOGIQUES

Résultats expérimentaux 68

1. Traitement par le chloroforme 69

a) Bactéries mortes 69

b) Bactéries fraîchement récoltées 71

2. Traitement à l'EDTA 73

a) Méthode par densité optique 73

b) Méthode par numération 73

3. Conclusion 75

CONCLUSION GENERALE 80

BIBLIOGRAPHIE

AVANT - PROPOS

Dans ce travail nous avons cherché à mettre au point une méthode de préparation de grandes quantités de lysozyme de phage. En effet la découverte du lysozyme a exercé une grande attraction pour les microbiologistes qui se sont intéressés à son action bactériolytique ou bactériostatique à des degrés variables suivant les bactéries. Ils ont découvert également qu'il jouait un rôle important dans la lutte contre les infections.

La spécifité enzymatique du lysozyme de phage est la même que celle du lysozyme de blanc d'oeuf, toutefois l'activité spécifique vis à vis du substrat peut être différente pour les deux enzymes. A quantité égale, le lysozyme de phage T4 est 6 fois plus actif sur une suspension de Micrococcus lysodeikticus, utilisée comme substrat, que le lysozyme de blanc d'oeuf, et 250 fois plus actif avec des cellules d'Escherichia coli (95).

Ces différences de propriétés sont particulièrement intéressantes à rechercher et c'est le but de notre travail : en partant d'une souche de bactériophage, il s'agit de mettre au point une préparation à grande échelle de lysozyme de phage de façon à étudier sa spécificité d'action et éventuellement l'utiliser préférentiellement au lysozyme de blanc d'oeuf.

INTRODUCTION

Les bactériophages sont des virus. Ils infectent des bactéries, s'y multiplient et finalement se libèrent après la lyse de la paroi cellulaire. Avant de décrire les différentes étapes de la vie des phages et de leurs relations avec les bactéries qu'ils infectent, il n'est pas inutile de relater l'historique de la découverte de ces organismes et de retracer la manière dont a été identifié le lysozyme des phages.

Ces organismes que nous appelons aujourd'hui virus, et qui sont transmissibles en série et potentiellement pathogènes pour leur hôte, ont été décrits pour la première fois en 1899 par BEIJERINCK (10) qui étudiait la mosaïque du tabac. Il avait remarqué que les agents responsables de la maladie n'étaient pas retenus sur filtres de céramique comme le sont toutes les bactéries et de plus n'étaient pas visibles au microscope. Toutefois cette notion d'agent vivant transmissible n'eut pas la faveur de ses contemporains.

Ce n'est qu'en 1915 que TWORT remarqua la présence d'un agent lytique dans ses cultures de microcoques et émit l'hypothèse de l'existence d'un virus responsable de cette lyse (96).

De son côté d'HERELLE, en 1915, fut mandé par le Dr. ROUX, directeur de l'Institut Pasteur, pour enquêter sur une épidémie de dysenterie qui sévissait dans un escadron de cavalerie établi à Maisons-Laffitte. En suivant bactériologiquement ses malades, il fut intrigué par la lyse bactérienne qu'il obtenait à un moment donné. Il publia ses résultats en 1917 (36) où il donne lui-même sa propre explication du phénomène : "what caused my clear spots was in fact an invisible microbe, a filtrable virus, but a virus parasitic on bacteria". C'est d'ailleurs dans cette note que d'HERELLE baptisa ce virus antibactérien sous le nom de <u>bactériophage</u>, nom qui fut plus tard raccourci à phage.

d'HERELLE n'en resta pas là et pendant les trois ans qui sui-

virent (1918-1921) il réalisa un grand nombre d'expériences qui furent le point de départ de la recherche fondamentale sur les "bactériophages" (37, 38). Notons qu'à l'époque il avait déjà décrit les traits essentiels du phénomène tel que nous le connaissons actuellement. Il est à l'origine de la méthode de dénombrement des phages par la technique des plaques, telle que nous l'utilisons pratiquement aujourd'hui. De plus il avait déjà décrit que le bactériophage se fixait sur la bactérie avant d'y pénétrer et de s'y multiplier et que cette fixation était spécifique, n'intervenant que si la bactérie est sensible à l'action du phage.

d'HERELLE fut également le premier à suggérer qu'une enzyme lytique était secrétée par le phage (38). Il avait décrit la lyse bactérienne comme étant le résultat final d'un cycle de multiplication intrabactérienne du phage, permettant le passage à l'extérieur des particules infectantes nouvellement formées. L'existence même de cette lyse, ses aspects microscopiques (obtention de formes sphériques juste avant éclatement de la bactérie), lui avait fait penser à l'attaque des structures rigides de la bactérie par une substance lytique. Et en 1929, une telle substance est effectivement décelée par SERTIC dans les lysats bactériens, obtenus sous l'action des phages (89). Il indiqua clairement qu'une enzyme, diffusant dans la gélose autour des plages de lyse et provoquant la lyse de bactéries traitées à la chaleur, est produite par le phage.

En 1933, WOLLMAN E. et WOLLMAN E. confirmèrent que l'enzyme était bien produite par le phage plutôt que par la bactérie (106).

Dans les années 1930, deux chercheurs par leurs travaux, présagèrent l'essor de la Génétique bactérienne et de la Biologie Moléculaire, disciplines qui connurent leur plein épanouissement que 25 ans plus tard ; ces deux hommes s'appelaient BURNET et SCHLESINGER. BURNET donna les premières explications concernant l'adsorption des phages sur la surface bactérienne (19). Il trancha le différend qui

opposait d'HERELLE à ses antagonistes en apportant la preuve de l'accumulation des phages dans la bactérie infectée, que la lyse de la cellule relâche ensuite.

SCHLESINGER étudia les bactériophages par des méthodes chimiques et physicochimiques, mais il mourut prématurément en 1936. BURNET s'orientant vers les virus des animaux, la recherche sur les phages se ralentit pour ne reprendre qu'en 1938 avec DELBRÜCK M. qui démontra que chaque bactérie infectée libère 100 phages au moment de la lyse. Il dénombra 7 phages virulents sur Escherichia coli : T1, T2, T3, T4, T5, T6 et T7 (T pour Type).

A cette époque le lysozyme était déjà connu et décrit comme une enzyme extrêmement répandue dans la nature (Homme, mammifères, invertébrés, plantes...). C'est à FLEMING que revient le mérite de sa découverte dans le mucus nasal en 1922 (31). En 1936, MEYER isole le lysozyme du blanc d'oeuf, qui est actuellement la source la plus abondante de cette enzyme (68).

En 1939, PIRIE, utilisant un phage WLL sur B. coli 14, observa une augmentation des sucres réducteurs dans le milieu et il suggéra que l'enzyme relachée pendant la lyse de la bactérie par les phages, agit sur la paroi bactérienne, augmentant le taux de sucres réducteurs, tout comme le lysozyme de blanc d'oeuf (74).

En 1945, T. F. ANDERSON trouva que l'irradiation du phage T2 provoquait la libération d'une substance bactériolytique soluble (1) ; plus tard KOCH et WEIDEL (55) puis BARRINGTON et KOZLOFF (8) montrèrent qu'une enzyme lytique était attachée aux particules de phages. L'action de cette enzyme sur la paroi bactérienne ressemblait étroitement au "lysozyme" que FLEMING avait découvert en 1922 dans les sécrétions et les tissus des animaux (31). Mais ce n'est qu'après avoir démontré que les lysats du phage T4 contenaient de grandes quantités de cette enzyme sous forme soluble, que vint l'idée que c'était celle-ci qui digérait les parois des bactéries, de l'intérieur, per-

mettant ainsi aux phages nouvellement formés de s'échapper. On se trouve donc à ce stade en présence de substances lytiques de deux origines différentes : celle des lysats bactériens et celle des particules phagiques. Or l'étude ultérieure de leur spécificité d'action enzymatique, de leurs propriétés physico-chimiques et immunologiques et de leur constitution montre que ces deux substances sont, d'une part, identiques entre elles, et, d'autre part, assimilables à un lysozyme. Dès lors l'enzyme des phages de la série T prit le nom de lysozyme de phage (57, 102).

Après avoir relaté l'historique de la découverte des bactériophages et montré le cheminement suivi pour établir que l'activité lytique de ceux-ci était liée au lysozyme, nous allons étudier successivement la bactérie, dont la paroi fournit le substrat du lysozyme, l'action de ce dernier in vitro et sur les bactéries entières et enfin le phage et son comportement.

I. LA BACTERIE, SA PAROI : SUBSTRAT DU LYSOZYME

1. Structure de la cellule

La bactérie est entourée par une paroi rigide, structure complexe contenant des polysaccharides, des protéines et des lipides. C'est cette paroi qui maintient la forme de la cellule et protège celle-ci contre le danger d'une lyse osmotique lorsque la cellule se trouve dans un milieu hypotonique.

La paroi est une couche hétérogène constituée de peptidoglycanes (ou muréine). Les peptidoglycanes sont des polymères qui contiennent à la fois des unités glucidiques (glucosamine et acide muramique) et des unités peptidiques.

Pressée étroitement contre cette paroi se trouve la membrane cellulaire dont le rôle principal est la régulation des échanges de

solutés entre le milieu extérieur et la cellule, soit par diffusion, soit par des mécanismes de transport actif. Cette membrane délimite le protoplaste qui comprend le cytoplasme et le nucléoplasme.

Les Eubactéries peuvent être divisées en deux groupes suivant leur mode de réaction à la coloration de Gram : Gram positif et Gram négatif. Au regard de la nomenclature, le terme de protoplaste est réservé pour les formes osmotiquement sensibles, dérivant des bactéries Gram positif et dénotant que toute la paroi a été enlevée. Dans le cas des bactéries Gram négatif, il n'est pas toujours possible d'enlever complètement la paroi mais toutefois ces cellules placées dans des solutions hypertoniques donnent également des formes rondes, sphériques : le sphéroplaste, terme plus communément employé actuellement.

Il est possible de briser la résistance de la paroi et même de digérer complètement celle-ci (dans la plupart des bactéries Gram +, comme Bacillus megatherium) par l'action du lysozyme qui entraîne la lyse de la cellule, la membrane cellulaire ne pouvant supporter la pression osmotique. Cette lyse peut être évitée en utilisant des solutions concentrées de sucrose.

2. La Paroi. Composition chimique

Nous nous proposons de donner ici, brièvement, quelques données sur la structure de la paroi et de relier celle-ci au mode d'action du lysozyme. Des informations plus détaillées peuvent être trouvées dans la littérature (33, 35, 80, 85).

C'est dans les années 1950 que les parois bactériennes ont été isolées pour la première fois à partir de bactéries brisées mécaniquement. Les parois ont généralement une couche basale ("basal layer"), responsable de la rigidité, de la souplesse et de l'élasticité, et une couche spécifique ("spécific layer") qui est spécifique des souches ou des espèces.

a) - La couche basale

La composition chimique de la couche basale est commune à la plupart des bactéries. Elle est essentiellement composée de quelques acides aminés et d'acétylhexosamines, formant un polymère appelé peptidoglycane (glycopeptide, mucopeptide, glycosaminopeptide ou muréine étant synonymes de peptidoglycane) renfermant de l'acide N-acétylmuramique, de la N-acétylglucosamine, de la L-lysine ou de l'acide méso-diaminopimélique (DAP), de l'acide D-glutamique, de la D ou L-alanine, tout ceci en quantités équimolaires (1 : 1 : 1 : 1 : 2). L'on peut, dans quelques cas, trouver du glycocolle, de la L-sérine, L-thréonine et de l'acide D-aspartique.

Le peptidoglycane pariétal résulte de la polymérisation de disaccharides formant des chaînes de glycanes et reliées entre-elles par l'intermédiaire de chaînes peptidiques (figure 1) conférant à la bactérie une certaine rigidité. En effet le peptidoglycane enveloppe toute la bactérie et cette enveloppe peut être vidée de son contenu cellulaire, lavée et analysée ; au microscope électronique on voit qu'elle conserve la forme de la bactérie. C'est donc à cette enveloppe que la bactérie doit sa forme spécifique. En dépit de nombreuses variations, on constate une remarquable unité de structure des peptidoglycanes pariétaux dans le monde bactérien (figure 2).

La partie glycane du peptidoglycane consiste en une chaîne linéaire de résidus N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, reliés entre eux par des liaisons β-1,4 (figure 3), le groupement carboxyle des résidus d'acide N-acétylmuramique servant de point d'attache aux chaînes peptidiques. C'est cette structure qui constitue le substrat du lysozyme, et dont la destruction spécifique entraîne la lyse de la bactérie.

L'élucidation de la nature chimique du substrat et des produits qui résultent de l'hydrolyse ont établi que le lysozyme coupait les liaisons entre les résidus N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine . Le lysozyme est donc une endo-N-acétyl-muramidase.

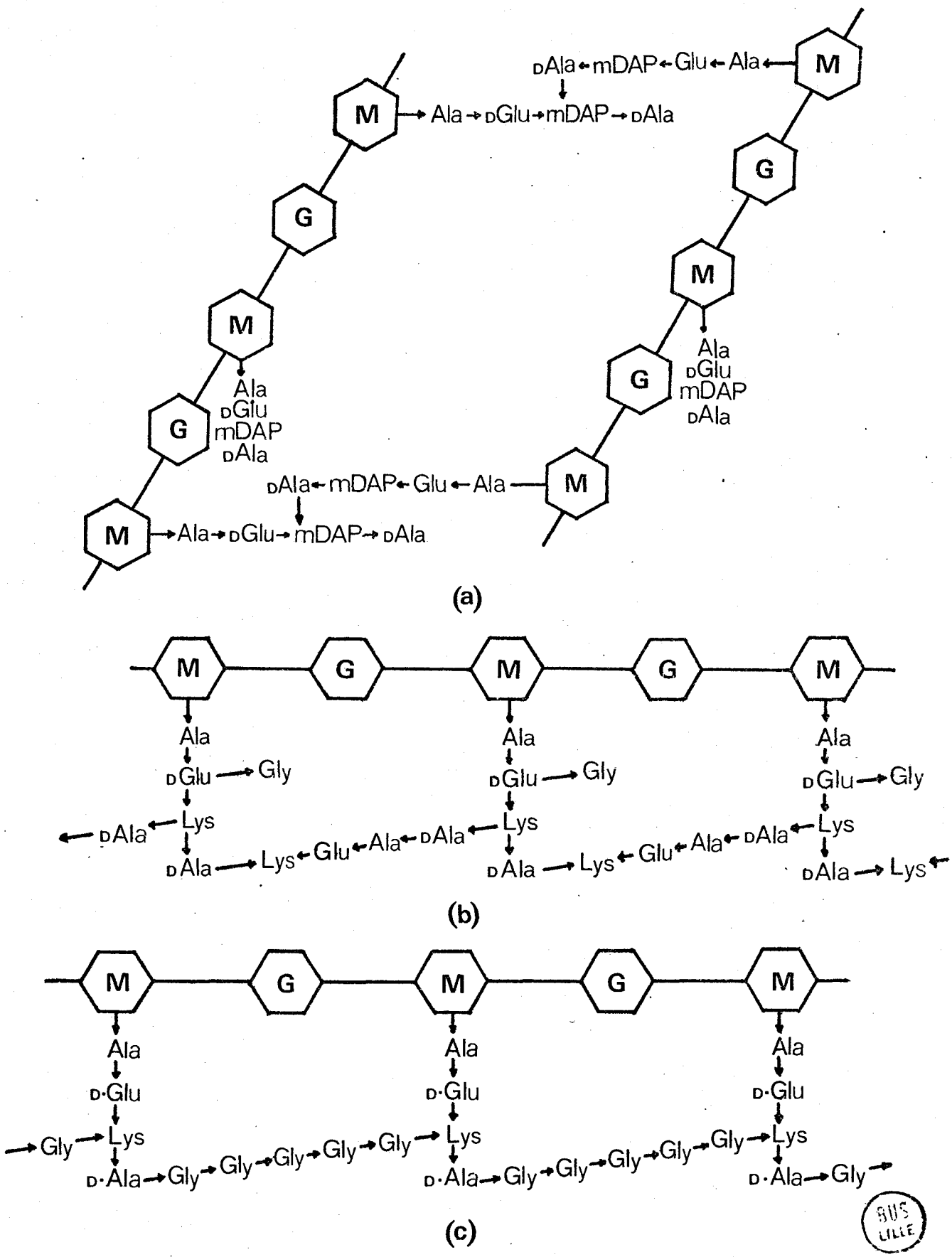


Figure 2 : Représentation schématique de peptidoglycanes : (a) E. coli (94), (b) M. lysodeikticus (34, 87) et (c) S. aureus Copenhagen (56). D'après GHUYSEN (33)

BUS LILLE

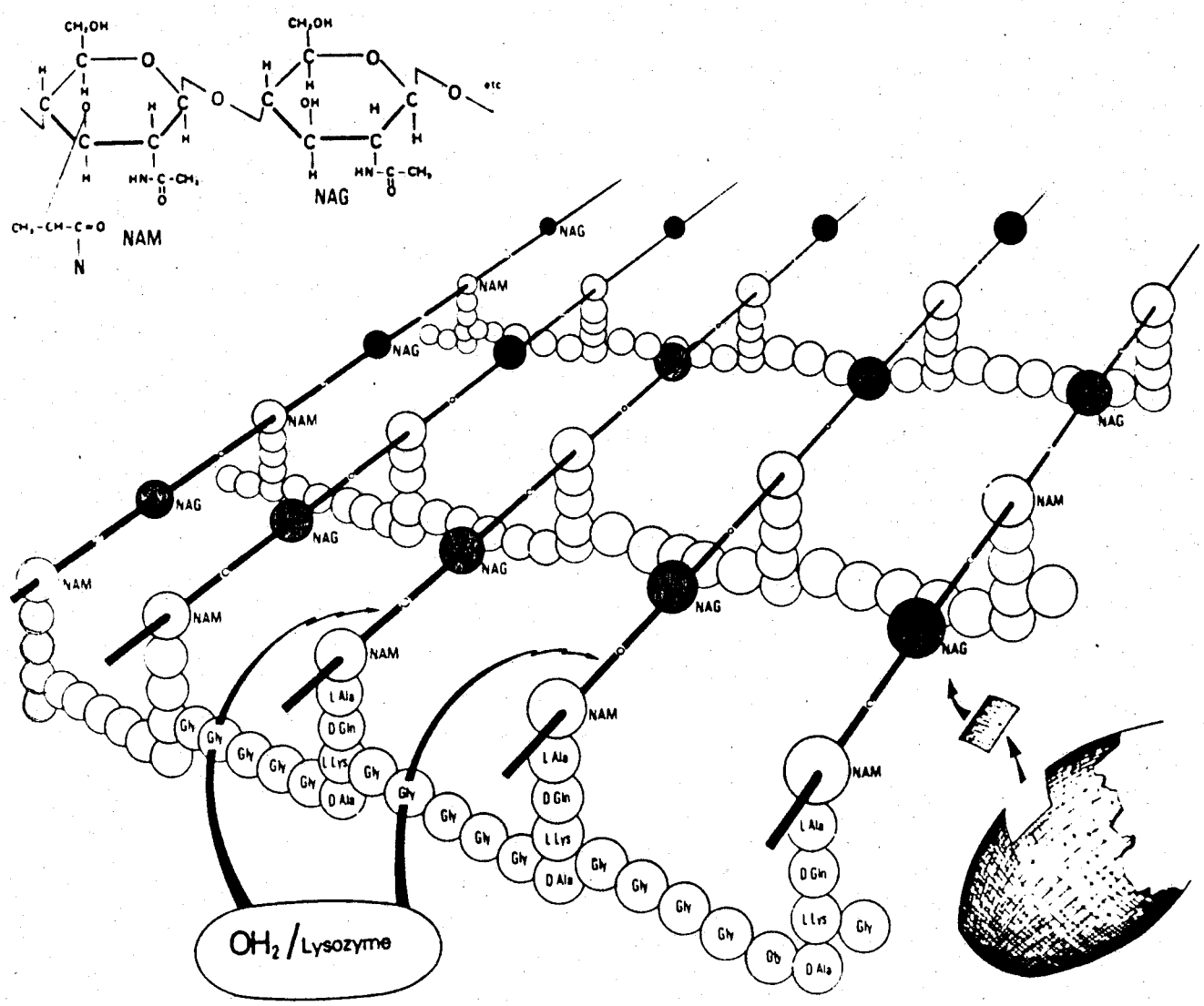


Figure 3 : Représentation schématique de la paroi d'E. coli. La partie polysaccharidique est formée de chaînes parallèles reliées entre-elles par des liaisons oligopeptidiques. Les résidus saccharidiques de ces chaînes sont formés d'acide N-acétyl muramique (NAM) lié en β-1,4 à de la N-acétyl glucosamine (NAG). D'après DURAND M. et FAVARD P., La cellule, Hermann éd. 1974, 2ème édition

BHS LILLE

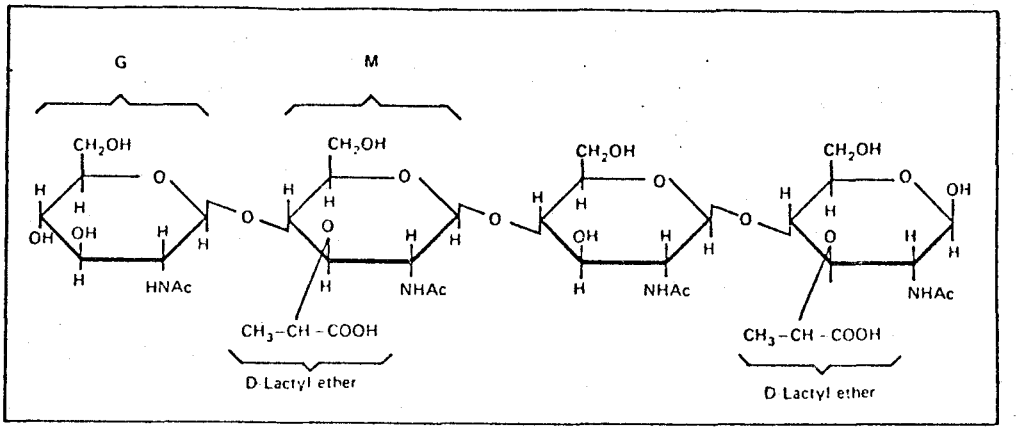


figure 1 - Une portion de chaîne de glycane.

b) - La couche spécifique

Cette couche est caractéristique de la souche ou de l'espèce considérée et possède une composition variée :

- chez les bactéries à Gram positif où la paroi est épaisse, elle renferme des acides téïchoïques du type ribitol ou glycérol, de l'acide teichuronique et des polysaccharides.

- chez les bactéries à Gram négatif, la paroi présente une structure différente et renferme essentiellement un complexe lipoprotéopolysaccharidique (LPS) et des polymères de l'acide muramique.

II. LE LYSOZYME

1. Généralités

Tous les lysozymes catalysent avec une efficacité variable l'hydrolyse des polymères de sucres substitués qui forment la paroi de certaines bactéries, dont le représentant classique est Micrococcus

lysodeikticus. Dès que cette paroi est digérée, la bactérie éclate sous la pression du cytoplasme : les lysozymes ont donc une action bactériolytique. La plupart d'entre eux catalysent également l'hydrolyse de la chitine.

Rapidement, l'on constata que des lysozymes d'origines diverses étaient différents entre eux (32) mais présentaient, néanmoins, qualitativement la même activité biologique (49). Si de nombreux lysozymes ont été repérés dans des sources très diverses, seul un petit nombre a été purifié et obtenu à l'état chromatographiquement pur.

La structure chimique primaire du lysozyme de blanc d'oeuf de poule a été déterminée en 1961 par JOLLES J. et JOLLES P. (46), puis d'autres résultats vinrent s'ajouter pour établir la structure secondaire, tertiaire... (13, 18, 21, 22, 48, 50). Nous savons aujourd'hui que ce sont des petites molécules protéiques globulaires de faible poids moléculaire (13.000 - 18.000), formées d'une chaîne polypeptidique de 129 résidus, et comprenant 4 ponts disulfure reliant entre eux des secteurs éloignés de la molécule. On pourrait supposer que ces ponts forment l'élément déterminant de la stabilité de la structure tertiaire du lysozyme de blanc d'oeuf de poule, mais cela n'est pas le cas car tous les lysozymes ne contiennent pas le même nombre de ponts disulfure, certains même n'en ayant aucun. C'est le cas du lysozyme de bactériophage. La présence de ces ponts assure plutôt une grande stabilité de la protéine vis à vis des modifications de température et de pH.

En ce qui concerne le lysozyme de phage, nous savons que c'est une enzyme synthétisée comme une protéine tardive après l'infection et qu'elle agit plutôt de l'intérieur de la bactérie pour expulser la nouvelle génération de phages.

2. Mode d'action du lysozyme

Alors que la lyse des bactéries sous l'action du lysozyme de blanc d'oeuf était connue depuis longtemps, les premiers travaux

d'identification du substrat dégradé par le lysozyme datent des travaux de MEYER et coll. (69). Ce sont toutefois les travaux de SALTON sur la dégradation de la paroi purifiée de Micrococcus lysodeikticus qui permirent d'élucider la nature chimique du substrat (84, 85). Ses travaux ont permis de connaître non seulement la structure chimique de ces parois mais ont donné également des renseignements intéressants sur la spécificité de l'enzyme.

Du lysozyme de phage et du lysozyme de blanc d'oeuf mis en contact avec du substrat préparé à partir d'Escherichia coli ou de Micrococcus lysodeikticus donnent des mucopeptides identiques quant à leur composition et à leur migration chromatographique : un mucopeptide disaccharidique notamment ; la fonction aldéhydique libre est toujours celle de l'acide N-acétylmuramique. Il en ressort que les lysozymes scindent les liaisons β,1-4 entre un résidu N-acétylmuramique et un résidu de N-acétylglucosamine et sont encore appelés β glucosaminidases ou N-acétylmuramid-glycano-hydrolases (EC 3.2.1.17).

Toutefois on constate que les proportions de ces mucopeptides sont très différentes dans les deux cas (75). Il faut rapporter ce fait aux différences quantitatives de l'activité enzymatique de ces deux lysozymes. En effet, si ces deux lysozymes scindent les mêmes liaisons, la vitesse de cette scission est différente et varie également avec les différents substrats utilisés. L'activité spécifique pour la paroi cellulaire d'Escherichia coli est plus grande pour le lysozyme de phage que pour le lysozyme de blanc d'oeuf. Toutefois cela n'est plus apparent pour d'autres substrats, comme les parois isolées de Micrococcus lysodeikticus (95).

3. Action du lysozyme sur les bactéries

Nous nous proposons d'expliquer ici, de façon sommaire, les différences d'activité existantes entre les deux classes de bactéries (Gram + et Gram -) vis à vis du lysozyme. Le lecteur pourra trouver de plus amples détails en consultant les comptes-rendus de SALTON (85) ou de ROGERS et PERKINS (80).

a) - Bactéries à Gram positif

SALTON (81, 82, 85) a classé les bactéries, suivant la structure de leur paroi, en quatre groupes. Les bactéries à Gram positif (groupe 1), incluant Micrococcus lysodeikticus et Staphylococcus aureus, ont une épaisse paroi amorphe et une membrane cytoplasmique. Le lysozyme (muramidase) agit sur la couche de peptidoglycanes de la paroi d'une variété d'organismes et il hydrolyse cette couche rigide. Avec des organismes à Gram positif comme Bacillus megatherium ou Micrococcus lysodeikticus, la couche de peptidoglycanes est exposée à l'extérieur, et il suffit simplement d'exposer ces organismes à l'action du lysozyme qui convertit ces cellules en protoplastes.

Toutefois l'action du lysozyme peut être empêchée sur des cellules intactes par la présence de certaines substances sur la surface extérieure de ces cellules, rendant la couche sensible inaccessible à l'enzyme.

Des études sur la structure chimique exacte des parois ont montré que celles-ci étaient loin d'avoir une structure homogène ne contenant qu'une seule classe de polymères. En effet, de nombreuses bactéries à Gram positif peuvent contenir des quantités considérables de phosphate organique dans leur paroi (c'est le cas de Staphylococcus aureus), alors que d'autres n'en sont que très peu pourvues ou pas du tout (Micrococcus lysodeikticus). Ces composés riches en phosphate ont été regroupés sous le terme général d'acides teichoïques et renferment essentiellement du glycérol-phosphate ou du ribitol-phosphate.

Après l'enlèvement de ces composés par le formamide, l'acide trichloracétique chaud ou froid, la potasse alcoolique, le résidu est aisément digéré par le lysozyme ; c'est le cas pour S. aureus dont la paroi intacte est insensible à l'action du lysozyme.

b) - Bactéries à Gram négatif

Le lysozyme ne manifeste aucune activité lytique directe sur

les bactéries à Gram négatif, comme il le fait sur les bactéries à Gram positif. Cependant il est possible de la provoquer si au préalable on fait subir à ces bactéries un traitement convenable.

Dans les bactéries à Gram négatif, la paroi présente une plus grande complexité contenant de 8 à 30 % de lipides, des protéines et des polysaccharides. Ici la couche de peptidoglycanes est intercalée entre la membrane cytoplasmique et la couche externe formée de lipopolysaccharides. Cette couche de peptidoglycanes n'étant pas exposée à l'extérieur, une certaine manipulation est nécessaire en vue de démasquer le substrat de l'enzyme : chauffage à 100° C pendant dix minutes (24), utilisation de chloroforme (97), d'acétone (47), pH alcalin (93, 109), mais le procédé le plus commode à mettre en oeuvre pour obtenir une lyse totale est celui qui a été décrit par REPASKE qui utilisait de l'EDTA (79).

III. LE PHAGE

A. Morphologie et composition

Comme tous les virus, les bactériophages sont constitués essentiellement d'acide nucléique et de protéines. L'acide nucléique peut être soit le DNA (bicaténaire ou monocaténaire) soit le RNA.

C'est surtout grâce aux travaux de WILLIAMS et FRASER (103, 104, 105), KELLENBERGER (54) et BRENNER (15) que l'on connaît actuellement la morphologie des phages de la série T (voir également la revue présentée par BRADLEY)(14). Ces phages sont constitués d'une tête icosaèdre (ou icosaèdre allongé) et d'une queue composée de l'assemblage de quatre constituants : une gaine contractile, un tube central, une plaque basale et de six fibres (figure 4). La plaque basale, outre les six fibres porte aussi six pointes et l'ensemble constitue l'appareil de fixation du phage.

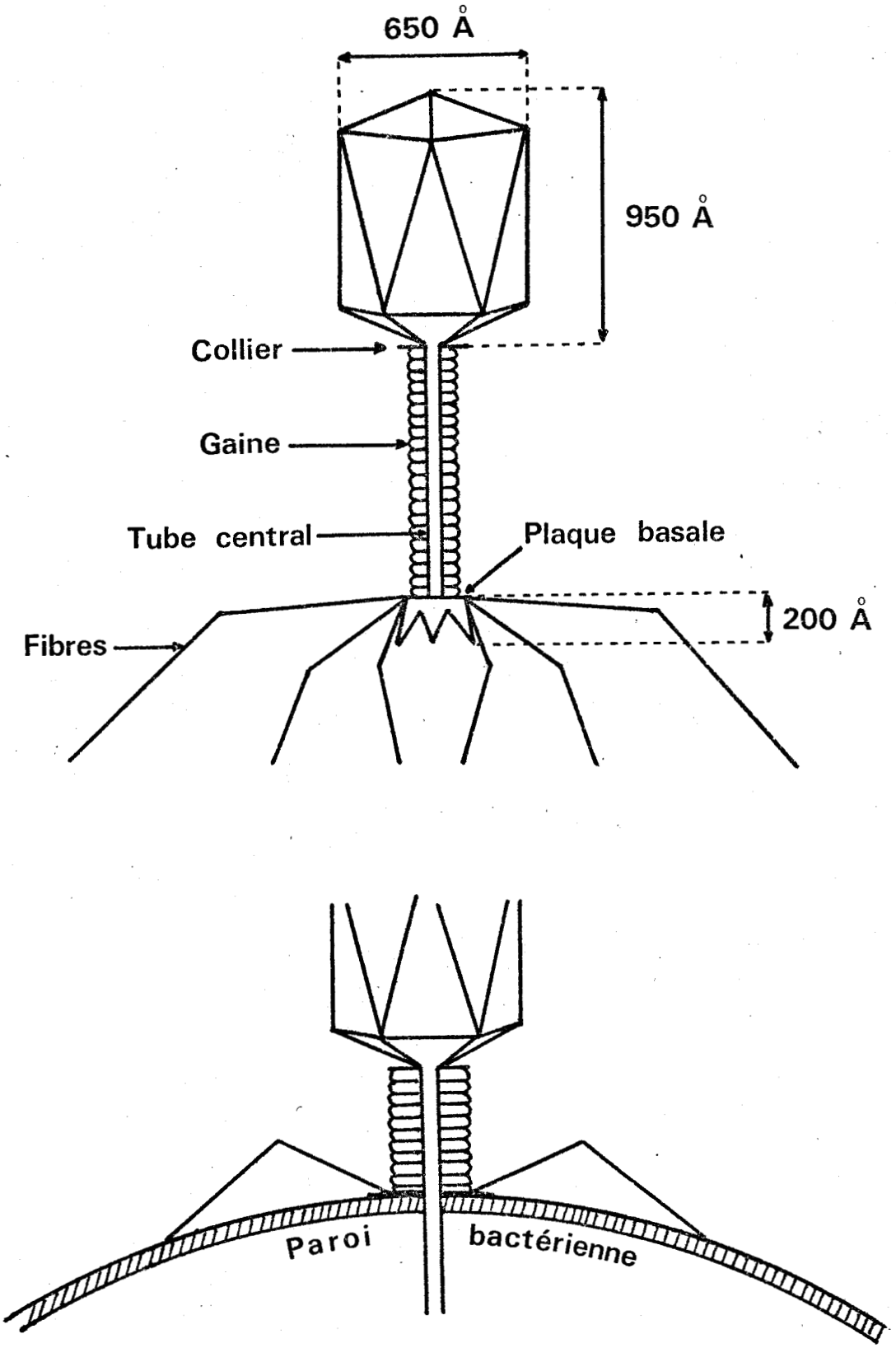


Figure 4 : Représentation schématique de la particule infectieuse du phage T4.
D'après LURIA et DARNELL. General Virology, Wiley, 1967

BIB. LILLE

B. Le cycle de développement

Lorsqu'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance est inoculée par du phage, l'infection se termine quelques heures plus tard par la lyse de la bactérie et la libération d'un grand nombre de particules infectieuses. Dans le cycle de développement de la particule infectante, l'action lytique est connue et se manifeste en deux étapes :

1) - la pénétration du phage dans la bactérie-hôte

2) - la lyse de la bactérie et multiplication des phages

Le lysozyme n'exerce vraiment son rôle véritable que lorsqu'il lyse la bactérie-hôte pendant la reproduction des phages (27, 51, 91).

Nous allons décrire les différentes étapes du cycle de multiplication végétatif du phage, en se rapportant plus particulièrement à celui du phage T4 dont les informations sont les plus détaillées.

1. Reconnaissance de la cellule-hôte et adsorption

L'étape initiale de l'interaction du phage avec la bactérie-hôte est la reconnaissance de la cellule et l'adsorption du phage avant l'infection proprement dite. Le site de reconnaissance est porté par la couche externe de la bactérie, et, particulièrement pour le phage T4, par la partie lipopolysaccharidique (LPS) de celle-ci (45, 101). Cette reconnaissance est d'ailleurs dépendante des composés des six fibres de la queue (41, 91).

L'adsorption est donc le processus de fixation des particules infectieuses à la surface des bactéries. Celle-ci ne dépend pas uniquement du phage et de la bactérie, mais aussi de la composition du milieu (38). En particulier le pH et la composition ionique jouent un rôle important ; tous les phages montrent une vitesse d'adsorption

maximum à un pH voisin de la neutralité, mais la composition cationique optimum diffère d'une souche à l'autre : Ca^{++} pour le phage P1, Mg^{++} pour le phage λ.... L'adsorption est également fonction du nombre de bactéries dans le milieu : elle est maximum pour un titre de 10^8 à 5. 10^8 bactéries par ml, déterminant une fréquence de collisions plus grande entre les deux éléments. Dès que le phage est fixé sur la bactérie, l'adsorption devient irréversible.

2. Récepteurs

La bactérie ne semble jouer aucun rôle dans l'adsorption puisque les phages peuvent être adsorbés sur des cellules tuées par la chaleur ou même par des fragments de cellules. La paroi bactérienne contient par conséquent des sites de réception capables de former des liaisons entre les virions et les cellules par la présence de structures chimiques complémentaires.

Les structures chimiques spécifiques de l'adsorption sont localisées dans les couches externes de la paroi (lipoprotéines et lipopolysaccharides). Leur synthèse est gouvernée par l'activité des gènes bactériens dont la mutation rend la bactérie résistante au phage considéré.

Les sites d'interaction avec les récepteurs bactériens sont localisés dans l'extrêmité de la queue des phages. Ce sont les fibres de la queue qui permettent l'adsorption du phage sur les bactéries sensibles et non sur les bactéries résistantes. C'est en 1945 que l'on découvrit que certains phages de la série T nécessitaient une activation préalable pour pouvoir s'adsorber sur leur hôte, le cofacteur le plus efficace étant le tryptophane (2, 3, 4).

3. Injection de l'acide nucléique

L'étape suivante de l'infection est l'injection du DNA phagique. Les fibres de la queue se plient et le contact de celles-ci avec la

surface cellulaire amène une contraction de la gaine qui fait pénétrer le tube central (figure 4). Celui-ci pénètre dans la paroi (jusqu'à une profondeur de 120 Å, mais ne pénètre pas la membrane cytoplasmique), et injecte le DNA phagique dans la cellule (91), celui-ci traversant la membrane plasmique par lui-même. La démonstration que l'acide nucléique pénètre la cellule bactérienne a été apportée par les expériences de HERSHEY et CHASE en 1952 (39).

Ils ont montré que l'enveloppe des phages reste à l'extérieur après l'adsorption et que seul le DNA pénètre dans la bactérie au moment de l'infection et que c'est ce DNA qui est le support héréditaire de la continuité des phages.

Du lysozyme a été reporté être associé aux particules phagiques dans le cas du phage T2, et il est probable que la digestion de la paroi avec cette enzyme est en relation avec le phénomène de pénétration (7, 8, 44, 56, 76). Déjà KOCH et WEIDEL (55, 99) avaient montré que le lysozyme associé aux particules infectieuses commençait à digérer la paroi dès que les phages de la série T sont attachés à la surface de Escherichia coli. WEIDEL et coll. (75, 100) ont également montré que c'est la couche interne et rigide de la paroi qui est attaquée par le lysozyme de phage qui enlève les acides aminés, l'acide muramique et la glucosamine du mucopolymère. Par contre EMRICH et STREISINGER (27), en comparant un phage mutant déficient en lysozyme et le phage sauvage, indiquèrent que le lysozyme ne jouait aucun rôle dans le phénomène de pénétration.

4. Développement intracellulaire des phages

Après l'injection de l'acide nucléique commence le développement viral qui comprend plusieurs étapes jusqu'à la libération des virions de la progénie produits dans la cellule infectée.

a) - Changements dans le métabolisme bactérien

L'infection des bactéries par les phages détermine une

réorganisation profonde de l'activité métabolique de la bactérie, qui aboutit finalement à une subordination du métabolisme bactérien au seul profit de la synthèse des constituants viraux.

L'infection inhibe totalement la synthèse du DNA, du RNA et des protéines au bout de deux minutes et provoque l'augmentation rapide de la perméabilité de la cellule (63, 77, 78). La synthèse des enzymes bactériennes est également stoppée et pendant la période latente, l'activité de celles-ci reste au même niveau qu'avant l'infection (12, 23, 71, 72, 90).

b) - Synthèse des protéines virales

On assiste ensuite à la synthèse du RNA messager viral par la RNA-polymérase bactérienne. Ce mRNA permet la synthèse d'enzymes très nombreuses et qui sont absentes dans une cellule non infectée. Ces enzymes se trouvent parmi les protéines "précoces" dans le cycle de développement et de multiplication du phage : déoxycytidylate hydroxyméthylase (28, 29, 59, 92), une DNA polymérase (60), des glucosyl-transférases (59, 64), déoxycytidine pyrophosphatase (58, 59), déoxycytilylic déaminase (53), thymidylate synthétase (9, 30), déoxyribonucléase (62, 73) etc... Leur activité permet la synthèse du DNA phagique qui débute 5 à 7 minutes après l'apparition de ces enzymes.

Puis, dans un second temps, les protéines de l'enveloppe du phage et le lysozyme sont activement synthétisés. Pour réaliser toutes ces synthèses, le phage utilise les différents composants intracellulaires bactériens et particulièrement les ribosomes comme lieu de synthèse protéique.

La capside d'un phage est relativement complexe et la synthèse de ces différents composants s'effectue indépendamment les uns des autres, et ces différentes sous-unités s'assemblent ensuite spontanément pour donner la morphologie complète.

Chaque étape est donc bien ordonnancée et de nombreuses études ont permis l'établissement d'une carte génétique du phage T4.

c) - Synthèse du lysozyme dans la bactérie infectée

Nous avons vu que le DNA phagique induit la synthèse du lysozyme qui joue un rôle important dans la dissolution finale de la cellule infectée. Ce lysozyme de phage digère de "l'intérieur" la paroi cellulaire et prépare ainsi la cellule à la lyse et à la libération des phages nouvellement synthétisés. Il est possible d'étudier la cinétique d'apparition du lysozyme en lysant les bactéries infectées à des temps variables après l'infection, par exemple au moyen des ultra-sons, et en évaluant l'activité du lysozyme de ces lysats précoces (la quantité du lysozyme présente peut être estimée en mesurant la vitesse de lyse des bactéries traitées à la chaleur ou au chloroforme, ou mieux encore, la dissolution des parois cellulaires isolées). De telles études révèlent que le lysozyme n'est pas synthétisé parmi les protéines précoces mais commence à être visible vers le milieu de la phase de latence (43), pratiquement en même temps que les premiers composés protéiques de la queue du phage peuvent être détectés. Aucun doute que ce délai de synthèse du lysozyme de phage est nécessaire pour obtenir la multiplication complète des phages ; en effet si cette enzyme était synthétisée parmi les protéines précoces, formées juste après l'infection, son activité se manifesterait immédiatement et provoquerait la lyse de la cellule infectée avant qu'aucune descendance phagique intacte n'ait eu le temps de se produire.

d) - La lyse bactérienne

A la fin du cycle de multiplication, immédiatement avant la lyse des bactéries infectées, l'apparition des formes sphériques (37, 43, 44), stabilisées d'ailleurs par des concentrations assez élevées de saccharose (43, 44), indique la disparition, au moins partielle, de la couche muréique rigide des parois bactériennes

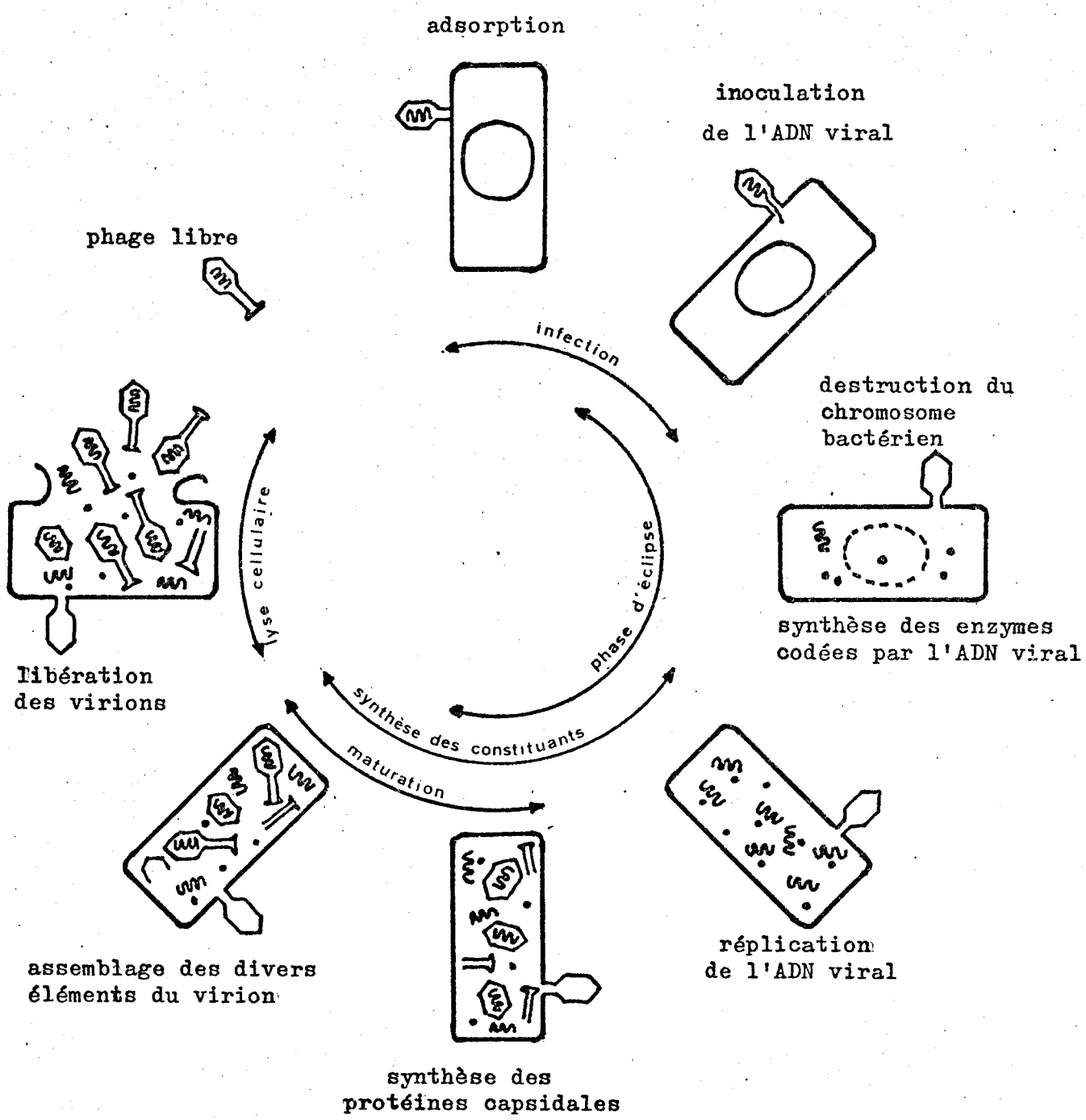


Schéma du cycle du bactériophage T2

BUS LILLE

(la couche "R" selon WEIDEL). La disparition de cette couche rigide s'explique par l'accumulation de lysozyme phagique dans les bactéries ; une fois cette rigidité rompue, la cellule devient incapable de résister à la pression osmotique et elle éclate, entraînant la lyse de la cellule.

L'étude faite par JACOB, FUERST et WOLLMAN (43, 44), des bactéries lysogènes défectives (bactéries lysogènes, qui une fois induites, sont incapables de synthétiser ou d'assembler tous les constituants d'un phage complet), a montré que si le lysozyme n'est pas synthétisé, la lyse ne se fait pas. L'activité lytique du lysozyme accumulé dans les bactéries infectées est donc un facteur prédominant de la lyse bactérienne finale, ou lyse "de l'intérieur" ("lysis from within") (25).

e) - Modifications réactionnelles des bactéries infectées

Une bactérie infectée par du phage, puis surinfectée par le même phage, lyse bien plus tard qu'une bactérie infectée une seule fois. Ce phénomène s'appelle "inhibition de lyse" ("lysis inhibition") (26). La réadsorption des phages libérés par la lyse des premières cellules infectées suspend la lyse du reste de la population par un mécanisme encore mal compris. La lyse de la culture est considérablement retardée, mais lorsqu'elle se produit, le rendement en phages s'en trouve considérablement augmenté (1.000 phages/bactérie).

Ce phénomène semble concerner les enveloppes bactériennes, notamment en amenant un renforcement de celles-ci et qui se manifeste vis à vis de la lyse "de l'intérieur" finale qui est différée. Ce renforcement des enveloppes bactériennes se manifeste aussi vis à vis d'une action externe (dans le cas de l'exclusion, empêchant l'entrée d'un autre DNA). L'ensemble permet l'accumulation du lysozyme sans lyse précoce de la cellule. Une multiplicité d'infection normalement suffisante pour provoquer la lyse "de l'extérieur" ("lysis from without") (6, 61, 67, 70) d'une bactérie non infectée ne se produit pas lorsque le développement intracellulaire d'un phage est déjà commencé depuis quelques minutes (98).

MATERIEL ET METHODES

I. PHAGE ET BACTERIE-HÔTE

Escherichia coli K 10 a été utilisé comme bactérie-hôte. C'est une bactérie qui pousse très bien sur tous les milieux utilisés, et lorsque celle-ci est cultivée en présence de lactose, elle synthétise une enzyme qui est la β-Galactosidase.

Les différentes cultures sont réalisées sous agitation permettant ainsi une bonne aération, donc une bonne oxygénation du milieu. La densité de population a été suivie par la lecture de la densité optique à 600 nm et par comptage sur boîtes de Pétri.

Le bactériophage employé est la souche T6 qui produit de petites plages de lyse sur boîte de Pétri. Antigéniquement et morphologiquement, le phage T6 se rapproche des phages T2 et T4 et il se reproduit pratiquement de la même façon qu'eux.

II. MILIEUX DE CULTURE

Toutes les bactéries employées ont été entretenues par repiquages successifs sur gélose ordinaire.

- Composition des différents milieux de culture :

- Gélose ordinaire

Peptone	10 g
Extrait de viande	4 g
NaCl	5 g
Agar	13 g
H_2O qsp	1 litre
pH final :	7,2

- Milieu de Luria

Tryptone	10 g
Extrait de levures	5 g
NaCl	5 g
H_2O qsp	1 litre
pH final :	7,3

Pour obtenir du Luria gelosé, ajouter 10 g/l d'Agar.

- Milieu M 9

$Na_2 HPO_4$	7 g
$KH_2 PO_4$	3 g
$NH_4 Cl$	1 g
$MgSO_4$	10^{-3} M
$CaCl_2$	10^{-4} M
$FeCl_3$	$2x10^{-6}$ M
Glucose	10 g
H_2O qsp	1 l
pH final:	6,9 à 7,2

- Bouillon ordinaire

Peptone	10 g
Extrait de viande	4 g
NaCl	5 g
H_2O qsp	1 litre
pH final :	7,2

- Milieu de FRASER

KH_2PO_4 ..... 4,5 g

Na_2HPO_4 ..... 10,5 g

NH_4Cl ..... 3 g

Glycérol ..... 24 ml

(ou Lactose 10 ou 20 % ..... 100 ml)

Difco Casamino-acides ..... 15 g

$MgSO_4$ 1M ..... 1 ml

$CaCl_2$ 0,1M ..... 1 ml

Gélatine 1 % ..... 3 ml

H_2O qsp ..... 1 litre

pH final : 6,9 à 7,2

- Milieu pour Micrococcus lysodeikticus

Dans des bouteilles de Roux on prépare :

Extrait de viande ..... 15 g

Peptone pancréatique ..... 60 g

Gélose ..... 90 g

NaOH 2,5N ..... 25 ml

H_2O qsp ..... 3 litres

pH final : 7,3 - 7,4

Après autoclavage, ajouter du glucose (2 g/l) . On cultive pendant 48 à 60 heures à 37° C.

III. TECHNIQUE DE NUMERATION DES PHAGES

Cette technique est basée sur l'utilisation de la double couche. Elle permet de connaître le nombre de phages soit à partir d'un stock établi sur boîte de Pétri, soit à partir d'un lysat liquide.

1. Etablissement d'un stock à partir de boîtes de Pétri

Cette technique est très simple : dans un tube à petite gélose contenant de la gélose à 5 p 1000 en surfusion (44° C) (c'est-à-dire de la gélose fondue préalablement au bain-marie bouillant puis maintenue à 44° C), on ajoute 0,25 ml d'une culture d'*Escherichia coli* et 0,1 ml d'une suspension de phages. Le tout est ensuite versé sur une couche de milieu Luria gélosé, dans des boîtes de Pétri. L'incubation est réalisée à 37° C pendant la nuit.

Le lendemain matin, la couche de gélose molle est récupérée à l'aide d'un étaleur et versée dans un tube à centrifuger stérile. Du chloroforme est alors ajouté (1 ml pour 4 boîtes) et l'ensemble est homogénéisé par brassage à l'aide d'une pipette. Le tube est ensuite centrifugé à 17.000 trs/mn pendant 20 mn et à + 4° C. On obtient trois phases : une phase supérieure renfermant les phages, une phase intermédiaire renfermant la gélose et enfin une phase inférieure contenant le chloroforme. Seule la phase supérieure est recueillie.

- Composition des petites géloses :

  - Agar Difco ..... 7,5 g
    ou Agar Biomar ..... 5 g
  - H_2O bidistillée ..... 1 l

  on répartit 4 ml/tube.

Pour obtenir un lysat en phase liquide, du phage est inoculé à la culture en phase exponentielle de croissance. Une fois le nombre

maximum de phages obtenu (vérifié par numération), les débris cellulaires et les cellules intactes sont éliminés par centrifugation, les phages restant dans le surnageant.

2. Numération des phages

Le lysat ainsi obtenu est dilué dans du milieu Luria jusqu'à 10^{-9} et dosé en utilisant une culture d'Escherichia coli non infectée. Dans un tube à petite gélose renfermant 4 ml de gélose à 5 ° p 1000 (Agar Biomar) en surfusion (44° C), on ajoute 0,25 ml de culture et 0,1 ml de la dilution de phages. Le tube est ensuite coulé en double couche sur milieu Luria Gélosé, et l'ensemble est mis à incuber à 37° C. Les bactéries en se multipliant forment une nappe ; les phages qui ont infecté une bactérie au départ, puis, par diffusion dans la gélose, les bactéries voisines, forment une plage de lyse. On a établi qu'un seul phage peut donner naissance à une plage de lyse. Pour connaître le titre du lysat, on multiplie le nombre de plages de lyse obtenu par le facteur de dilution. Ce titre est ramené en nombre de particules infectieuses par ml.

IV. DETERMINATION DE L'ACTIVITE LYTIQUE

L'activité lytique du lysozyme peut être dosée par différentes méthodes qui sont principalement basées sur l'estimation de la lyse par turbidimétrie (17, 65, 66, 88, 95) ou par mesure de la solubilisation des composés de la paroi (42, 83), ou par colorimétrie (108).

Pour notre part, étant amenés par la suite à doser l'activité biologique du lysozyme sur différentes bactéries, nous avons préféré la méthode turbidimétrique. Pour cela deux techniques ont été retenues : la première utilisant le substrat classique du lysozyme : c'est-à-dire Micrococcus lysodeikticus, la deuxième utilisant comme substrat Escherichia coli K 10.

1. Micrococcus lysodeikticus

a) - Préparation des poudres acétoniques (16)

Ces préparations ont l'avantage d'une assez longue conservation. On fait une abondante récolte de bactéries cultivées soit en milieu liquide, soit sur de grandes surfaces de gélose. On lave par centrifugation en présence d'eau distillée stérile et à froid (+ 4° C). Le culot est repris par une petite quantité d'eau de façon à préparer une pâte onctueuse et homogène. On ajoute 10 volumes d'acétone refroidie à 0° C. On mélange soigneusement. On laisse floculer 5 à 10 mn dans un bain de glace à - 5° C. On centrifuge en maintenant toujours cette basse température. Laver à deux reprises avec de l'acétone refroidie ou un mélange alcool + acétone (V/V) ou encore à l'alcool - éther. Sécher le résidu sous vide. La poudre acétonique est conservée sous atmosphère d'azote et à + 4° C. Ces poudres peuvent être utilisées plusieurs semaines pour mesurer l'activité lysozyme.

b) - Mode opératoire

On prépare une suspension en agitant très fortement dans 90 ml de solution tampon phosphate M/15 (pH 6,2 pour le lysozyme de blanc d'oeuf, pH 7,5 pour le lysozyme de phage) et 10 ml de NaCl à 1 p100, une quantité suffisante de poudre acétonique pour obtenir une densité optique de 0,70 à 600 nm.

A 5 ml de suspension on ajoute 0,5 ml de solution enzymatique. Le dosage est effectué à 20° C.

Pour connaître l'activité lysante, on choisit de mesurer le temps en secondes correspondant à une diminution de 40 p100 de la densité optique de la suspension et on appelle ce temps t_{40} ; on définit l'activité a par :

$$a = \frac{1}{t_{40}} \times 10^5$$

Les valeurs de a sont étalonnées en γ de lysozyme de blanc d'oeuf.

2. Escherichia coli

a) - Préparation du substrat

Nous avons testé plusieurs méthodes pour ne retenir finalement que celle décrite par MARK (65) qui a l'avantage de mesurer de très faibles activités et d'utiliser des préparations cellulaires beaucoup plus sensibles à l'action du lysozyme.

La souche d'Escherichia coli K 10 est cultivée dans du milieu Tryptone :

Tryptone ..... 10 g

NaCl ..... 5 g

H_2O ..... 1 litre

pH final = 7,2

et en agitation à 30° C jusqu'à ce que la culture atteigne 8. 10^8 cellules/ml. Cette culture est ensuite stoppée, lavée, centrifugée et suspendue dans le même milieu froid à une concentration de 8. 10^9 cellules/ml. Cette suspension est ensuite stockée à + 4° C pendant deux à trois semaines avant emploi.

Immédiatement avant emploi, les cellules sont diluées 10 à 20 fois avec du tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 afin que la densité optique à 350 nm soit comprise entre 0,70 et 0,80, puis traitées au chloroforme (1 % volume final). Cette nouvelle suspension est conservée dans un bain de glace car on note une légère perte de stabilité à des températures supérieures.

b) - Dosage enzymatique et courbe étalon

Cette méthode est très simple et très sensible. Elle est basée sur la mesure de la variation de turbidité au cours de l'action enzymatique, et elle permet de doser des échantillons de l'ordre de 0,01 γ de lysozyme de blanc d'oeuf par ml.

2,5 ml de la nouvelle suspension cellulaire sont placés dans un tube à essais préincubé à 37° C dans un bain marie. Une minute plus tard nous ajoutons 0,5 ml d'enzyme, ce qui nous permet de faire plusieurs mesures dans une série. Chaque échantillon est incubé à 37° C pendant 15 mn, puis la densité optique est lue à 350 nm. Différents témoins sont effectués simultanément.

Du fait que la densité optique et la sensibilité de la suspension cellulaire change d'une préparation à l'autre, il convient d'établir une courbe étalon à chaque fois afin de comparer les résultats de différentes séries d'essais. Différentes concentrations de lysozyme de blanc d'oeuf sont préparées dans du tampon UV :

Na_2HPO_4	3 g
KH_2PO_4	1,5 g
NaCl	4 g
K_2SO_4	5 g
$MgSO_4$	10^{-3}M
$CaCl_2$	10^{-4}M
H_2O	1 litre

qui est ensuite autoclavé.

0,5 ml de tampon UV sont utilisés à la place des 0,5 ml d'enzyme pour les témoins blancs. Le dosage est effectué de la même manière que précédemment et avec la même suspension cellulaire. La

courbe étalon est tracée en rapportant la concentration du lysozyme de blanc d'oeuf à la variation de densité optique :

$$(\Delta \text{ D.O.} = \text{D.O.}_{\text{Témoin}} - \text{D.O.}_{\text{enzyme}})$$

Tous les essais enzymatiques effectués sur le lysat phagique sont ramenés en équivalents lysozyme de blanc d'oeuf.

La différence de densité optique (Δ D.O.), observée pour les essais effectués sur le lysozyme de phage, est convertie en unités d'activité spécifique à partir de la courbe étalon, définissant 0,1 γ /ml de lysozyme de blanc d'oeuf comme une unité d'activité spécifique.

V. DOSAGE DE LA β-GALACTOSIDASE

Cette enzyme dégrade des substrats synthétiques tels que l'ONPG (orthonitrophényl - β - D - galactoside), substrat dont le produit d'hydrolyse, l'orthonitrophénol, peut être dosé par colorimétrie (40).

1. Réactifs

- ONPG : solution 0,01 M

- solution de carbonate de sodium : 1 M

- tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 7,25 + 0,2 N NaCl

2. Mode opératoire

A 30° C ajouter 3,5 ml de tampon phosphate, 0,5 ml d'ONPG et 1 ml de lysat (dilué ou non). Laisser incuber pendant 10 minutes, puis verser 1 ml de solution carbonate de sodium et compléter avec de l'eau jusqu'à 10 ml. Lire la densité optique à 410 nm.

VI. CONCENTRATION DES PHAGES PAR LE POLYETHYLENE-GLYCOL

Les bactériophages peuvent être rapidement concentrés à partir d'un lysat après addition de polyéthylène-glycol PEG (20,107). Nous avons employé une méthode voisine de celle utilisée par CALOTHY et coll. pour la concentration des virus (20).

On ajoute au lysat débarrassé des débris bactériens une solution de polyéthylène-glycol 6.000 (Merck) à 50 % dans un tampon phosphate 0,05 M pH 7, de façon à obtenir une concentration finale en PEG de 5 %. Après avoir mélangé vigoureusement le lysat est laissé au moins trois heures à 4° C, puis centrifugé à 9.000 trs/mn pendant 40 mn dans le rotor GSA (Sorvall). Les culots déposés sur les parois des pots de centrifugation sont soigneusement repris dans du tampon, afin d'avoir un volume égal au 1/20 du volume initial. On récupère environ 98 % des phages. Ceux-ci peuvent être purifiés par un ou deux cycles de centrifugation (52).

VII. PURIFICATION DU LYSOZYME DE PHAGE

1. La résine

Nous avons employé de la résine Amberlite IRC - 50, utilisée après équilibration de celle-ci par du tampon phosphate 0,05 M, pH 5,8.

Le Rivanol (6,9 - diamino - 2 - éthoxyacridine ; Serva - Heidelberg) utilisé dans les premières étapes de la purification, reste adsorbé sur la résine. Il peut être enlevé en traitant la résine avec une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % jusqu'à ce que la coloration jaune disparaisse.

2. Tampon d'élution

Nous avons utilisé comme tampon d'élution du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, contenant du $MgSO_4$ 10^{-3} M. Ce tampon a été utilisé pour laver les colonnes sur lesquelles le lysozyme a été adsorbé et pour éluer l'enzyme en y ajoutant du NaCl.

RESULTATS

PREMIÈRE PARTIE :

MISE AU POINT DE LA LYSE

Des bactéries infectées par des bactériophages virulents de la série T (T1, T2,... T7) produisent du lysozyme dont la fonction unique semble être la lyse finale de la cellule hôte. Le bactériophage employé ici a été le bactériophage sauvage T6 (ou T6 r+) qui produit de petites plages de lyse sur gélose en boîte de Pétri. Dans un premier temps nous allons relater les méthodes que nous avons employées pour obtenir le maximum de phages dans les cultures, et conséquemment le maximum de lysozyme, avant de décrire la préparation de ce dernier et ses propriétés.

I. LE MILIEU DE CULTURE

1. Choix du milieu de culture

Le milieu de culture présente une grande importance et celui-ci doit être choisi soigneusement en fonction de ce que l'on veut obtenir.

Il existe deux sortes de milieu de culture : le milieu minimum composé de sels minéraux et d'un sucre, et le milieu complexe où la bactérie puise directement les composés organiques. Les bactéries se développent plus rapidement sur le milieu complexe et nos expériences d'infection de cultures bactériennes par du phage, nous ont permis de constater que le titre en phages était plus élevé sur milieu complexe que sur milieu minimum. Nous avions toutes les raisons de croire que plus le nombre de phages était grand et plus la quantité de lysozyme serait importante.

Pour se placer dans les conditions de croissance les plus favorables, les cultures sont faites dans chaque cas à la température optimale (37° C) et en agitation constante, permettant d'obtenir une oxygénation maximale du milieu, particulièrement lorsque la densité des cellules devient importante.

Nous avons ainsi testé plusieurs milieux de culture :

. le milieu de LURIA

. le milieu M 9

. le milieu de FRASER

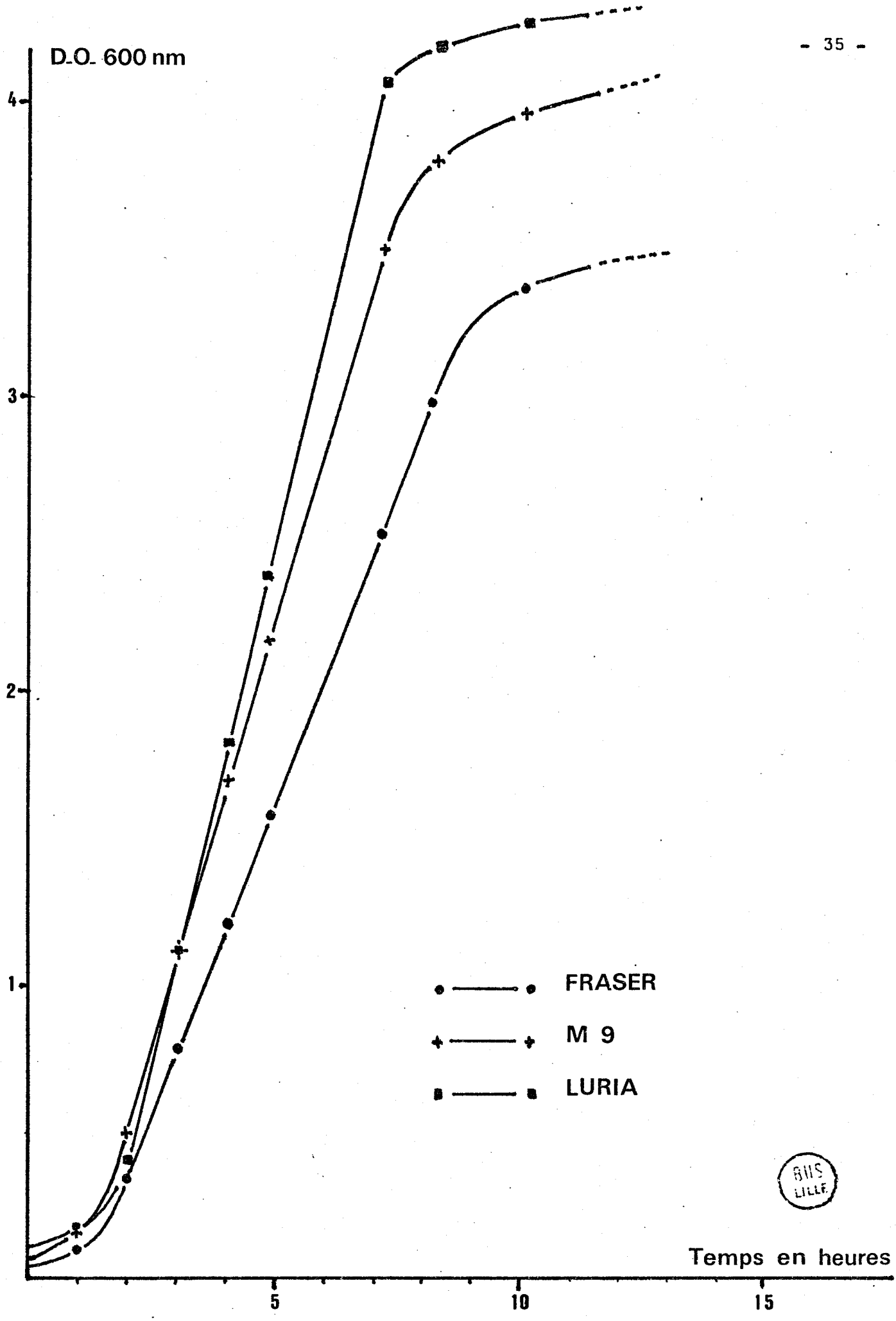
2. Résultats

Dans tous les cas, nous avons réalisé une préculture dans le même milieu pendant la nuit, cette préculture servant ensuite à ensemencer du milieu neuf le lendemain matin.. La figure 5 indique les différentes courbes de croissance obtenues avec les différents milieux de culture.

Escherichia coli se développe très bien sur ces différents milieux, mais donne de meilleurs résultats avec celui de LURIA. Lorsque nous inoculons du phage T6 de façon que le rapport phage/ bactéries soit identique pour les trois milieux de culture inoculés à la même densité optique de 1,0 à 600 nm, nous constatons que le meilleur rendement est obtenu avec le milieu de FRASER.

Milieux	Rapport phages/bactéries	Nombre de phages/ml de lysat
FRASER	1/100	$1,36.\ 10^{9}$
M 9	1/100	$9,4.\ 10^{8}$
LURIA	1/100	$7,6.\ 10^{8}$

Pour la suite de nos travaux nous avons donc retenu le milieu de FRASER comme milieu de production du lysozyme à partir de phages..



BUS LILLE

Figure 5 : Courbes de croissance

Partant de là, il convenait de déterminer les conditions optimum pour obtenir le maximum de phages possible.

II. OPTIMISATION DU RENDEMENT EN PHAGES

Cette première voie de recherche pour améliorer le rendement en phages après l'infection bactérienne concerne l'influence du moment de l'inoculation du phage dans la culture et l'importance de la multiplicité d'infection. Nous tenterons ensuite d'établir les critères affectant la culture des bactéries en relation avec le nombre de phages produits.

1. Principe

Quand une suspension de phages est mélangée à une suspension de bactéries sensibles, ceux-ci s'attachent à l'hôte bactérien (adsorption) et injectent leur acide nucléique. Une fois à l'intérieur de la cellule bactérienne, le DNA phagique dirige la synthèse des protéines nécessaires à sa réplication et à la formation des différents éléments de la capside. Ce cycle de multiplication se termine par la lyse de la bactérie et la libération d'un grand nombre de particules infectieuses (généralement un phage produit une centaine de virions).

Le rendement final en particules infectieuses est variable et dépend essentiellement de deux paramètres : la concentration en bactéries et le rapport phage/bactéries.

D'une façon générale plusieurs cas peuvent se présenter :

1°. le nombre de bactéries est largement en excès par rapport au nombre de phages, statistiquement un seul phage sera adsorbé par bactérie et il pourra y avoir plusieurs générations successives de phages.

2°. la multiplicité d'infection est de un phage/cellule, toutes les bactéries seront infectées et devraient se lyser en même temps ; en réalité on n'observe pas de lyse massive dans une population cellulaire dense, mais plutôt une lyse échelonnée dans le temps.

3°. le nombre de phages est nettement en excès par rapport au nombre de bactéries, il ne peut y avoir qu'une seule génération de phages mais il peut également se produire une lyse des bactéries ou "lyse de l'extérieur" (lysis from without) sans multiplication des phages.

2. Détermination du moment de l'inoculation

Concentration des bactéries

Le milieu de FRASER est ensemencé par une préculture d'*Escherichia coli*, et à des temps différents, des aliquots de 20 ml sont prélevés stérilement ; la densité optique est lue immédiatement à 600 nm, et chacun de ces aliquots est ensuite inoculé par du phage (0,1 ml d'un précédent lysat renfermant 10^8 phages/ml). A l'inoculat est également ajouté du tryptophane (20 γ par ml, concentration finale) pour obtenir une meilleure adsorption du phage. On laisse celui-ci s'adsorber pendant 15 minutes et la culture est ensuite poursuivie en agitation à 37° C.

Les différents lysats sont ensuite repris, centrifugés à 10.000 tours/minute pendant 20 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires et les cellules restées intactes, et leur titre est déterminé par la méthode des plaques.

Nous constatons que le nombre de phages est plus élevé quand l'inoculation a eu lieu à une $D.O._{600} \simeq 1,0$, ce qui correspond à 8.10^8 bactéries/ml. (Tableau I).

TUBES	D.O. 600 nm	NOMBRE DE PHAGES OBTENUS
I	39	$3,7.\ 10^9$
II	102	$4,2.\ 10^9$
III	161	$1,3.\ 10^8$
IV	200	$2,75.\ 10^8$
V	322	$2,4.\ 10^9$

TABLEAU I

Détermination du moment de l'inoculation.
Culture sur FRASER : prélèvements de 20 ml et inoculation de phages (0,1 ml de 10^8 phages/ml.)

BUS LILLE

Nous avons établi une relation entre le nombre de bactéries/ml et la densité optique à 600 nm ($D.O._{600}$). Pour la suite de nos travaux, il était plus aisé de se ramener à la densité optique pour déterminer le moment d'inoculation du phage dans les cultures.

3. Détermination du rapport phages/bactéries.

Une culture d'*Escherichia coli* est effectuée sur milieu de FRASER ; lorsque celle-ci atteint la D.O. = 100, soit 8. 10^8 bactéries/ml, elle est fractionnée stérilement en plusieurs lots identiques. A chaque fraction est ajouté du tryptophane (20 γ concentration finale) et des concentrations différentes de phages. Le nombre de phages obtenu est également déterminé par la méthode des plaques. Le tableau II indique les différents résultats.

Nous nous apercevons que le titre le plus élevé est celui de la fraction V, c'est-à-dire lorsque le rapport phages/bactéries est de 1/100. C'est ce rapport qui sera désormais retenu.

4. Influence de la source carbonée

Nous avons étudié certaines des conditions nécessaires pour obtenir un lysat riche en phages. Il est apparu intéressant d'améliorer encore ce rendement en jouant sur la nature de la source de carbone.

En effet, dès la première série d'expériences, nous nous sommes aperçus que le pourcentage de phages variait suivant la nature de la source de carbone fournie à la bactérie au moment de la culture.

Dans un premier temps, nous avons remplacé le glycérol par du glucose ou du lactose, la composition de base du milieu de FRASER restant la même. Le tableau III rassemble les différents essais réalisés ainsi que les résultats obtenus.

Fractions	Nombre de bactéries par ml	Nombre de phages par ml	Rapport phages/ bactéries	Nombre de phages obtenus
I	$8.\ 10^{8}$	$4.\ 10^{2}$	$\frac{1}{2.\ 10^{6}}$	$1,6.\ 10^{8}$
II	$8.\ 10^{8}$	$4.\ 10^{4}$	$\frac{1}{2.\ 10^{4}}$	$2,45.\ 10^{9}$
III	$8.\ 10^{8}$	$4.\ 10^{5}$	$\frac{1}{2.\ 10^{3}}$	$6.\ 10^{9}$
IV	$8.\ 10^{8}$	$4.\ 10^{6}$	$\frac{1}{200}$	$9,5.\ 10^{9}$
V	$8.\ 10^{8}$	$8.\ 10^{6}$	$\frac{1}{100}$	$3,04.\ 10^{10}$
VI	$8.\ 10^{8}$	$10.\ 10^{7}$	$\frac{1}{8}$	$1,62.\ 10^{10}$
VII	$8.\ 10^{8}$	$2,5.\ 10^{9}$	-	$2,36.\ 10^{10}$

BUS LILLE

TABLEAU II

Détermination du rapport phages/bactéries.

Nous nous apercevons que le titre en phages est différent d'un type de culture à l'autre, et si celui-ci est très satisfaisant, il apparaît néanmoins que la meilleure source de carbone est constituée par le lactose.

Dans un deuxième temps nous avons étudié l'influence du mélange glycérol - lactose en quantités égales. Nous constatons que c'est le lactose seul qui fournit les meilleurs résultats (Tableau III).

5. Conclusion

Cette étude nous a permis de voir l'influence de la concentration en bactéries et le mode d'infection pour obtenir le maximum de particules infectieuses dans le lysat.

L'étude de l'influence de la nature de la source carbonée a montré que selon le sucre utilisé dans le milieu de culture, le titre en phages varie considérablement.

Le lactose est donc un substrat particulièrement intéressant.

La substitution, dans le milieu de culture, du glycérol par le lactose présente plusieurs avantages. Le premier, nous venons de le voir, permet d'augmenter la production de phages. Le deuxième avantage présente un intérêt fondamental ; la bactérie E. coli K 10, cultivée en présence de lactose, synthétise de la β-galactosidase, enzyme recherchée industriellement ; en effet, le lactose ne peut le plus souvent être utilisé comme source de carbone ou d'énergie s'il n'est d'abord dégradé en galactose et glucose.

Il existe un autre avantage dans la production de lysozyme de phage et présentant un intérêt économique : l'utilisation du lactosérum dont les rejets industriels sont particulièrement importants. Le lactosérum est riche en protéines, lactose et sels minéraux et les différentes études réalisées dans le laboratoire ont permis de montrer

Préculture sur Bouillon ordinaire

3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
50 ml FRASER sans glycérol + 10 ml de glucose 20 %	50 ml FRASER sans glycérol + 10 ml de lactose 20 %	60 ml FRASER + glycérol	50 ml FRASER + glycérol + lactose 20 %
I	II	III	IV

Culture jusqu'à D.O. = 100 et à ce moment là : inoculation du phage

<u>Numérations</u> : I = $1,7.\ 10^{10}$

II = $4,5.\ 10^{10}$

III = $1,35.\ 10^{10}$

IV = $4.\ 10^{10}$

TABLEAU III

Influence de la source carbonée sur le rendement en phages.

sa grande valeur et l'intérêt de son utilisation dans des domaines très divers (hydrolyse du lactose, production de protéines, substrat de fermentation....).

L'action du lysozyme relâché par les phages pendant leur cycle de multiplication provoque le passage de constituants bactériens dans le milieu dont la β-galactosidase ; la quantité d'enzyme relachée augmente avec le temps d'infection. Ceci nous a permis de suivre de façon simple la lyse bactérienne.

III. ETUDE DE LA LYSE

1. Description du phénomène

Si on ajoute des phages à une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, le début de l'infection se manifeste par une chute limitée de la densité optique de la culture (figure 6) et s'accompagne également de l'apparition de constituants bactériens dans le milieu, notamment de la β-galactosidase (figure 7).

Ce phénomène peut s'expliquer par une lyse locale du substrat muréique de la paroi sous l'effet du lysozyme contenu dans la particule infectante ou présent dans le lysat sous forme soluble, et n'a rien à voir avec la multiplication du phage.

La densité optique de la culture infectée atteint ensuite un nouveau maximum, puis celle-ci chute progressivement et on ne note plus de croissance bactérienne, on aboutit à une lyse quasi-totale de la suspension. Cette lyse finale résulte de l'activité lytique du lysozyme accumulé dans les bactéries infectées. Nous avons donc préférentiellement recherché à obtenir une lyse de l'intérieur plutôt qu'une lyse de l'extérieur qui ne produit pas de lysozyme.

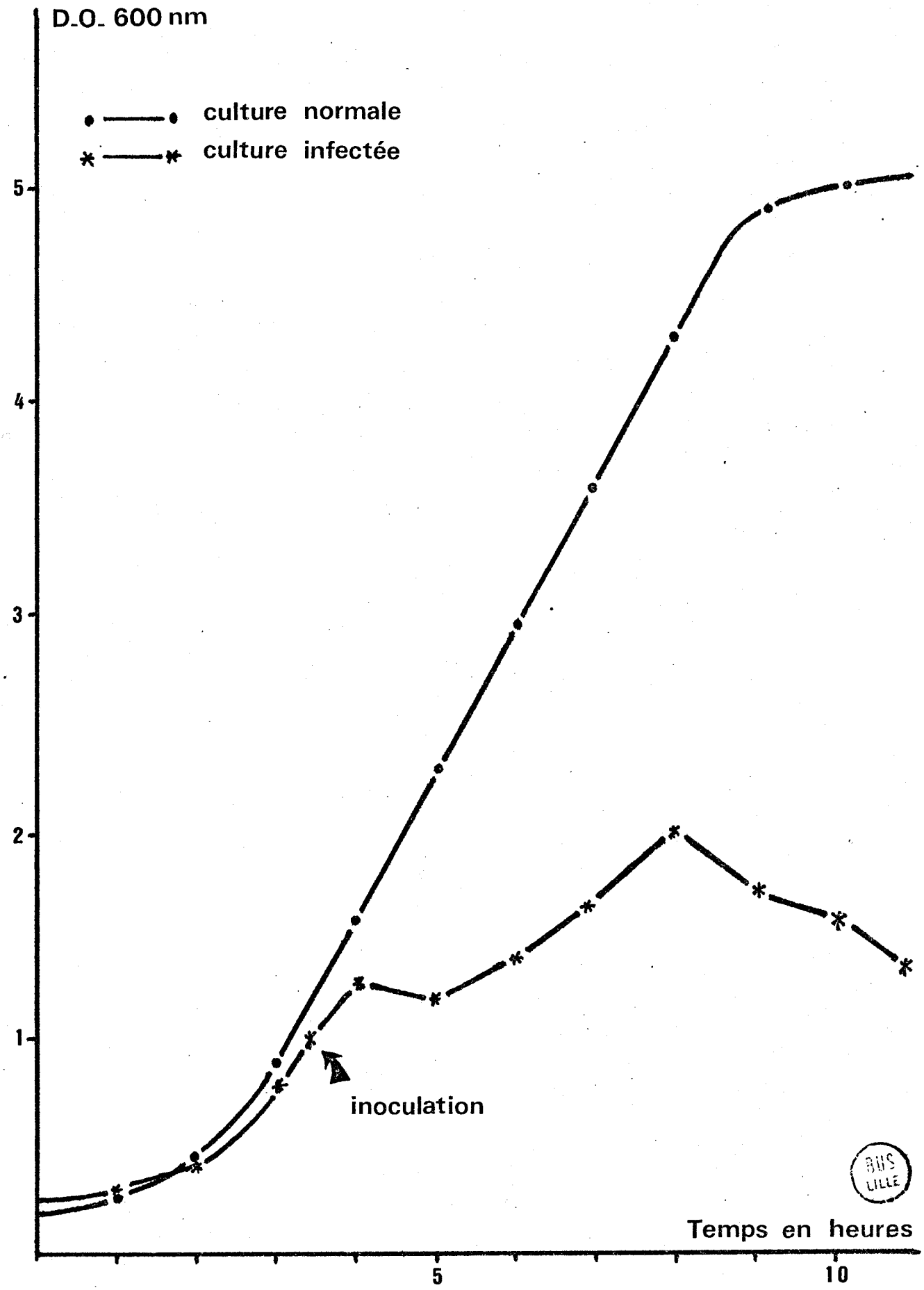


Figure 6 : Infection phagique et densité optique

2. Mise en évidence de la lyse par dosage de la β-galactosidase

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, il y a un relachement de β-galactosidase dans le milieu de culture, après infection par le phage de la souche d'Escherichia coli K 10, cultivée en présence de lactose.

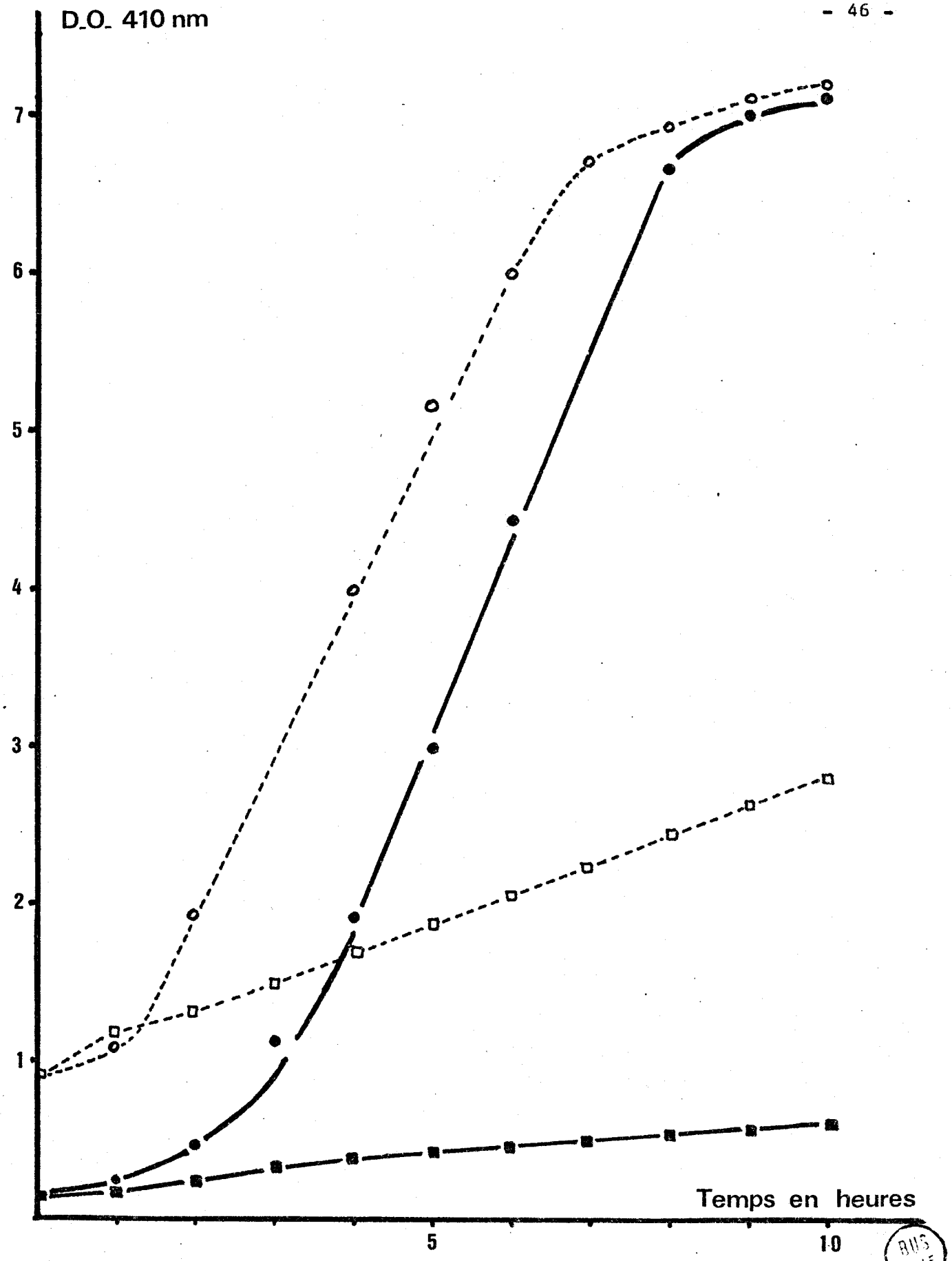
Habituellement la lyse peut être suivie d'autres façons dont la plus commune est basée sur l'augmentation des sucres réducteurs observée pendant la réaction enzymatique(83). Nous avions donc là une méthode originale, simple et rapide quant à la détermination et à l'estimation de la lyse. Il nous suffisait de prélever des aliquots à des temps différents, de les centrifuger et d'effectuer la réaction à l'ONPG sur le surnageant et de comparer les résultats obtenus par rapport à une culture qui n'avait pas été infectée par le phage.

La β-galactosidase est mesurée facilement par le test à l'ONPG, qui donne une coloration jaune lorsque la réaction est positive et dont l'intensité de coloration peut être lue à 410 nm.

Dans les cultures non infectées, où les cellules sont intactes, la mise en évidence de la β-galactosidase nécessite l'addition, dans le milieu réactionnel, de toluène pour perméabiliser la membrane. Des cellules non perméabilisées ne dégradent pratiquement pas l'ONPG.

Les résultats les plus intéressants concernent bien entendu les cellules infectées où il est surprenant de constater qu'il y a pratiquement 2,5 fois plus de β-galactosidase dosée par rapport à la culture témoin non infectée.(figure 7).

Nous devons exclure une augmentation de la synthèse de la β-galactosidase car le génôme de la bactérie est détruit après la pénétration du DNA phagique. Le RNA messager fonctionnel, une fois la bactérie infectée, est celui du phage et celui-ci ne code pas pour la synthèse de la β-galactosidase.



BUS LILLE

Figure 7 : Détermination de la lyse par dosage de la β-galactosidase

■——■ Culture témoin sans toluène ●——● Culture infectée sans toluène

□----□ Culture témoin avec toluène ○----○ Culture infectée avec toluène

Il est possible qu'une partie de la β-galactosidase est fixée intérieurement et, le toluène, en augmentant la perméabilité cellulaire, favoriserait la pénétration du substrat et sa dégradation à l'intérieur de la cellule. Par contre la lyse des bactéries entraîne le relâchement du suc cytoplasmique dans le milieu, la β-galactosidase ainsi libérée réagirait plus aisément et plus rapidement avec son substrat, d'où la différence constatée.

L'activité de la β-galactosidase semble rester constante une fois la lyse terminée. Cette méthode présente un autre avantage, c'est celui de déterminer le temps de lyse : dans le cas présent 8 - 9 heures. Au delà il ne semble plus y avoir de croissance bactérienne ni d'augmentation de l'activité de la β-galactosidase. Nous pouvons donc supposer que ce temps de 8 à 9 heures est suffisant pour obtenir le maximum de phages après l'inoculation. Il ne nous reste plus à présent qu'à mettre en évidence le lysozyme et à déterminer la quantité de cette enzyme dans le lysat.

IV. CONCLUSION

Au terme de cette étude, nous avons noté l'importance de la composition du milieu de culture. Différents essais ont permis de sélectionner un milieu permettant une croissance convenable des bactéries tout en augmentant sensiblement le taux de phages dans le lysat. Nous avons vu l'importance du moment de l'inoculation et surtout du nombre de phages inoculés. Nos recherches ont montré l'influence de la source carbonée et surtout le rôle "d'activateur" du lactose dans le rendement final en phages.

La mesure de la β-galactosidase nous a permis de suivre la lyse et particulièrement de déterminer le temps d'infection, et nous avons constaté qu'il coïncidait exactement avec la production maximale des particules infectieuses.

En résumé : nous avons retenu les conditions suivantes :

- milieu FRASER lactosé inoculé avec les bactéries et incubé à 37° C en agitation

- inoculation du phage lorsque la concentration des bactéries atteint 8. 10^8 bactéries/ml

- rapport phages/bactéries : 1/100

- addition au moment de l'inoculation de tryptophane : 20 γ /ml concentration finale

- temps d'infection : 8 heures

- au bout des 8 heures : addition de chloroforme pour obtenir le maximum de lysozyme

- stockage à + 4° C pendant quelques heures

- élimination des débris par centrifugation.

DEUXIÈME PARTIE :

ETUDE DU LYSOZYME

I. LE LYSOZYME

1. Mise en évidence

Le substrat de référence pour le lysozyme de blanc d'oeuf est Micrococcus lysodeikticus, bactérie à Gram positif. Nous avons donc utilisé cette bactérie pour tester l'activité lytique du lysat. De la poudre acétonique de M. lysodeikticus a été employée à cet effet.

Lorsque nous ajoutons 0,5 ml de lysat (surnageant) à 5 ml de suspension, nous constatons une chute rapide de la densité optique en fonction du temps, aboutissant très rapidement à un éclaircissement complet de la suspension bactérienne. Il est évident que le lysat renferme du lysozyme en apparemment grande quantité ; dans l'étape suivante il nous restait à déterminer la quantité de ce lysozyme.

2. Dosage

La méthode utilisant la poudre acétonique nous a donné de bons résultats mais très vite il nous est apparu qu'elle ne présentait qu'un intérêt limité : cette méthode n'est pas assez sensible pour doser des faibles activités.

Nous avons préféré utiliser des cellules d'E. coli d'autant plus que le lysozyme de phage est plus actif que le lysozyme de blanc d'oeuf sur des suspensions d'E. coli comme substrat (95).

Des cellules d'Escherichia coli, stockées deux à trois semaines à 4° C, sont suspendues dans du tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, saturé en chloroforme. La concentration des cellules est ajustée à une densité optique de 0,7 à 350 nm. Le traitement au chloroforme a pour but de solubiliser la couche lipidique de la paroi cellulaire et par conséquent de sensibiliser les cellules à l'action du lysozyme.

Cette méthode donne des résultats reproductibles, la quantité de lysozyme de phage étant déterminée par rapport à une courbe standard de lysozyme de blanc d'oeuf établie suivant la même méthode. Nous avons réussi à doser des activités jusqu'à 0,01 γ/ml de lysozyme (figure 8).

La figure 8 montre qu'il y a une relation linéaire entre la différence de turbidité et l'activité enzymatique.

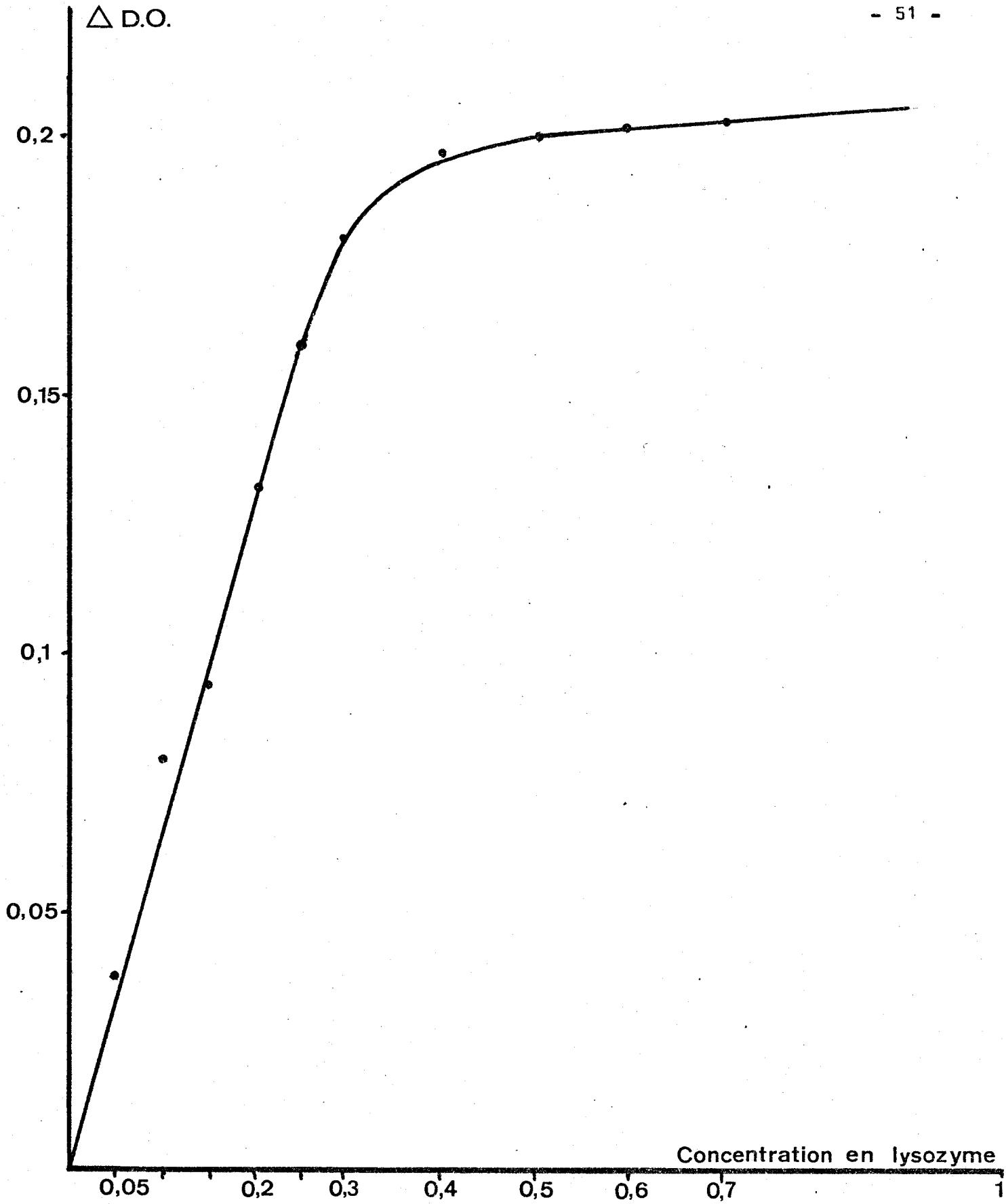
Nous avons défini que la différence de densité optique (Δ D.O.) observée pour le lysozyme de phage est convertie en unités d'activité spécifique à partir de la courbe standard, définissant 0,1 γ/ml de lysozyme de blanc d'oeuf comme une unité d'activité spécifique.

II. ASPECT QUALITATIF DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU LYSAT

Notre but est de produire du lysozyme en masse à partir d'un lysat phagique et de recueillir ensuite la totalité de cette enzyme.

Après avoir étudié dans les chapitres précédents l'activité enzymatique du lysat, nous avons essayé de localiser celle-ci. En effet des lysats exempts de phages T6 sont capables de lyser des bactéries traitées au chloroforme.

Les dosages d'activité du lysozyme réalisés sur de tels lysats libres de phages ont montré une forte dégradation du substrat. Il semblerait donc bien qu'une grande partie du lysozyme se trouve solubilisée dans le milieu. Il était intéressant par conséquent de connaître la proportion exacte de cette activité par rapport au lysat total et de savoir si une partie de l'activité enzymatique ne se trouvait pas attachée à la queue du phage. C'est ce que nous allons essayer de déterminer par deux techniques différentes : ultracentrifugation et sédimentation des phages par le polyéthylène-glycol.



BUS LILLE

Figure 8 : Courbe étalon du lysozyme de blanc d'oeuf

1. Ultracentrifugation

Du lysat frais est prélevé puis est soumis à l'action du chloroforme pendant quelques heures à 4° C afin d'obtenir le maximum de phages et de lysozyme. Les débris sont ensuite éliminés par une première centrifugation à 7.000 tours/minute dans la Sorvall à 4° C, puis par une deuxième centrifugation à 15.000 tours/minute pendant 20 minutes. Le surnageant est recueilli et les phages sont ensuite concentrés à 56.000 g (centrifugeuse Spinco, Beckmann L3-40 ultracentrifuge, rotor 60-Ti) pendant 3 heures.

L'activité enzymatique a ensuite été déterminée sur le surnageant et le culot repris par 10 ml de tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,5. Les résultats sont exprimés en équivalents lysozyme de blanc d'oeuf.

	Volume	lysozyme γ/ml	Nombre de phages /ml
lysat complet	100 ml	12,3	10^{10}
surnageant	99,5 ml	10,2	$8,7.\ 10^{10}$
culot	10 ml	1,5	$3.\ 10^{8}$

Le culot ayant été dilué par 10 ml de tampon, il convient en fait de multiplier ce résultat par 10, ce qui nous fait 15 γ de lysozyme, ce qui représente 1,2 % de l'activité du lysat total, de départ, s'expliquant en partie par le fait qu'il reste un peu de surnageant (celui-ci étant relativement visqueux) accroché aux parois du tube de nitro-cellulose lorsque le culot est remis en suspension.

2. Sédimentation des phages par le polyéthylène - glycol

Les bactériophages peuvent être rapidement concentrés à partir d'un lysat après addition de polyéthylène - glycol (PEG). (Tableau IV).

En opérant de cette façon, nous avons obtenu les résultats suivants :

	Volume en ml	lysozyme γ/ml	Nombre de phages /ml
lysat total	100	12,3	10^{10}
culot	5	0,125	$1,84.\ 10^{11}$

Par cette méthode 92 % des phages sont recueillis. Nous nous apercevons que l'activité du culot est extrêmement faible comparée à l'activité du lysat total. Le dosage ne peut être effectué sur le surnageant, car le polyéthylène - glycol en solution est un produit visqueux.

3. Conclusion

Les conclusions que l'on peut tirer de ces résultats sont de deux ordres :

- dans les deux cas le lysozyme se trouve pratiquement sous forme entièrement soluble dans le lysat.

- la préparation du lysozyme en masse permettra de recueillir le lysozyme en totalité à partir du surnageant du lysat. Cette méthode présente la plus grande rentabilité puisqu'elle ne

Préculture

↓

Culture

↓

D.O. = 1 : Inoculation du phage
(phages/bactéries ± 1/100
+ Tryptophane (20 γ conc. finale)

↓

9 H. après inoculation : 2 ml $CHCl_3$
24 g NaCl
par litre de culture

↓

4° C pendant 4 - 5 heures

↓

Centrifugation 10.000 trs/mn 10 mn

↓

addition de X ml de PEG 50 p100 → conc. finale 5 p100

$$X = \frac{V}{9}$$

V = Volume culture

X = Quantité de PEG 50 p100 à ajouter

↓

4° C, 4 - 5 heures

↓

10.000 trs/mn, 40 mn

↓

culot repris par le tampon Phosphate pH 7

Le phage est ensuite purifié par un ou deux cycles de centrifugation.

TABLEAU IV

Concentration des phages par le polyéthylène glycol 6.000

BUS LILLE

nécessite pas de traitement supplémentaire de ce dernier pour obtenir le maximum d'enzyme.

Ceci nous conduit à supposer que la quantité de lysozyme synthétisée à l'intérieur de la bactérie est plus grande que celle liée à la plaque caudale du phage à l'état libre.

III. PURIFICATION DU LYSOZYME DE PHAGE

1. Considérations générales

Nous avons vu dans les chapitres précédents que le lysat possède une forte activité lytique et que cette activité lytique est dûe au lysozyme qui a été synthétisé par les phages au cours de l'infection des bactéries. Les conditions de culture ainsi que les différents paramètres influençant le rendement final en particules infectieuses ont également été définis.

Tous ces résultats ont permis d'obtenir des lysats présentant un titre élevé en phages et en contrecoup une quantité non négligeable de lysozyme sous forme soluble.

Nous avons entrepris de purifier cette enzyme non pas dans le but d'une caractérisation poussée mais plutôt dans celui d'obtenir une activité spécifique augmentée.

Parce que le lysozyme de phage est généralement une petite protéine basique, plusieurs méthodes conventionnelles sont employées pour sa purification. Ces méthodes utilisent essentiellement des résines faiblement acides pour leur chromatographie, ou alors des Sephadex. Un autre point important est l'enlèvement du DNA étant donné la grande viscosité que celui-ci confère au lysat.

Nous sommes donc partis de 20 litres de culture pour réaliser cette purification. Le lysat final contenait 5,2. 10^{10} phages/ml.

Après plusieurs essais effectués, nous avons retenu la méthode employée par TSUGITA et coll. pour la purification du lysozyme du phage T4 (95).

2. Elimination du DNA

Le lysat est riche en DNA bactérien et par conséquent la solution est très visqueuse. Le caractère acide du DNA provoque une association avec les protéines basiques d'où l'aspect de "filaments" ou de "grumeaux" visibles en fin de lyse. Une méthode efficace pour l'enlèvement du DNA consiste en l'addition d'un colorant basique : le Rivanol (6,9 - diamino - 2 - éthoxy - acridine) à 0,25 % et à raison de 0,1 volume du lysat. Il se forme un précipité contenant le DNA, les débris cellulaires, les cellules intactes et les protéines acides, précipité qui est enlevé par sédimentation. Ce colorant ne semble pas inhiber le lysozyme, mais celui-ci étant jaune, il est impossible de discerner l'activité β-galactosidasique. En effet la β-galactosidase a pour propriété d'hydrolyser un substrat synthétique qui est soit l'ortho-nitrophénol - β - D - galacto-pyranoside (ONPG) soit le para - nitrophénol - β - D - galacto-pyranoside (PNPG) qui est totalement incolore en solution et dont le produit de dégradation est l'ortho (ou para) nitrophénol coloré en jaune.

Toutefois il convient de signaler que dès la première chromatographie, la β- galactosidase n'est plus retrouvée. Le Rivanol inhiberait donc complètement son activité. Nous l'avons confirmé en ajoutant du Rivanol à une solution de β- galactosidase.

Des études complémentaires ont permis de montrer que lorsqu'on évitait de mettre du Rivanol, la β- galactosidase était retrouvée en totalité dans l'éluat, le lysozyme restant accroché sur la résine, mais la colonne avait tendance à se colmater au bout d'un moment. Cet inconvénient pouvait être supprimé lorsqu'on ajoutait de la DNase au lysat et qu'on la laissait agir un moment avant de passer la solution

sur la colonne. Une autre méthode utilisant du sulfate de streptomycine pour précipiter le DNA (5) a également donné d'excellents résultats ; le sulfate de streptomycine n'inhibant pas le lysozyme.

3. Concentration sur IRC - 50

Tout comme pour le lysozyme de blanc d'oeuf, des résines faiblement acides avec comme groupe fonctionnel un groupe carboxyle peuvent être utilisées pour la préparation du lysozyme de phage. De l'Amberlite IRC - 50 a été choisie pour sa facilité d'emploi.

Après le traitement au Rivanol, le surnageant limpide est dilué trois fois avec de l'eau distillée et le pH est ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique glacial. L'enzyme a été adsorbé sur une colonne d'IRC - 50 de 3,5 x 18 cm avec un écoulement approximatif de trois litres par heure.

Après que la colonne eut été lavée par du tampon phosphate 0,1 M pH 6,5 contenant du $MgSO_4$ (10^{-3}M), l'enzyme a été éluée avec ce même tampon contenant du NaCl 0,5M, avec un écoulement de 500 ml par heure. Des fractions de 100 ml ont été recueillies.

73,8 % de l'activité du départ a été retrouvée à la suite de cette concentration ; et considérant l'activité spécifique au maximum du pic, l'enzyme était 126 fois plus active par rapport à l'enzyme du départ (Tableau V).

4. Chromatographies

a) - première colonne

L'éluat de la première colonne est dilué trois fois avec de l'eau distillée et le pH est de nouveau ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique glacial.

Si les premières opérations ont pu être effectuées à température ambiante, toutes celles qui suivent ont été réalisées à + 4° C.

Fractions	A 280	Dilution enzymatique	γ /ml	Unités/ml
1	0,02	1/10	1	10
2	0,02	1/10	2,5	25
3	0,035	1/10	5,5	55
4	0,04	1/10	7,5	75
5	0,047	1/100	11	110
6	0,053	1/100	13	130
7	0,097	1/100	13,7	137
8	0,055	1/100	12	120
9	0,035	1/50	9,5	95
10	0,042	1/50	5,5	55
11	0,045	1/10	2,6	26
12	0,031	1/10	1	10
13	0,02	1/10	0,55	5,5
14	0,025	1	0,35	3,5
15	0,03	1	0,2	2
16	0,025	1	0,1	1
17	0,025	1	0,1	1
18	0,025	1	0,01	0,1
19	0,035	1	0,01	0,1
20	0,25	1	0,01	0,1
21	0,02	1	0,01	0,1

TABLEAU V

BUS LILLE

Concentration sur IRC - 50

La solution a été adsorbée sur une colonne de 1,5 x 27,5 cm d'IRC - 50 et l'écoulement a été de 500 ml par heure. Comme précédemment la colonne a été lavée par du tampon phosphate 0,1 M pH 6,5 contenant du $MgSO_4$ 10^{-3}M jusqu'à ce que le pH de l'éluat soit égal à 6,5. Le lysozyme a ensuite été élué à l'aide d'un gradient linéaire établi de la façon suivante :

1er erlen : 1,5 l de tampon phosphate 0,1 M pH 6,5
+ $MgSO_4$ 10^{-3}M

2me erlen : 1,5 l du même tampon
+ NaCl 0,5 M

Des fractions de 30 ml ont été recueillies (Tableau VI) (figure 9).

68 % de l'activité totale de départ a été ainsi recueillie, mais l'activité spécifique est très nettement augmentée puisque pour le maximum du pic on note que l'enzyme est 172 fois plus active que celui de départ.

b) - deuxième colonne

Les fractions actives ont été réunies et passées de nouveau sur IRC - 50 dans une deuxième colonne de 1 x 25 cm. Nous avons procédé de la même façon que décrit plus haut excepté que 300 ml de chaque solution tampon ont été utilisés pour établir le gradient linéaire. Des fractions de 10 ml/tubes ont été éluées et à raison de 100 ml/heure (Tableau VII)(figure 9).

On ne retrouve ici que 55 % de l'activité totale de départ mais l'activité spécifique montre que l'enzyme est 255 fois plus active par rapport au lysat de départ.

Dans sa technique TSUGITA (95) poursuit la purification du lysozyme du bactériophage T4 en passant les fractions actives sur

Fractions	A 280	/ml	Unités par ml	Fractions	A 280	/ml	Unités par ml
1	0,011	0	0	21	0,071	7	70
2	0,022	0	0	22	0,062	4,25	42,5
3	0,05	0,05	0,5	23	0,06	4	40
4	0,025	0,075	0,75	24	0,057	2,5	25
5	0,025	1,75	17,5	25	0,132	2,75	27,5
6	0,035	2,75	27,5	26	0,061	2,5	25
7	0,055	4	40	27	0,05	2	20
8	0,105	5,25	52,5	28	0,045	2	20
9	0,127	8,75	87,5	29	0,037	2	20
10	0,142	15	150	30	0,044	1,5	15
11	0,168	20	200	31	0,043	1,5	15
12	0,137	23,25	232,5	32	0,038	1	10
13	0,141	27,5	275	33	0,039	1,5	15
14	0,126	26,25	262,5	34	0,035	1,5	15
15	0,1	23	230	35	0,044	1	10
16	0,122	19,5	195	36	0,039	0,5	5
17	0,108	17	170	37	0,037	0,5	5
18	0,08	14,25	142,5	38	0,037	0,05	0,5
19	0,075	11	110	39	0,038	0,1	1
20	0,099	10	100	40	0,037	0,05	0,5

TABLEAU VI

Résultats de la première colonne d'IRC - 50

BUS LILLE

Fractions	A 280	γ /ml	Unités/ml
1	0,025	0	0
2	0,02	0	0
3	0,035	0,55	5,5
4	0,048	0,7	7
5	0,063	3,5	35
6	0,155	13	130
7	0,14	23,5	235
8	0,198	40	400
9	0,27	69,5	695
10	0,316	82,75	827,5
11	0,39	113,5	1135
12	0,326	102,75	1027,5
13	0,237	68,75	687,5
14	0,228	52,50	525
15	0,21	29,5	295
16	0,184	11,75	117,5
17	0,151	7,50	75
18	0,12	5,25	52,5
19	0,132	3,75	37,5
20	0,087	2,75	27,5
21	0,074	1,25	12,5
22	0,07	1,75	17,5
23	0,053	1	10
24	0,062	1	10
25	0,035	0,5	5

TABLEAU VII

Résultats de la deuxième colonne d'IRC - 50

BUS LILLE

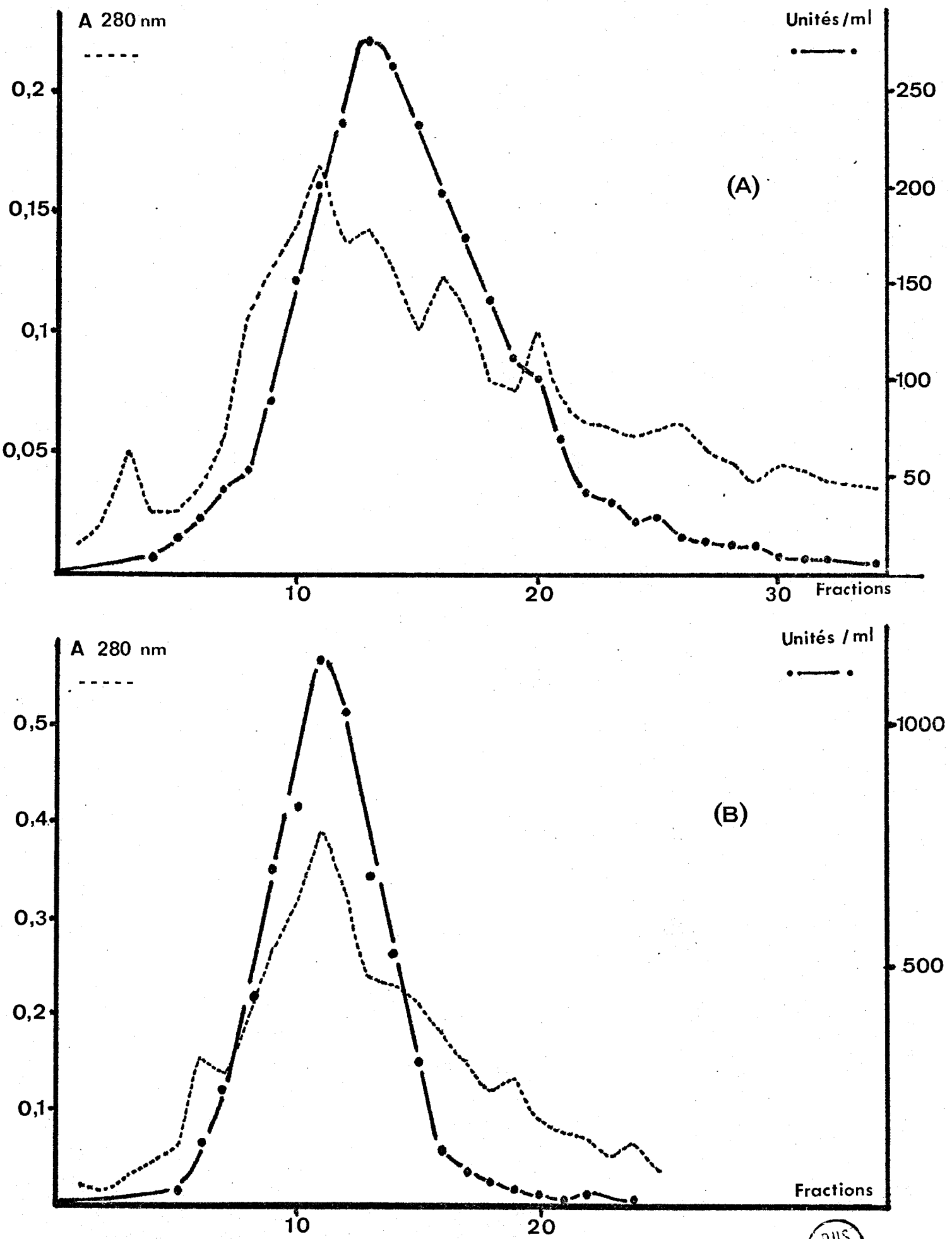


Figure 9 : Chromatographies sur IRC - 50

(A) : 1ère colonne

(B) : 2ème colonne

BUS LILLE

des gels de Sephadex G-75 pour resserrer davantage le pic des fractions actives.

Pour notre part nous nous sommes arrêtés là, ne poursuivant pas jusqu'à la cristallisation. D'autant plus que TSUGITA et coll. (95) étaient partis de plusieurs centaines de litres de lysat pour n'aboutir qu'à 80 mg de produit final.

Le tableau VIII rassemble les différentes expériences réalisées ainsi que les résultats obtenus.

	Activité du lysozyme		Activité spécifique
	Totale en unités	Recouvrement %	Unités A 280
Lysat	$11,55.\ 10^5$	-	11,44
Traitement au Rivanol	$11,55.\ 10^5$	100	*
Concentration sur IRC-50 ..	$8,52.\ 10^5$	73,8	1442
1ère colonne IRC-50	$7,867.\ 10^5$	68,11	1964,3
2ème colonne IRC-50	$6,365.\ 10^5$	55,1	2910,25

TABLEAU VIII

Recouvrement et activité spécifique à chaque étape de la purification du lysozyme de phage.

* l'absorbance n'a pas été mesurée parce que le Rivanol en solution possède une grande absorbance à 280 nm.

5. Détermination du pH optimum

L'activité du lysozyme à différents pH a été mesurée dans du tampon phosphate 0,05 M de pH 5,5 jusqu'à pH 7 et dans du tampon Tris-HCl 0,05 M de pH 7 à pH 9 (figure 10). L'optimum d'action se situe aux alentours de pH 7,3. L'activité décroit ensuite rapidement quand l'activité est mesurée à des pH plus élevés.

Les pourcentages d'activité sont ici ramenés en équivalent activité lysozyme de blanc d'oeuf, seul point de comparaison puisqu'on ne connaît pas la quantité de lysozyme de phage présente dans les solutions testées. Le substrat était une suspension d'*Escherichia coli* préparé et traité selon MARK (65).

6. Stabilité de la solution enzymatique

La solution enzymatique a été testée aux différentes températures de la façon suivante :

. l'enzyme a été incubée pendant 5 minutes dans du tampon phosphate 0,1 M pH 6,5 aux différentes températures, puis la solution a été refroidie dans un bain de glace et l'activité résiduelle mesurée comme décrit précédemment.

Les activités sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité trouvée à 35° C. Cette activité décroit très rapidement après 40° C (figure 11).

L'enzyme semble stable puisqu'incubée à 37° C toute une nuit dans un tampon phosphate 0,1 M pH 6,5, son activité ne varie que faiblement.

Nous avions déjà précédemment observé que des lysats débarrassés de leurs débris cellulaires et conservés à + 4° C pendant

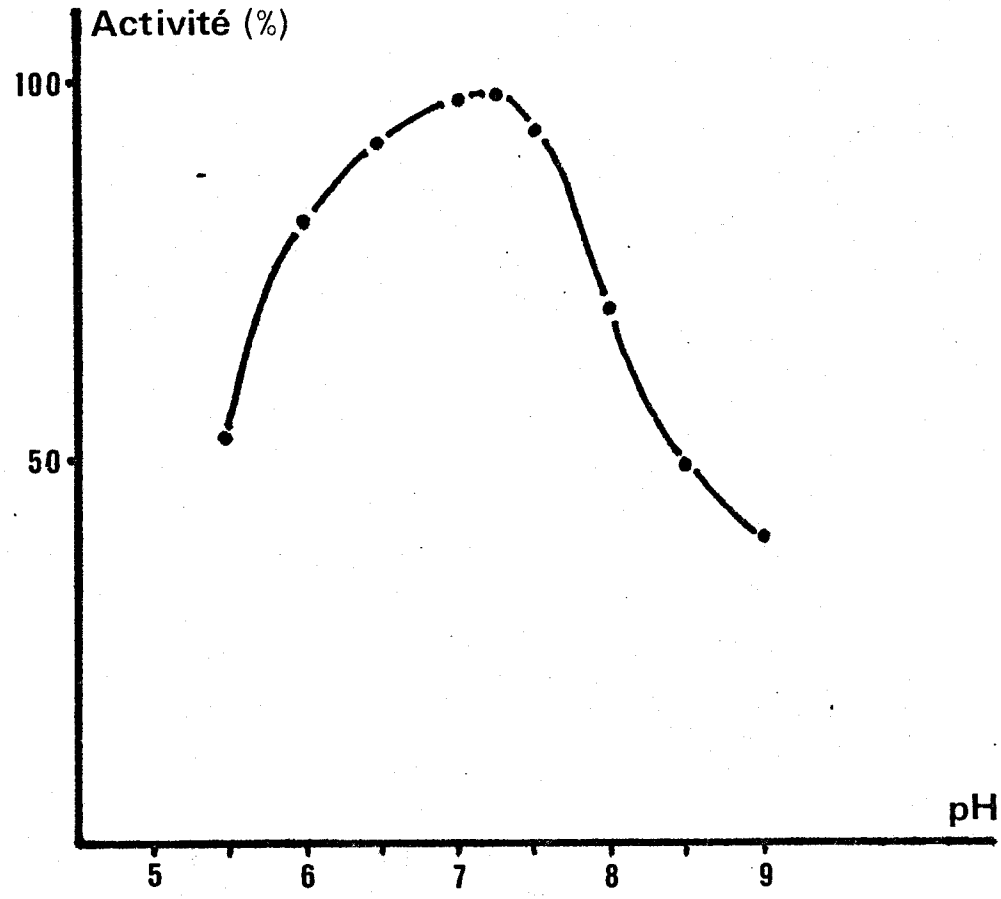
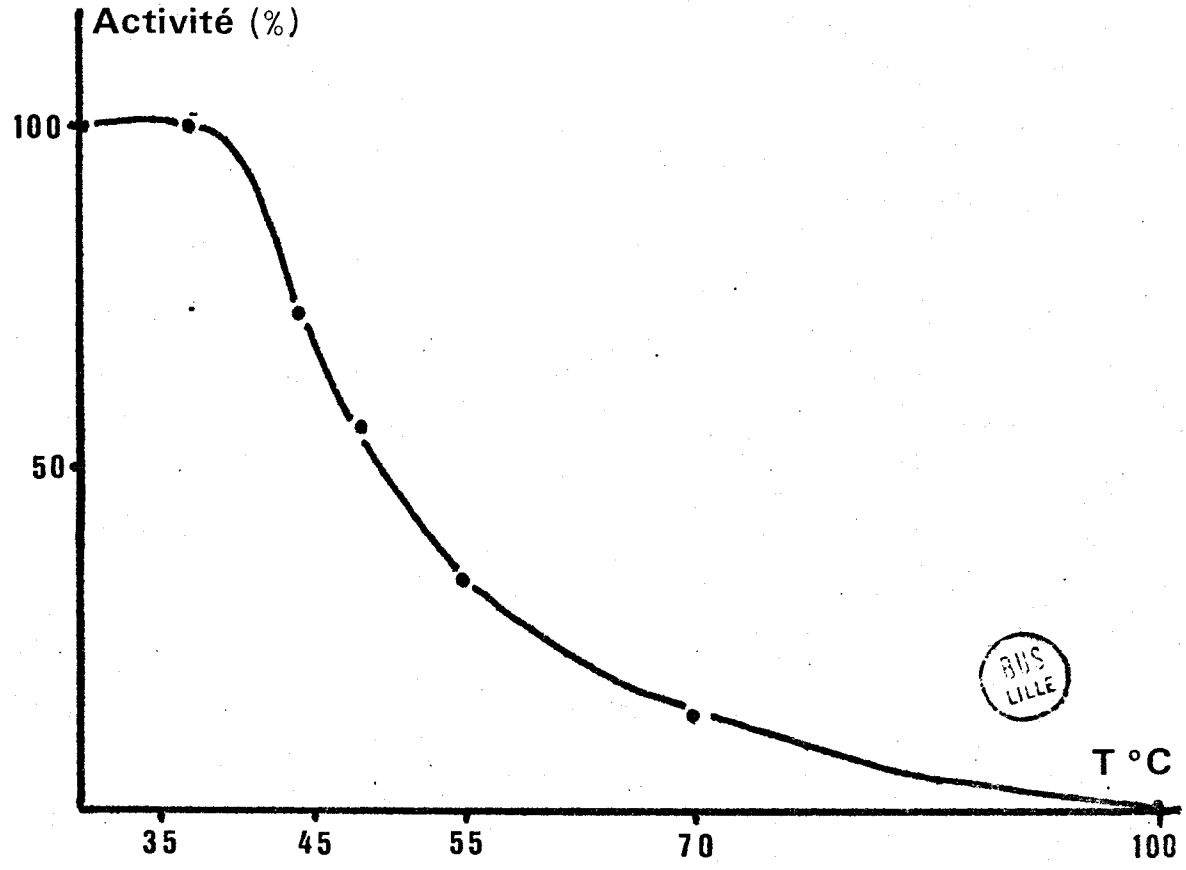


Figure 10 : Détermination du pH



BUS LILLE

Figure 11 : Stabilité de l'enzyme

plusieurs mois conservaient une activité relativement importante.

7. Conclusion

En conclusion nous pouvons dire que nos essais de purification ont essentiellement porté sur l'obtention d'une fraction enzymatique ayant une forte activité spécifique. Les différents critères (pH, température) pour une activité optimale de l'enzyme ont été décrits plus haut.

Arrivés à ce stade nous pouvions comparer l'activité biologique des deux lysozymes vis à vis de certaines bactéries et voir s'il existe des différences. C'est ce que nous nous proposons de déterminer dans les chapitres suivants.

TROISIÈME PARTIE :

PROPRIETES BIOLOGIQUES

En tant qu'enzyme, le lysozyme a exercé une grande attraction pour les microbiologistes. En effet il est connu pour ses propriétés bactériolytiques et bactéricides. Toutefois, seules certaines bactéries à Gram positif y sont sensibles, la majorité des autres et parmi ceux-ci les organismes pathogènes présentent une résistance quelquefois complète, même à de très grandes concentrations en lysozyme.

Des lysozymes d'origines différentes sont différents mais présentent cependant qualitativement la même activité biologique (coupure des liaisons β, 1-4 entre un résidu d'acide N-acétylmuramique et un résidu de N-acétylglucosamine). Si le lysozyme de phage et le lysozyme de blanc d'oeuf scindent spécifiquement la même liaison, on peut penser toutefois que cette vitesse de scission est différente et qu'elle varie avec les différents substrats.

Il y aurait donc des variations quantitatives de l'activité enzymatique des deux lysozymes, déterminant une activité spécifique et des vitesses d'action différentes.

Ces propriétés sont particulièrement intéressantes surtout dans le cas de préparation industrielle de lysozyme.

Dans les chapîtres suivants nous nous sommes efforcés de rechercher cette différence de spécificité d'action. Nous avons donc préparé du lysozyme de phage en masse, puis effectué une purification partielle de celui-ci. L'enzyme partiellement purifiée à été ensuite testée de plusieurs manières afin d'établir si celle-ci possèdait des propriétés intéressantes par rapport au lysozyme de blanc d'oeuf, surtout d'un point de vue économique pour l'utiliser préférentiellement au lysozyme de blanc d'oeuf.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Dans cette étude nous nous sommes appliqués à comparer l'activité du lysozyme de phage par rapport au lysozyme de blanc d'oeuf, et à essayer de déterminer des différences entre ces deux enzymes.

Plusieurs bactéries généralement sensibles au lysozyme ont été testées . Parmi celles-ci :

- Bactéries à Gram positif :

  . Bacillus cereus

  . Bacillus megatherium

  . Bacillus subtilis

  . Staphylococcus albus

  . Staphylococcus aureus

- Bactéries à Gram négatif :

  . Escherichia coli

  . Klebsiella pneumoniae

  . Pseudomonas aeruginosa

  . Salmonella typhimurium

  . Serratia marcescens

  . Shigella flexneri

Pour effectuer l'étude comparative, nous avons employé toute une série de méthodes. En effet le lysozyme attaque difficilement la paroi des bactéries vivantes et intactes, et dans la plupart des

cas l'emploi d'un traitement plus ou moins drastique s'avère nécessaire (chloroforme, EDTA, etc...).

1. Traitement par le chloroforme

Nous avons employé ici la même méthode que pour le dosage du lysozyme, c'est-à-dire une estimation de la lyse par turbidimétrie.

a) - Bactéries mortes

De la même manière que pour le dosage du lysozyme les différentes bactéries ont été cultivées sur Bouillon ordinaire, lavées, concentrées et stockées dans le même milieu pendant 2 à 3 semaines à + 4° C.

Une fois ce laps de temps écoulé, la plupart des bactéries ne sont plus viables et nous notons d'ailleurs une mortalité importante. Pour la suite de l'étude le protocole reste le même : les cellules sont chloroformées préalablement à l'action des deux enzymes. Nous avons choisi arbitrairement la concentration de 10 γ /ml de lysozyme de blanc d'oeuf, aussi comparativement nous avons dilué notre enzyme purifiée jusqu'à obtenir 10 γ /ml de lysozyme de phage (en équivalent lysozyme de blanc d'oeuf).

A 2,5 ml de suspension bactérienne chloroformée sont ajoutés 0,5 ml de solution enzymatique, la réaction s'effectue dans un bain marie à 37° C pendant 15 minutes. La densité optique de ces suspensions est prise au départ et au bout des 15 minutes (D.O. = 350 nm). Simultanément des "blancs" ont été effectués dans les mêmes conditions.

Les pourcentages de lyse ont été calculés de la façon suivante :

$$\frac{D.O.\ (E_0) - D.O.\ (E_F) - D.O.\ (T_0) + D.O.\ (T_F)}{D.O.\ (T_F)} \times 100$$

BACTERIES	Gram	Lysozyme de blanc d'oeuf %	Lysozyme de phage %
Bacillus cereus	+	1,4	0,9
Bacillus megatheriom	+	14,0	17,8
Bacillus subtilis	+	1,2	0,7
Escherichia coli	-	37,9	42,6
Klebsiella pneumoniae	-	42,9	40
Pseudomonas aeruginosa	-	5,8	5,2
Salmonella typhimurium	-	35,1	29,5
Serratia marcescens	-	6,6	5,3
Shigella flexneri	-	34,2	36,1
Staphylococcus albus	+	0,6	0
Staphylococcus aureus	+	0	0

TABLEAU IX

Traitement par le chloroforme

BUS LILLE

D.O. = Densité Optique

E_0 = D.O. suspension + Enzyme, temps 0

E_F = D.O. suspension + Enzyme, temps 15 mn

T_0 = D.O. suspension Témoin blanc, temps 0

T_F = D.O. suspension Témoin blanc, temps 15 mn

Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau IX.

Nous retrouvons sensiblement les mêmes résultats avec les deux lysozymes. Toutefois ceux-ci ne paraissent pas concluants. En effet nous avons obtenu un faible pourcentage de lyse avec la souche de Bacillus megatherium qui est pourtant une souche très sensible au lysozyme. Par contre le chloroforme semble particulièrement sensibiliser les bactéries Gram-, sauf dans le cas de Pseudomonas aeruginosa et Serratia marcescens.

Dans le cas de B. megatherium nous avons pensé que le stockage à + 4° C provoquait chez cette bactérie le phénomène de sporulation, rendant ainsi ces cellules nettement moins sensibles à l'action des deux lysozymes. Cette inhibition pouvait très certainement être levée lorsque des bactéries vivantes sont utilisées.

b) - Bactéries fraîchement récoltées

Nous avons recueilli des cellules en phase exponentielle de croissance, qui ont été lavées, et mises en suspension comme précédemment dans un tampon phosphate 0,05 M (pH 6,5 pour le lysozyme de blanc d'oeuf, ph 7,3 pour le lysozyme de phage). Nous avons pour la suite procédé de la même façon que précédemment. Les résultats sont rapportés dans le tableau X.

BACTERIES	lysozyme de blanc d'oeuf % lyse		lysozyme de phage % lyse	
	- $CHCl_3$	+ $CHCl_3$	- $CHCl_3$	+ $CHCl_3$
B. cereus	0	1,7	0	1,7
B. megatherium	31,2	22,4	36,9	32,4
B. subtilis	16,2	16,5	18,5	28,0
E. coli	0	32,9	6,5	44,3
K. pneumoniae	0,4	36,3	0	27,3
P. aeruginosa	4,7	20,5	6,3	18,2
S. typhimurium	0	27,4	0	26,6
S. marcescens	1,1	25,7	0	23,9
S. flexneri	3,0	39,8	0	30,9
S. albus	1,0	1,2	0	0,9
S. aureus	0	1,2	2,5	1,4

TABLEAU X

Etude comparative des deux lysozymes après traitement par le chloroforme sur des bactéries fraîchement récoltées

BUS LILLE

Nous voyons apparaître quelques différences. Si les deux enzymes fonctionnent bien avec la souche de B. megatherium, le lysozyme de phage semble avoir une meilleure action que le lysozyme de blanc d'oeuf ; il en est de même pour la souche d'Escherichia coli. Par contre le lysozyme de blanc d'oeuf présente une plus grande action sur K. pneumoniae et S. flexneri.

2. Traitement à l'EDTA

a) - Méthode par densité optique

Les résultats peuvent être améliorés, surtout dans le cas des bactéries Gram -, par l'emploi d'EDTA à la place du chloroforme (Tableau XI). Les résultats dans ce tableau expriment le pourcentage de lyse par rapport à la densité optique de départ, car l'EDTA seul provoque une lyse partielle de certaines bactéries : c'est le cas notamment pour P. aeruginosa et S. typhimurium et E. coli où l'addition d'enzyme provoque un éclaircissement pratiquement complet des suspensions. On obtient également de bons résultats avec cette méthode avec B. subtilis et surtout B. megatherium. Nous n'avons pas obtenu de lyse pour les deux staphylocoques, ce qui rejoint les observations faites au paragraphe 1 de ce chapître : le substrat doit être rendu inaccessible à l'action de l'enzyme par la présence d'une "barrière".

b) - Méthode par numération

L'ensemble des résultats précédents était basé sur la mesure de la densité optique. Cette D.O. ne correspond pas forcément à la réalité puisqu'il reste des débris cellulaires en suspension. Nous avons donc convenu de relier cette différence de densité optique au nombre de bactéries effectivement lysées par le lysozyme en effectuant des comptages des bactéries survivantes. Pour cela nous avons choisi deux bactéries : Escherichia coli et Bacillus mégatherium.

Toutes les opérations ont été effectuées stérilement ; les

BACTERIES	EDTA % de lyse	EDTA + lysozyme de blanc d'oeuf % lyse	EDTA + lysozyme de phage % lyse
B. cereus	2	2,7	1,5
B. megatherium	12,7	92,7	93,3
B. subtilis	10,0	48,3	53,1
E. coli	27,2	77,1	81,7
K. pneumoniae	11,2	14,7	13,5
P. aeruginosa	38,4	84,6	82,6
S. typhimurium	33,0	78,4	80,5
S. marcescens	14,4	15,8	16,1
S. flexneri	31,6	59,4	57,8
S. albus	5,0	6,3	5,9
S. aureus	3,1	3,1	3,1

TABLEAU XI

BUS LILLE

Lyse des bactéries par le lysozyme et l'EDTA.
Mode opératoire : 2,5 ml de suspension bactérienne dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,3 + 0,1 ml EDTA (10 mg/ml, dans du tampon phosphate pH 7,5) + 0,5 ml d'enzyme. Incubation à 37° C pendant 15 mn.

solutions enzymatiques, de même que l'EDTA, ont été passés sur filtres millipores stériles.

Pour les essais enzymatiques nous avons à chaque fois employé des cultures fraîches des deux bactéries cultivées sur Bouillon ordinaire.

Après l'incubation à 37° C pendant 15 mn, nous avons effectué des dilutions des essais et des témoins, puis 0,1 ml de chaque dilution est déposé au fond d'une boîte de Pétri et nous avons coulé dessus de la gélose ordinaire à 45° C. Cette technique permet de compter les survivants et d'en déduire par conséquent le pourcentage de lyse en tenant compte des différents témoins effectués simultanément.

Nous n'avons obtenu que peu de différences entre les deux enzymes (TableauxXII et XIII). Les quelques différences obtenues ne sont en fait pas vraiment significatives.

3. Conclusion

De cette étude nous pouvons dégager plusieurs points :

- dans l'ensemble, le lysozyme réagit mieux avec des cellules fraîchement récoltées, et surtout dans le cas des bactéries Gram négatif, son action se trouve considérablement augmentée lorsque celles-ci subissent un traitement préalable (chloroforme ou EDTA).

- les deux lysozymes n'ont apparemment aucune action directe sur Bacillus cereus et les souches de staphylocoques. Ceci est en accord avec les résultats de SALTON (86) qui les classe parmi les bactéries résistantes au lysozyme, même à des concentrations relativement élevées. Il est possible d'obtenir une lyse enzymatique de ces bactéries en associant le lysozyme à l'action

BACILLUS MEGATHERIUM

	Nombre de bactéries	Survivants %	Lyse %
TEMOIN CULTURE $D.O._{600} = 0,90$	$104.\ 10^5$		
Lysozyme de blanc d'oeuf (10 γ/ml)	$110.\ 10^4$	10,6	89,4
Lysozyme de phage (≃ 10 γ/ml)	$170.\ 10^3$	1,6	98,4
Lysozyme de blanc d'oeuf (1 γ/ml)	$41,5.\ 10^5$	39,9	60,1
Lysozyme de phage dilution 1/10	$370.\ 10^4$	35,6	64,4
Lysozyme de blanc d'oeuf (0,1 γ/ml)	$62.\ 10^5$	59,6	40,4
Lysozyme de phage dilution 1/100	$53.\ 10^5$	58,9	41,1
Lysozyme de blanc d'oeuf (0,01 γ/ml)	$90.\ 10^5$	86,5	13,5
Lysozyme de phage dilution 1/1000	$88.\ 10^5$	84,6	15,4

TABLEAU XII

BUS LILLE

Méthode par numération et dilutions enzymatiques

Mode opératoire : 2,5 ml de culture + 0,6 ml d'enzyme. Incubation à 37° C

ESCHERICHIA COLI

	Nombre de bactéries	Survivants %	Lyse %
TEMOIN CULTURE $D.O._{600} = 0,09$	$101.\ 10^5$		
Lysozyme de blanc d'oeuf (10 γ /ml)	$157.\ 10^3$	1,5	98,4
Lysozyme de phage (≃ 10 γ/ml)	$98.\ 10^3$	0,9	99,1
Lysozyme de blanc d'oeuf (1 γ/ml)	$40.\ 10^5$	39,6	60,4
Lysozyme de phage dilution 1/10	$222.\ 10^4$	21,9	78,1
Lysozyme de blanc d'oeuf (0,1 γ/ml)	$68.\ 10^5$	67,3	32,7
Lysozyme de phage dilution 1/100	$51.\ 10^5$	50,5	49,5
Lysozyme de blanc d'oeuf (0,01 γ/ml)	$96.\ 10^5$	95,1	4,9
Lysozyme de phage dilution 1/1000	$95.\ 10^5$	94,1	5,9

BUS LILLE

TABLEAU XIII

Méthode par numération et dilutions enzymatiques

Mode opératoire : 2,5 ml de culture + 0,1 ml d'EDTA (10 mg/ml)
+ 0,5 ml d'enzyme. Incubation à 37° C

préalable d'autres agents (acide trichloracétique, formamide, SDS...) ou à l'action d'antibiotiques (11) ; dans ces conditions le substrat du lysozyme présent dans les parois de ces bactéries est rendue accessible à l'enzyme.

Si le lysozyme ne lyse pas ces bactéries, nous espérions qu'il provoquerait néanmoins une perte plus ou moins totale de leur faculté à proliférer. Malheureusement ce ne fut pas le cas, car ces bactéries étalées sur boîtes de Pétri donnent pratiquement les mêmes résultats que le lot témoin réalisé en parallèle. Ces faits concordent avec les constatations réalisées dans le cas de conjonctivites aiguës à staphylocoques où l'emploi d'antibiotiques est nécessaire : le lysozyme apparaît alors être plus un élément de protection qu'un facteur antimicrobien de la résistance naturelle.

. quelles que soient les méthodes utilisées, les deux enzymes présentent de grandes similitudes. Toutefois ces similitudes sont discutables car nous avons toujours travaillé en équivalents-lysozyme de blanc d'oeuf.

TSUGITA et coll. (95) avaient montré que le lysozyme du phage T4 était 250 fois plus actif sur E. coli que le lysozyme de blanc d'oeuf. Il nous a été impossible de tester notre enzyme de la même manière puisque nous ne l'avons pas cristallisée.

Nous avons essayé de contourner la difficulté en effectuant des dilutions enzymatiques et en testant celles-ci sur des bactéries particulièrement sensibles : Bacillus megatherium et Escherichia coli (Tableaux XII et XIII). Notre hypothèse était de déterminer une différence de l'activité spécifique de ces deux enzymes. Tout en maintenant le temps comme facteur constant, cette différence d'activité, se manifestant sur la vitesse de réaction, devait entraîner un pourcentage de lyse différent lorsque les solutions enzymatiques sont diluées.

Le tableau XII indique les résultats obtenus avec Bacillus megatherium. Nous constatons que pour une concentration de 10 γ /ml de lysozyme, il existe une différence de 9 % en faveur du lysozyme de phage. Toutefois cette différence disparaît lorsqu'on dilue l'enzyme et pour une concentration correspondant à 0,1 γ /ml (dilution : 1/100), le pourcentage de lyse est identique dans les deux cas. Il n'y aurait donc pas de spécificité différente.

Comparativement nous avons testé ces mêmes dilutions avec Escherichia coli, en partant de la même densité de population initiale (Tableau XIII). Nous nous apercevons qu'à la même concentration de départ (10 γ /ml) le pourcentage de lyse est ici identique. Par contre nous voyons apparaître une différence de l'ordre de 17 % lorsque les deux enzymes sont diluées. Cette différence est d'ailleurs maintenue d'une dilution à l'autre (1/10 à 1/100) et toujours en faveur du lysozyme de phage. Par rapport au Bacillus megatherium, il y aurait ici une différence dans l'activité spécifique déterminant que le lysozyme de phage T6 est 1,3 à 1,5 fois plus actif, sur Escherichia coli, que le lysozyme de blanc d'oeuf, quand les deux enzymes sont diluées dans le même rapport.

Si notre enzyme apparaît plus active que le lysozyme de blanc d'oeuf vis à vis d'un substrat bien déterminé, l'écart entre les deux n'est malgré tout, pas aussi important que celui obtenu pour le phage T4 et nous pouvons finalement conclure que les deux enzymes testées ont une activité sensiblement égale. Testées sur deux bactéries à gram différent, pour la même dilution, nous ne constatons pas de différence beaucoup plus importante pour l'une que pour l'autre.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude nous a permis de mettre au point une technique de préparation de lysozyme de phage pouvant être utilisée industriellement. Nous avons abouti à un certain nombre de conclusions :

. Nos lysats phagiques contiennent du lysozyme dont la majeure partie est sous forme soluble dans le milieu.

. La quantité de lysozyme de phage a pu être améliorée grace à un choix attentif du milieu de culture, du moment de l'inoculation, du rapport d'infection et à des modifications portant sur la nature de la source carbonée.

. En utilisant une souche d'Escherichia coli K10 inductible en présence de lactose, nous avons pu suivre de façon simple et rapide la lyse bactérienne par dosage de la β-galactosidase. Cette enzyme dont l'activité est actuellement recherchée, particulièrement dans l'industrie fromagère (hydrolyse du lactose contenu dans le lactosérum), est perdue pendant la purification du lysozyme quand on utilise du Rivanol pour éliminer le DNA. Lorsqu'on utilise d'autres substances pour éliminer la viscosité du lysat provoquée par la présence du DNA bactérien, il est possible de récupérer la totalité de la β-galactosidase à la sortie de la première colonne.

. Nous avons montré que les cultures en masse pour préparer du lysozyme étaient possibles sur lactosérum et pouvaient permettre la préparation d'autres enzymes (β-galactosidase...).

. Nous avons pu aboutir à une purification partielle du lysozyme du phage T6. L'étude de l'activité biologique de cette enzyme a présenté de nombreuses similitudes avec le lysozyme de blanc d'oeuf, ne nous permettant pas d'aboutir aux mêmes conclusions que TSUGITA. En effet le lysozyme du phage T6 ne montre pas une activité beaucoup plus importante sur Escherichia coli que sur un bacille à Gram positif.

. Etant donné la faible spécificité d'action du lysozyme du T6, sa préparation industrielle ne paraît pas intéressante, malgré l'utilisation du lactosérum comme milieu de culture, son prix de revient est infiniment plus élevé que celui du lysozyme de blanc d'oeuf.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ANDERSON T. F.
On a bacteriolytic substance associated with a purified bacterial virus
J. Cellular Comp. Physiol. (1945) 25, 1-15

2 - ANDERSON T. F.
The role of tryptophane in the adsorption of two bacterial viruses on their host Escherichia coli
J. Cellular Comp. Physiol.(1945) 25, 17-26

3 - ANDERSON T. F.
The activation of bacterial virus T4 by L-tryptophan
J. Bacteriol (1948) 55, 637-649

4 - ANDERSON T. F.
The inheritance of requirements for adsorption cofactors in bacterial virus T4
J. Bacteriol. (1948) 55, 651-658

5 - ARRAJ A. J. and CAMPBELL J. H.
Isolation and characterization of the newly evolved ebg β-galactosidase of Escherichia coli K 12
J. Bacteriol. (1975) 124, 849-856

6 - BAIL O. and MATSUMOTO T.
Die anhänfungsmöglichkeit von bakteriophagen und bakterien
Med. Klin. (Munich) (1923) 19, 1579-1581

7 - BARRINGTON L. F. and KOZLOFF L. M.
Action of T2 r+ bacteriophage on host-cell membranes
Science (1954) 120, 110-111)

8 - BARRINGTON L. F. and KOZLOFF L. M.
Action of bacteriophage on isolated host-cell walls
J. Biol. Chem. (1956) 223, 615-627

9 - BARNER H. D. and COHEN S.S.
Virus-induced acquisition of metabolic function. IV. Thymidylate synthetase in thymine requiring Escherichia coli infected by T2 and T4 bacteriophages
J. Biol. Chem. (1959) 234, 2987-2991

10 - BEIJERINCK M. W.
Über ein contagium vivum fluidum als ursache der fleckenkrankheit der Tabaksblätter
Zent. Bakteriol. Parasitenk. (II),(1899) 5, 27-33

11 - BELIZHENKO G. G., ERMOL'EVA Z. V., VED'MINA E. A., YASHCHENKO V. K. and EFIMTSEVA E. P.
En russe : Etude de l'action simultanée du lysozyme et des antibiotiques : tétracycline, érythromycine et lévomycétine sur Staphylococcus aureus
Antibiotiki, SSSR. (1975) 20, 354-356

12 - BENZER S.
Induced synthesis of enzymes in bacteria analysed at the cellular level
Biochim. Biophys. Acta (1953) 11, 383

13 - BLAKE C. C. F., KOENIG D. F., MAIR G. A., NORTH A. C. T., PHILLIPS D. C. and SARMA V. R.
Structure of Hen egg-white lysozyme. A three dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution
Nature (1965) 206, 757-761

14 - BRADLEY D. E.
Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins
Bacteriol. Rev. (1967) 31, 230-314

15 - BRENNER S., STREISINGER G., HORNE R. W., CHAMPE S. P., BARNETT L., BENZER S. and REES M. W.
Structural components of bacteriophage
J. Mol. Biol. (1959) 1, 281-292

16 - BRISOU J.
Techniques d'enzymologie bactérienne
Masson éditeur. 1971, 6

17 - BROWN A.
A study of lysis in bacteriophage-infected Eschirichia coli
J. Bacteriol. (1956) 71, 482-490

18 - BROWN J. R.
Disulphide bridges of lysozyme
Biochem. J. (1964) 92, 13 P

19 - BURNET F. M.
The Bacteriophages
Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. (1934) 9, 332

20 - CALOTHY G., DIGEON M. and RAYNAUD M.
Concentration des virus par le polyéthylène-glycol
C. R. Acad. Sci. (1967) 265, 1764-1765

21 - CANFIELD R. E.
Peptides derived from tryptic digestion of egg-white lysozyme
J. Biol. Chem. (1963) 238, 2691-2697

22 - CANFIELD R. E. and LIU A. K.
The disulfide bonds of egg-white lysozyme (Muramidase)
J. Biol. Chem. (1965) 240, 1997-2002

23 - COHEN S. S.
Synthesis of bacterial viruses. III. The origin of phosphorus found in desoxyribonucleic acids of T2 and T4 bacteriophages
J. Biol. Chem. (1948) 174, 295-303

24 - COLOBERT L.
Gonflement de la paroi externe des salmonelles par l'effet du lysozyme
C. R. Soc. Biol. (1957) 151, 1553-1555

25 - DELBRÜCK M.
The growth of bacteriophage and lysis of the host
J. Gen. Physiol. (1940) 23, 643-660

26 - DOERMANN A. H.
Lysis and lysis inhibition with Escherichia coli bacteriophage
J. Bacteriol. (1948) 55, 257-276

27 - EMRICH J. and STREISINGER G.
The role of phage lysozyme in the life cycle of phage T4
Virology (1968) 36, 387-391

28 - FLAKS J. G. and COHEN S. S.
Virus-induced acquisition of metabolic function. I.
Enzymatic formation of 5 - hydroxymethyldeoxycytidylate
J. Biol. Chem. (1959) 234, 1501-1506

29 - FLAKS J. G., LICHTENSTEIN J. and COHEN S. S.
Virus-induced acquisition of metabolic function. II.
Studies of the origin of the deoxycytidylate hydroxymethylase of bacteriophage infected E. coli
J. Biol. Chem. (1959) 234, 1507-1511

30 - FLAKS J. G. and COHEN S. S.
Virus-induced acquisition of metabolic function. III.
Formation and some properties of thymidylate synthetase of bacteriophage - infected Escherichia coli
J. Biol. Chem. (1959) 234, 2981-2986

31 - FLEMING A.
On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions
Proc. Roy. Soc. London, Ser. B. (1922) 93, 306-317

32 - FROMAGEOT C. et JOLLES P.
Etude comparée de quelques protéines lysantes appartenant à la famille des lysozymes
Experientia (1955), suppl. II, 181

33 - GHUYSEN J-M.
Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism.
Bacteriol. Rev. (1968) 32, 425-464

34 - GHUYSEN J-M., BRICAS E., LACHE M. and LEYH-BOUILLE M.
Structure of the cell walls of Micrococcus lysodeikticus. III. Isolation of a new peptide dimer, N^{α} - [L-Alanyl- γ - (α-D-glutamyl-glycine)] -L-lysyl-D-alanyl-N^{α} - [L-alanyl- γ - (α-D-glutamyl-glycine)] -L-lysyl-D-alanine
Biochemistry (1968) 7, 1450-1460

35 - GHUYSEN J-M., STROMINGER J. L. and TIPPER D. J.
Bacterial cell walls
Comp. Biochem. (1968) 26A, 53-104

36 - d'HERELLE F.
Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques
C. R. Acad. Sci. Paris (1917) 165, 373-375

37 - d'HERELLE F.
Le bactériophage. Son rôle dans l'immunité
Masson éditeur. Paris (1921)

38 - d'HERELLE F.
Le bactériophage et son comportement
Masson éditeur. Paris (1926)

39 - HERSHEY A. D. and CHASE M.
Independant functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage
J. Gen. Physiol. (1952) 36, 39-56

40 - HESTRIN S., FEINGOLD D. S. and SCHRAMM M.
Hexosides hydrolases
III - β-Galactosidase (Lactase) from Escherichia coli
Methods in Enzymology (1955), I, 241-248

41 - IMADA S. and TSUGITA A.
Morphogenesis of the tail fiber of bacteriophage T4 : isolation and characterization of a component (the genes 35-36-37-38 directing half fiber)
Mol. Gen. Gen. (1970) 109, 338-355

42 - IMOTO T. and YAGISHITA K.
A simple activity measurement of lysozyme
Agr. Biol. Chem.(1971) 35, 1154-1156

43 - JACOB F., FUERST C. et WOLLMAN E. L.
Recherches sur les bactéries lysogènes défectives
II. Les types physiologiques liés aux mutations du prophage
Ann. Inst. Pasteur (1957) 93, 724-753

44 - JACOB F. and FUERST C. R.
The mechanism of lysis studied with defective lysogenic bacteria
J. Gen. Microbiol. (1958) 18, 518-526

45 - JESAITIS M. A. and GEOBEL W. F.
The chemical and antiviral properties of the somatic antigen of phase II Shigella sonnei
J. Exptl. Med. (1952) 96, 409-424

46 - JOLLES J. et JOLLES P.
Structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule : la formule développée
C. R. Acad. Sci. (1961) 253, 2773-2775

47 - JOLLES P., SAMOUR D. et LEDERER E.
Analytical studies on wax D, a macromolecular peptido-glycolipid fraction from human strains of Mycobacterium tuberculosis. In : Perspectives in the biochemistry of large molecules
Arch. Biochem. Biophys. (1962), suppl. 1, 283-289

48 - JOLLES J., JAUREGUI-ADELL J., BERNIER I. et JOLLES P.
La structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule : étude détaillée
Biochim. Biophys. Acta (1963) 78, 668-689

49 - JOLLES P.
Recent developments in the study of lysozymes
Angew. Chem. (1964) 3, 28-36

50 - JOLLES P., JAUREGUI-ADELL J. et JOLLES J.
Le lysozyme de blanc d'oeuf de poule : disposition des ponts disulfures
C. R. Acad. Sci. (1964) 258, 3926-3928

51 - JOSSLIN R.
The lysis mechanism of phage T4 : mutants affecting lysis
Virology (1970) 40, 719-726

52 - KAISER A. D. and HOGNESS D. S.
The transformation of E. coli with desoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage λ dg
J. Mol. Biol. (1960) 2, 392-415

53 - KECK K., MAHLER H. R. and FRASER D.
Synthesis of deoxycytidine -5'- phosphate deaminase in Escherichia coli after infection by T2 bacteriophage
Arch. Biochem. Biophys. (1960) 86, 85-88

54 - KELLENBERGER E. and SECHAUD J.
Electron microscopical studies of phage multiplication. II. Production of phage related structures during multiplication of phages T2 and T4
Virology (1957) 3, 256-274

55 - KOCH G. and WEIDEL W.
Abspaltung chemicher komponenten der coli-membran durch daran absorbierte phagen. I. Mitt : allgemeine charakterisierung des effekts und partial analyse einer der abgespaltenen komponenten
Z. Naturforsch. (1956) 11b, 345-353

56 - KOCH G. and JORDAN E. M.
Killing of Escherichia coli B by phage-free T2 lysates
Biochim. Biophys. Acta (1957) 25, 437

57 - KOCH G. and DREYER W. J.
Characterization of an enzyme of phage T2 as a lysozyme
Virology (1958) 6, 291-293

58 - KOERNER J. F., SMITH M. S. and BUCHANAN J. M.
A deoxycytidine triphosphate splitting enzyme and the synthesis of the deoxyribonucleic acid of T2 bacteriophage
J. Am. Chem. Soc. (1959) 81, 2594-2595

59 - KORNBERG A., ZIMMERMAN S. B., KORNBERG S. R. and JOSSE J.
Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VI. Influence of bacteriophage T2 on the synthetic pathway in host cells
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1959) 45, 772-785

60 - KORNBERG A.
Biological synthesis of deoxyribonucleic acid.
Science (1960) 131, 1503-1508

61 - KRUEGER A. P. and NORTHROP J. H.
The kinetics of the bacterium-bacteriophage reaction
J. Gen. Physiol. (1931) 14, 223

62 - KUNKEE R. E. and PARDEE A. B.
Studies of the role of deoxyribonuclease in T2 bacteriophage development
Biochim. Biophys. Acta (1956) 19, 236-246

63 - LEHMAN I. R. and HERRIOTT R. M.
The protein coats or "ghosts" of coliphage T2. III. Metabolic studies of Escherichia coli B infected with T2 bacteriophage "ghosts"
J. Gen. Physiol. (1958) 41, 1067-1082

64 - LEHMAN I. R. and PRATT E. A.
On the structure of glucosylated hydroxymethylcytosine nucleotides of coliphages T2, T4 and T6
J. Biol. Chem. (1960) 235, 3254-3259

65 - MARK K. K.
A lysozyme assay method for low activity
Analyt. Biochem. (1970) 37, 447-470

66 - MARK K. K.
The relationship between the synthesis of DNA and the synthesis of phage lysozyme in Escherichia coli infected by bacteriophage T4
Virology (1970) 42, 20-27

67 - MEULI H.
Studien zum bakteriophagen-problem. II. Die konzentration des lytischen prinzips und ihre beziehungen zum ablauf der bakteriophagenreaktion
Z. Hyg. Infektiokrankh. (1923) 99, 46-66

68 - MEYER K., PALMER J. W., THOMPSON R. and KHORAZO D.
On the mechanism of lysozyme action
J. Biol. Chem. (1936) 113, 479-486

69 - MEYER K. and HAHNEL E.
The estimation of lysozyme by a viscosimetric method
J. Biol. Chem. (1946) 163, 723-732

70 - NORTHROP J. H.
Increase in bacteriophage and gelatinase concentration in cultures of Bacillus megatherium
J. Gen. Physiol. (1939) 23, 59-79

71 - PARDEE A. B.
Enzyme activity and bacteriophage infection. I. Breakdown of adenosine triphosphate
J. Gen. Physiol. (1951) 34, 619-626

72 - PARDEE A. B. and KUNKEE R. E.
Enzymatic activity and bacteriophage infection. II. Activities before and after virus infection
J. Biol. Chem. (1952) 199, 9-24

73 - PARDEE A. B. and WILLIAMS I.
The increase in desoxyribonuclease of virus-infected E. coli
Arch. Biochem. (1952) 40, 222-223

74 - PIRIE A.
Chemical change occuring during lysis of Bact. coli by bacteriophage
Brit. J. Exptl. Pathol. (1939) 20, 99-108

75 - PRIMOSIGH J., PELZER H., MAAS D. and WEIDEL W.
Chemical characterization of mucopeptides released from the Escherichia coli B cell wall by enzymic action
Biochim. Biophys. Acta (1961) 46, 68-80

76 - PUCK T. T.
The first steps of virus invasion
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1953) 18, 149-154

77 - PUCK T. T. and LEE H.
Mechanism of cell wall penetration by viruses. I. An increase in host cell permeability induced by bacteriophage infection
J. Exp. Med. (1954) 99, 481-494

78 - PUCK T. T. and LEE H.
Mechanism of cell wall penetration by viruses. II. Demonstration of cyclic permeability change accompanying virus infection of Escherichia coli B. cells
J. Exp. Med. (1955) 101, 151-175

79 - REPASKE R.
Lysis of Gram-negative bacteria by lysozyme
Biochim. Biophys. Acta (1956) 22, 189-191

80 - ROGERS H. J. and PERKINS M. R.
"Cells Walls and membranes"
E. F. and N. Spon. Ltd. London. 1968

81 - SALTON M. R. J.
Cell wall of Micrococcus lysodeikticus as the substrate of lysozyme
Nature (1952) 170, 746-747

82 - SALTON M. R. J.
Studies on the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some gram-positive and gram-negative bacteria
Biochim. Biophys. Acta (1953) 10, 512-523

83 - SALTON M. R. J.
Studies of the bacterial cell wall. V. The action of lysozyme on cell walls of some lysozyme sensitive bacteria
Biochim. Biophys. Acta (1956) 22, 495-506

84 - SALTON M. R. J.
Microbiol. Cell Walls
John Wiley and Sons Inc., New-York, 1960

85 - SALTON M. R. J.
"The Bacterial Cell Wall"
Elsevier Publishing Co, Amsterdam, 1964

86 - SALTON M. R. J.
Action of lysozyme on Gram-positive bacteria and the structure of cell walls
Exposés Annuels de Biochimie Médicale (1966) 27, 35-43

87 - SCHLEIFER K. H. and KANDLER O.
Micrococcus lysodeikticus : a new type of cross-linkage of the murein (cell wall penta peptides, centrifugation, chromatography)
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1967) 28, 965-972

88 - SEKIGUCHI M. and COHEN S. S.
The synthesis of messenger RNA without protein synthesis. II. Synthesis of phage-induced RNA and sequential enzyme production
J. Mol. Biol. (1964) 8, 638-659

89 - SERTIC V.
Origine de la lysine d'une race de bactériophage
C. R. Soc. Biol. (1929) 100, 477-479

90 - SHER I. H. and MALETTE M. F.
The adaptative nature of the formation of lysine decarboxylase in Escherichia coli B
Arch. Biochem. Biophys. (1954) 52, 331-339

91 - SIMON L. D. and ANDERSON T. F.
The infection of Escherichia coli by T2 and T4 bacteriophages as seen in the electron microscope. I. Attachment and penetration
Virology (1967) 32, 279-297

92 - SOMERVILLE R., EBISUZAKI K. and GREENBERG G. R.
Hydroxymethyldeoxycytidylate kinase formation after bacteriophage infection of Escherichia coli
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1959) 45, 1240-1245

93 - SPIZIZEN J.
Infection of protoplasts by disrupted T2 virus
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1957) 43, 694-701

94 - TABEKE I.
Extent of cross linkage in the murein sacculus of Escherichia coli B cell wall
Biochim. Biophys. Acta (1965) 101, 124-126

95 - TSUGITA A., INOUYE M., TERZAGHI E. and STREISINGER G.
Purification of bacteriophage T4 lysozyme
J. Biol. Chem. (1968) 243, 391-397

96 - TWORT F. W.
An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses
Lancet (1915) 2, 1241-1243

97 - VENDRELY R., PALMADE C. and VENDRELY C.
A new method for the extraction of deoxyribonucleic acid from bacteria
Nature (1956) 178, 1044-1046

98 - VISCONTI N.
Resistance to lysis from without in bacteria infected with T2 bacteriophage
J. Bacteriol. (1953) 66, 247-253

99 - WEIDEL W.
Über die zellmembran von Escherichia coli B. I. Preparierung der Membran ; analytische daten, morphologie, verhalten der membran gegenüber den bakteriophagen der T-Serie
Z. Naturforsch. (1951) 6b, 251

100 - WEIDEL W. and PRIMOSIGH J.
Die grameinsame Wurzel der lyse von Escherichia coli durch penicillin oder durch phagen
Z. Naturforsch. (1957) 12b, 421-427

101 - WEIDEL W.
Bacterial viruses (with particular reference to adsorption/penetration)
Ann. Rev. Microbiol. (1958) 12, 27-48

102 - WEIDEL W. and KATZ W.
Reindarstellung und characterisierung des für die lyse T2 - infizierte zellen verantwortlichen enzymes
Z. Naturforsch. (1961) 16b, 156-162

103 - WILLIAMS R. C.
The shapes and sizes of purified viruses as determined by electron microscopy
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1953) 18, 185-196

104 - WILLIAMS R. C. and FRASER D.
Morphology of the seven T-bacteriophages
J. Bacteriol. (1953) 66, 458-464

105 - WILLIAMS R. C. and FRASER D.
Structural and functional differentiation in T2 bacteriophage
Virology (1956) 2, 289-307

106 - WOLLMAN E. and WOLLMAN E.
Bactériophage et lyse secondaire
C. R. Soc. Biol. (1933) 112, 164-165

107 - YAMAMOTO K. R., ALBERTS B. M., BENZINGER R., LAWHORNE L. and TREIBER G.
Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification
Virology (1970) 40, 734-744

108 - YAMASAKI N., TSUJITA T. and TAKAKUWA M.
A simple colorimetric method for the determination of lysozyme activity
Agr. Biol. Chem. (1973) 37, 1507-1508

109 - ZINDER N. D. and ARNDT W. F.
Production of protoplasts of Escherichia coli by lysozyme treatment
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1956) 42, 586-590

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE