

50376
1980
15

50376
1980
15

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Mention Microbiologie

par

Mohamed Tahar BEN BRAHIM

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES BACTERIOPHAGES DE RHIZOBIUM MELILOTI



Soutenue le 24 avril 1980, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury	MM. J. GUILLAUME	Président
	R. TAILLIEZ	Rapporteur
	J.C. DERIEUX	
	J. KREMBEL	Examineurs

Ce travail a été réalisé dans les Laboratoires de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur J. GILLAUME. Nous avons pu, au cours de ce travail, apprécier ses conseils judicieux et ses encouragements. Nous tenons à lui exprimer notre gratitude et le prions d'accepter l'expression de notre profond respect.

Nous remercions Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ d'avoir bien voulu être le rapporteur de ce travail, et Messieurs les Professeurs J.C. DERIEUX et J. KREMBEL d'avoir accepté de le juger.

Nous exprimons également notre gratitude à Messieurs M. WERQUIN et C. DEFIVES, qui nous ont apporté leur aide, leur sympathie et leurs précieux conseils.

Nos vifs remerciements vont aussi à tout le personnel des Laboratoires de Microbiologie, ainsi qu'à Madame Martine BONNIER, auprès desquels nous avons toujours trouvé l'aide nécessaire à la réalisation de ce travail.

Table des Matières

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

A - AVANT-PROPOS.....	1
B - HISTORIQUE.....	4
C - RECHERCHES PERSONNELLES.....	7

CHAPITRE I - OBTENTION DES PHAGES.....

A - MATERIEL ET METHODES.....	9
I - Souches bactériennes.....	9
II - Milieux.....	10
III - Isolement des phages.....	11
1) Recherche dans la terre.....	11
2) Recherche et traitement des souches lysogènes....	12
a) Action du rayonnement U.V.	12
b) Action de la mitomycine C	13
IV - Multiplication des bactériophages	14
1) Multiplication en milieu solide.....	17
2) Multiplication en milieu liquide.....	17
3) Dénombrements.....	18
B - RESULTATS ET COMMENTAIRES.....	19

CHAPITRE II - ÉTUDE DES BACTÉRIOPHAGES CAPABLES DANS NOS CONDITIONS

EXPÉRIMENTALES DE LYSER R. MELILOTI EN L'ABSENCE DE Ca^{2+} ET Mg^{2+} 22

CHAPITRE III - ÉTUDE DES PARAMÈTRES POUVANT INFLUER SUR LA LYSE

BACTÉRIENNE EN MILIEU LIQUIDE..... 27

A - MATERIEL ET METHODES..... 27

I - Détermination de la lyse par mesure de la densité
optique..... 27

II - Procédés de culture..... 28

III - Milieux de culture..... 28

B - RESULTATS ET COMMENTAIRES..... 29

I - Rôle de la source de carbone..... 29

II - Evaluation du nombre de phages à utiliser par
bactérie..... 30

III - Rôle de l'agitation 35

IV - Détermination des concentrations optimales de
 Ca^{2+} et Mg^{2+} 36

V - Lyse en milieu minimum 38

VI - Applications..... 42

CHAPITRE IV - ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DES BACTÉRIOPHAGES CAPABLES DE LYSER

RHIZOBIUM MELILOTI EN MILIEU LIQUIDE..... 56

A - MATERIEL ET METHODES.....	56
I - Concentration des phages.....	56
1) Préparation d'un stock de phages.....	56
2) Techniques de centrifugations.....	57
II - Indice de réfraction.....	57
III - La coloration négative.....	58
1) Produits.....	58
2) Techniques du contraste négatif.....	59
B - RESULTATS ET COMMENTAIRES.....	60
I - Densité relative des phages $\phi 4$ et $\phi 6$	60
II - Observation des bactériophages L.L.....	62

CHAPITRE V - ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ D'HÔTES DES PHAGES DE

<u>RHIZOBIUM MELILOTI</u>	64
---------------------------------	----

A - MATERIEL ET METHODES.....	65
I - Préparation des stocks de phages.....	65
II - Conservations des stocks de phages.....	65
III - Recherche de la spécificité d'hôtes.....	65
IV - Détermination du coefficient d'efficacité d'étalement.....	66
B - RESULTATS ET COMMENTAIRES	67
I - Conservation des stocks en milieu glycérolé.....	67
II - Détermination de la spécificité d'hôtes des phages de <u>Rhizobium meliloti</u>	69

<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	73
---------------------------------------	----

Introduction

I - AVANT-PROPOS

La fixation de l'azote de l'air et sa transformation en matière organique, qui sont le fait de quelques micro-organismes bien particuliers, conditionnent la productivité biologique de la plupart des zones fertiles du globe.

Cette fixation s'effectue dans la nature non seulement grâce à des bactéries libres des genres Klebsiella, Azotobacter et Clostridium, mais également, et pour la majeure partie, par les bactéries du genre Rhizobium ; qui entrent en symbiose avec les légumineuses (1 à 4). Au cours de cette association, la plante reçoit de la bactérie une source d'azote directement assimilable sous forme d'ion ammonium. Dans le cas contraire, il faut employer des engrais azotés sans forme de nitrates. Or, lorsque l'on connaît leur prix de revient sans cesse croissant, on comprend pourquoi depuis une dizaine d'années, de nombreux laboratoires de par le monde étudient les moyens d'améliorer l'efficacité du phénomène de symbiose par des actions sur le Rhizobium et le couple plante-bactérie.

Pour ce faire, la connaissance approfondie de tout ce qui peut modifier de près ou de loin la fixation d'azote est nécessaire.

Ainsi, pour transformer les espèces bactériennes, les manipulations génétiques offrent des espoirs immenses. Trois moyens les permettent : la conjugaison, la transformation et la transduction.

La conjugaison consiste dans le passage d'une partie du génome d'une bactérie donatrice (mâle) vers une bactérie réceptrice (femelle) (5 à 9).

La transformation correspond à la pénétration dans une bactérie d'un fragment de DNA isolée (10 à 12).

Enfin, lors du processus de transduction, l'information génétique est transférée grâce à un bactériophage. La bactérie peut alors traduire les informations apportées par le phage (13 à 18).

Au sein des Laboratoires de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, une équipe de chercheurs s'intéresse plus particulièrement aux phages de l'espèce Rhizobium. Cette étude est intéressante à deux titres essentiels.

Sur le plan agricole, la sélection dans le sol des souches bactériennes efficaces pour la fixation d'azote présente l'importance que nous avons déjà évoquée. La rhizosphère est riche en micro-organismes. Elle contient entre autres des souches différentes de Rhizobium tant du point de vue qualitatif que quantitatif. Une telle cohabitation implique nécessairement une compétition entre les souches présentes. Les bactériophages de Rhizobium interviennent vraisemblablement dans ce processus. Ils seraient alors des instruments intéressants pour étudier cette compétitivité dont on ne connaît pas l'influence sur l'efficacité ou l'inefficacité de la symbiose ainsi mise en place.

Sur le plan fondamental, il est bien entendu utile de décrire la morphologie et les propriétés physiques, chimiques et immunologiques des rhizobiophages afin de les classer et les comparer aux bactériophages spécifiques d'autres espèces bactériennes. Cette première étape, complétée par une approche physiologique de l'action du virus sur son hôte, nous amène à leur intérêt en biologie moléculaire.

D'une part, ces phages peuvent être transducteurs. Ils permettent donc d'enrichir le génome. On voit l'intérêt que présente le fait de pouvoir

apporter à une bactérie le caractère d'efficiencce dans la fixation de l'azote.

D'autre part, les phénomènes de spécificité d'hôte, donnant en quelque sorte le spectre bactérien du virus, que l'on trouve chez les rhizobactériophages, ouvrent de larges perspectives de recherches. Ils peuvent en effet aussi bien permettre d'orienter l'expérimentation sur les récepteurs des enveloppes de Rhizobium que sur l'existence de lysogénie ou de systèmes de restriction-modification chez cette bactérie.

II - HISTORIQUE

Dès 1908, LOEW et ASO (19) publient un article dans lequel ils établissent qu'une culture de Bacillus radicolica (Rhizobium), capable d'induire la formation de nodules sur les racines d'une légumineuse, contient une enzyme bactériolytique, en particulier lorsqu'il est cultivé en présence d'extrait de feuilles de pois. Ils purent en effet observer une clarification complète de la culture de Rhizobium en six semaines à 25° C. Ils démontrent en outre qu'à l'intérieur du nodule, les bactéries se lysent progressivement ; cette disparition est attribuée à cette époque à l'accumulation d'enzymes proléolytiques.

C'est à deux chercheurs, l'anglais F.W. TWORT en 1915 d'une part, et le français F. D'HERELLE en 1917 d'autre part (20), que revient la découverte du "principe lytique" qui, plus tard, fut reconnu comme étant un bactériophage.

Entre les années 1920 et 1940, un nombre important de recherches furent entreprises pour utiliser le bactériophage à des fins thérapeutiques, mais sans beaucoup de succès (21).

En 1923, GERRETSEN, GALLINS, SACH et SCHÜGEN (22) isolèrent le principe lytique de Rhizobium des nodules des racines de Trifolium, de Lupinus et de Serradella. Ils observèrent également une inhibition marquée de la culture de Rhizobium sur milieu gélosé en boîte de PÉTRI.

En 1927, GRIJNS (23) confirme les expériences précédentes et réussit à obtenir des plages de lyse en utilisant un milieu gélosé à base de viande.

En 1929, ISRAILSKY (24) isole le principe lytique dans des nodules jeunes et bien développés de Trifolium, sans y parvenir à partir des vieux nodules.

De même, HITCHNER (25) en 1930 isole le principe actif à partir de nodules de Trifolium pratense mais, même en utilisant les techniques décrites par BURNET (26) et KOSER (27), ne parvint pas à obtenir des plages de lyse.

En 1932, LAIRD (28) démontre qu'il n'est possible de conclure à la présence d'un bactériophage que lorsque l'on est capable de le reproduire indéfiniment sur sa bactérie hôte.

Après la seconde guerre mondiale en 1945, J. KLECKZKOWSKA (29) étudie la production et le dénombrement des bactériophages de Rhizobium pisum sur cultures de bactéries isolées de nodules. Cet auteur parvient à standardiser une technique de comparaison des plages de lyse avec celles obtenues à partir de plusieurs stocks de phages. Le même auteur tente d'expliquer l'apparition de la résistance au phage chez Rhizobium pisum.

Ce n'est qu'en 1959 que l'observation des virus du règne animal, végétal et microbien est devenue possible après la découverte de la microscopie électronique et grâce aux techniques de coloration négative.

En 1960, D.E. BRADLEY (30) décrit la structure fine de vingt deux phages de provenances diverses. En 1961, TAKANASHI et C. QUADLING décrivent la lysogénie chez Rhizobium trifolii (31)

En 1965, E.A. SCHINGHAMER (32) met en évidence la modification contrôlée par l'hôte du phage chez Rhizobium leguminosarum et trifolii après une restriction additionnelle.

KOWALSKI (33) isole, en 1966, vingt quatre phages tempérés de Rhizobium meliloti dont un, le phage L5, possède une activité transductrice (13). Cette découverte augmente les possibilités d'études génétiques jusqu'ici accomplies surtout à l'aide de systèmes de transformation (BALASSA, 1963, (34) ; ELLIS et coll, 1962, (35) ; ZELAZNA, 1963, (36), 1964 (37) et GABOR, 1965, (38) et de conjugaison (39, 40, 41).

BARNET Y.M. et J.M. VINCENT (42), en 1970, obtiennent la conversion lysogénique chez Rhizobium trifolii. En 1972, BARNET Y.M. (43) entreprend des expériences pour provoquer la contraction de la protéine phagique de la queue et déterminer son rôle dans la spécificité d'hôte et dans le transfert du matériel génétique.

En 1967, KOWALSKI (13) décrit un système de transduction chez Rhizobium meliloti qui permet en 1972 à KOWALSKI et DENARIE (44) de rendre efficiente une souche rendue inefficente par mutation.

VERVLET G. et coll. (45), en 1975, ont caractérisé des phages tempérés défectifs d'Agrobacterium, espèce proche de Rhizobium.

PATEL J.J. (46) utilise, en 1976, le typage phagique dans le but de classer Rhizobium lotus.

Plus récemment, SWAB et coll. (18), en 1978, ont mis en évidence la transduction spécifique du marqueur cystéine chez Rhizobium meliloti.

Enfin, DALLMANN G. et coll. (47) ont étudié la carte génétique du phage 16-3 de Rhizobium meliloti à l'aide d'enzymes de restriction.

III - RECHERCHES PERSONNELLES

L'ensemble des chercheurs du Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, travaille sur R. meliloti dans différents domaines : génétique, biochimie, taxonomique, relation bactérie-végétal.

Au sein de cette équipe, un groupe s'intéresse aux phages de R. meliloti dans le but de connaître leurs propriétés générales afin de les utiliser pour effectuer les transferts génétiques, pour lyser les bactéries comme méthodologie en enzymologie, et de déterminer leur importance dans les phénomènes de compétition entre souches bactériennes dans le sol.

Nous nous sommes intégrés à ce groupe qui avait isolé un certain nombre de phages. Ceux-ci ont pu être classés en groupes homogènes renfermant des clones bien différenciés grâce à leur observation en microscopie électronique et leur étude sérologique. Par contre, d'autres rhizobactériophages n'avaient pas pu être étudiés du fait de leur fragilité. Ils se sont révélés posséder des propriétés antigéniques différentes des précédents mais ils sont également plus lytiques vis-à-vis de R. meliloti car capables de le lyser facilement en milieu liquide.

Le but de notre travail a été d'étudier les phages de ce second groupe. Après l'amélioration d'une technique d'obtention des bactériophages, nous nous sommes intéressés à l'étude des paramètres physicochimiques de l'infection (conditions de culture et composants du milieu) afin d'expliquer le comportement de l'ensemble des phages vis-à-vis des R. meliloti de notre collection.

Dans un second temps, en affinant les techniques d'obtention, nous avons effectué des observations au microscope électronique pour caractériser les phages de ce groupe.

Enfin, nous avons abordé l'étude de la spécificité d'hôte pour préciser certaines particularités de la relation virus - bactérie hôte.

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé des techniques variées. Ainsi chaque chapitre de ce mémoire comportera un paragraphe "Matériel et Méthodes".

Chapitre I

OBTENTION DES PHAGES

Les bactériophages sont très répandus dans la nature. Ils peuvent être présents dans la terre, dans l'eau, etc... mais également, ils peuvent exister sous forme de prophage dans les bactéries lysogènes.

Les méthodes les plus pratiques pour obtenir des bactériophages de R. meliloti sont :

- 1° - de rechercher dans la terre les phages virulents, ou,
- 2° - de soumettre des Rhizobium à des agents mutagènes.

Nous avons utilisé les deux méthodes.

A - MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - SOUCHES BACTÉRIENNES

Nous avons utilisé les souches suivantes de notre collection de R. meliloti :

- 1° - M₅S, M₅N₁, M₉S, M₁₁S, M₁₂S, M₁₃S, M₁₄S, M₁₈S et M₂₃S.
- 2° - La souche 2011 Str^S et son mutant 2011 Str^R3 (DENARIE-VERSAILLES).
- 3° - Les souches LB₁, Ls 2 A, Ls 18, Ls 5 B et Ls 51 B nous ont été aimablement fournies par OBATON (INRA - DIJON)..

II - MILIEUX

a) Milieu RC (48)

Phosphate dipotassique ($K_2H PO_4$).....	1	g
Sulfate de magnésium ($MgSO_4, 7 H_2O$).....	0,2	g
Extrait de levure (Difco).....	1	g
Eau distillée q.s.p.	1	l

Le pH est ajusté à 7,2 ... 7,5.

b) Milieu RC gélosé

Milieu RC + 15 g d'agar (Difco) ou 12 g d'agar (Biomar) /l.

Ces deux milieux sont stérilisés à 120° C pendant 20 minutes.

c) Source de carbone

Une solution aqueuse de sucre (glucose) est préparée à la concentration de 40 pour 100 et utilisée à 1 pour 100.

d) Facteurs de croissance

Les vitamines B₁ et H sont utilisées à des concentrations respectives de 10 et 0,5 µg/ml.

e) Milieu gélose bactériophage

Phosphate disodique ($Na_2 H PO_4, 12 H_2O$)	0,45	g
Sulfate de sodium ($SO_4 Na_2, 10 H_2O$)	0,06	g
Nitrate de potassium (KNO_3)	0,06	g
Chlorure ferrique ($Fe Cl_3$: 1 ml de la solution 1 p 100)	0,01	g

Chlorure de calcium ($\text{Ca Cl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$)	0,06	g
Chlorure de magnésium ($\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$)	0,10	g
Mannitol	10	g
Agar (Difco)	7,5	g
Eau distillée q.s.p.	1	l

La source de carbone, les facteurs de croissance et la gélose bactériophage sont stérilisés à 105° C pendant 30 minutes.

III - ISOLEMENT DES PHAGES

1) Recherche dans la terre

Huit échantillons de terre ont été prélevés dans différents champs de luzerne (Medicago sativa) du Nord de la France. Les pieds de luzerne sont déracinés doucement et la terre en contact avec les racines est prélevée. Si des nodules sont présents sur ces racines, on les sectionne en prenant bien soin de ne pas les blesser.

Cinq grammes de chaque échantillon de terre sont portés dans 20 ml du milieu RC (48) en présence des nodules écrasés. Après homogénéisation, la suspension est placée en agitation à 30° C pendant 18 heures ; elle est ensuite filtrée d'abord sur papier puis sur filtre Millipore de porosité $0,45 \mu$; des gouttes du filtrat sont ensuite déposées à la surface de boîtes de PETRIensemencées de façon homogène avec différents R. meliloti de la collection du laboratoire.

Après 18 heures d'incubation à 25° C , la présence de phages se traduit par l'apparition de plages de lyse au sein du tapis bactérien.

Après trois isollements successifs sur R. meliloti à partir d'une plage de lyse, le phage ainsi purifié est conservé à $+ 4^\circ \text{ C}$. Au fur et à mesure des besoins, il sera toujours reproduit sur la même souche de R. meliloti.

2) Recherche et traitement des souches lysogènes

Une bactérie lysogène possède et transmet à sa descendance le pouvoir de produire dans certaines conditions des bactériophages en l'absence d'infection. Elle héberge et perpétue un élément spécifique appelé prophage. La probabilité de production spontanée de phage est très faible et varie de 10^{-6} à 10^{-2} selon le système lysogène. Pour certaines souches de bactéries dites non inductibles, on ne peut modifier cette probabilité. Pour d'autres, la production de phages peut être déclenchée à volonté dans la totalité de la population bactérienne ; ce sont les souches inductibles. Sous l'influence d'un agent inducteur, la phase végétative est déclenchée ; des phages sont produits et la bactérie est lysée. Parmi les inducteurs, citons : les rayons ultra-violets (U.V.), les rayons X, les ypérites azotées, les peroxydes organiques et la mitomycine C.

Nous avons recherché les souches lysogènes de notre collection en employant les rayons U.V. et la mitomycine C comme inducteurs.

Ces souches lysogènes étant ainsi décelées, nous avons réalisé la multiplication du phage produit sur sa souche sensible de R. meliloti de notre collection.

a) Action du rayonnement U.V.

L'irradiation est obtenue en soumettant une culture de R. meliloti, en phase exponentielle de croissance diluée au dixième (environ 10^8 bactéries/ml), à une lampe génératrice de rayons U.V. ; la culture est agitée doucement pendant toute la durée de l'exposition.

L'efficacité du rayonnement est fonction de trois paramètres qui sont : la "puissance" de la lampe, la distance entre la lampe et la culture, et le temps d'irradiation.

Nous avons déterminé que pour la lampe de "puissance", 300 ergs/cm² que nous avons en notre possession, nous devons exposer la culture à 0,6 m pendant 120 secondes.

Le contenu irradié est placé dans un tube de 20/200 recouvert de papier aluminium pour empêcher le phénomène de photo-réactivation. Après 18 heures au bain-marie à 30° C en agitation, la culture est centrifugée à 8 800 g pendant 20 minutes. Le surnageant est passé sur filtre Millipore de porosité 0,22 µ.

Les bactériophages produits sont détectés selon la technique des plages de lyse décrite précédemment.

Pour cette expérience, nous avons irradié les souches : M₅S, M₅N₁, M₉S, M₁₃S, M₁₄S, 2011 Str^S et 2011 Str^R.

b) Action de la mitomycine C

Cet antibiotique possède un pouvoir mutagène et peut induire la libération du prophage. Des essais préalables ont été nécessaires pour déterminer le degré de sensibilité des souches de R. meliloti à ce produit. Nous avons montré que la mitomycine C peut être employée à la concentration de 5 µg/ml, en présence d'une suspension bactérienne de turbidité initiale D.O.₁₀₀ = 15. Après la lyse de la culture, le milieu est centrifugé et filtré : la suite des opérations est la même que celle décrite précédemment pour l'isolement des souches de la terre.

Pour cette expérience, nous avons utilisé les souches : M₅N₁, M₂₃S, 2011 Str^S, LB₁, Is₂ A, et Is₅ B.

IV - MULTIPLICATION DES BACTERIOPHAGES

Lorsqu'un phage est isolé, il faut le reproduire sur sa bactérie hôte afin de pouvoir le conserver et l'étudier. Il existe plusieurs techniques permettant d'obtenir des quantités plus ou moins importantes de phages. Avant de se multiplier sur la bactérie hôte, un phage s'adsorbe sur la paroi et injecte son acide nucléique dans le cytoplasme. Cette adsorption dépend du nombre de phages utilisés et du milieu d'adsorption notamment de sa concentration ionique, de son pH et de sa température. Lorsque le bactériophage est fixé d'une façon irréversible, l'acide nucléique viral est injecté dans la cellule bactérienne. Le métabolisme de celle-ci est alors détourné au profit du virus. Son développement se traduit par la lyse microbienne concrétisée par une clarification en milieu liquide ou l'apparition de plages de lyse plus ou moins nombreuses en milieu solide.

Afin d'avoir une idée la plus précise possible de la quantité de bactéries que nous soumettons à l'action des phages, il nous a semblé intéressant d'étudier le nombre de bactéries présentes dans le milieu en fonction de la densité optique lue à 600 nm.

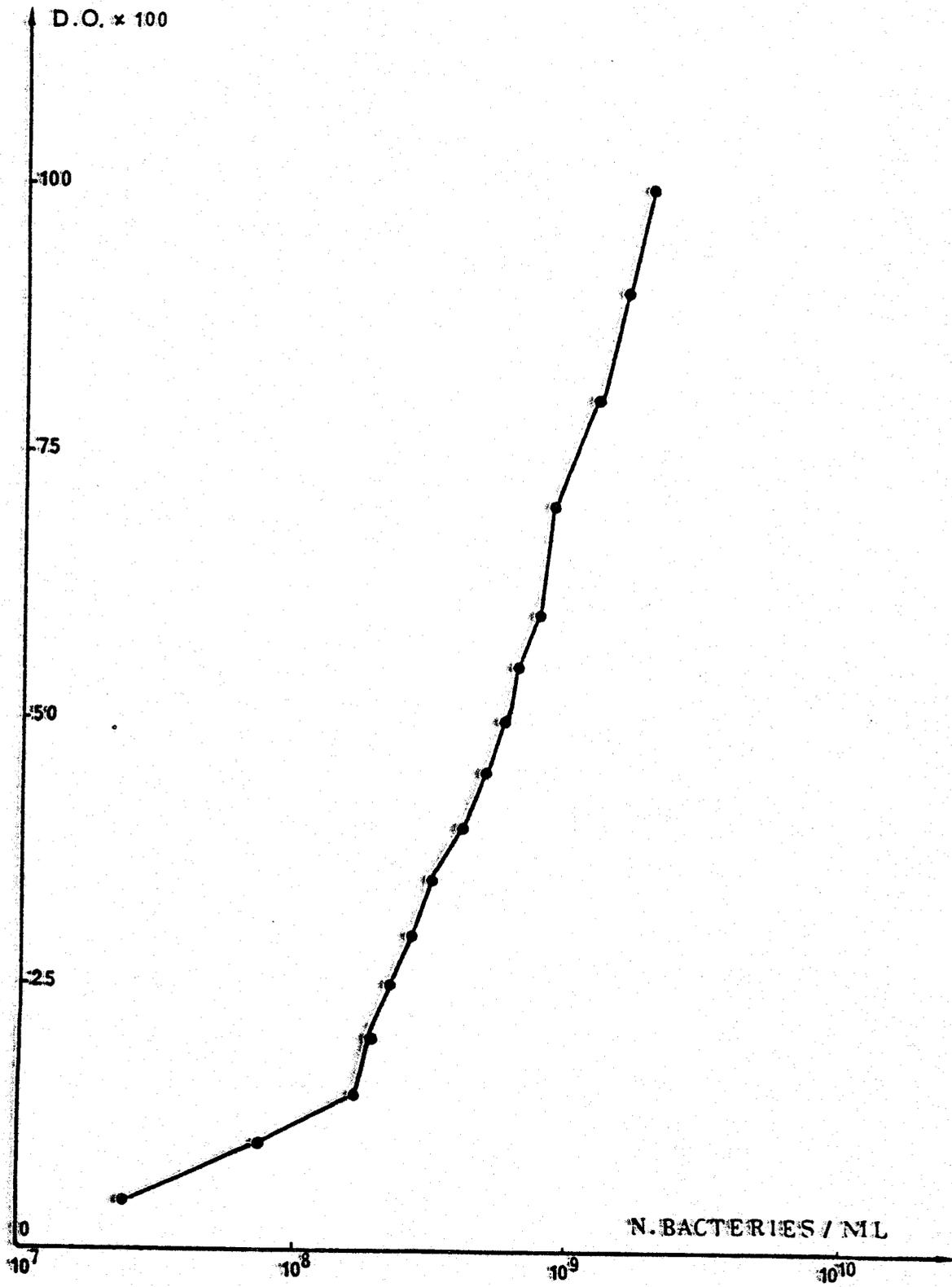
L'expérience est réalisée à 30° C en agitation rotative sous un volume de 50 ml dans un erlenmeyer de 300 ml. Le milieu de culture est le R.C. glucosé à 1 pour 100. La souche employée est la M₁₃S. La zone de densité optique étudiée est celle comprise entre 0 et 100. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I et la figure 1.

DENSITE OPTIQUE (D.O. 100)	NOMBRE DE BACTERIES PAR ML
5	$3,6 \cdot 10^7$
10	$8,8 \cdot 10^7$
15	$2,1 \cdot 10^8$
20	$2,7 \cdot 10^8$
25	$3,5 \cdot 10^8$
30	$4,1 \cdot 10^8$
35	$5,0 \cdot 10^8$
40	$6,1 \cdot 10^8$
45	$6,9 \cdot 10^8$
50	$7,5 \cdot 10^8$
55	$8,0 \cdot 10^8$
60	$8,8 \cdot 10^8$
70	$9,2 \cdot 10^8$
80	$1,1 \cdot 10^9$
90	$2,1 \cdot 10^9$
100	$2,9 \cdot 10^9$
110	$3,3 \cdot 10^9$

TABLEAU I : Nombre de bactéries par ml en fonction de la densité optique d'une culture de la souche M₁₃^S de R. meliloti.



FIGURE 1 - Densité optique d'une culture de Phizobium meliloti en milieu P.C. glucosé, en fonction du nombre de bactéries.



1) Multiplication en milieu solide

Nous avons utilisé la technique dite de double couche (49). A 0,1 ml d'une suspension phagique est ajouté 0,3 ml d'une culture en phase exponentielle de R. meliloti sensible. Après 20 minutes de contact, on ajoute au mélange 3 ml de gélose molle à 7,5 ‰ d'agar (gélose bactériophage) maintenue liquide à 45° C. Le tout est coulé à la surface de boîtes de PETRI contenant du milieu R.C. gélosé, glucosé et vitaminé.

Après 18 heures d'incubation à 25° C, la gélose molle dans laquelle se sont multipliés les phages est placée dans un tube, additionnée de 2,5 ml de R.C. et de quelques gouttes de chloroforme, homogénéisée et laissée pendant 20 minutes à la température ambiante.

Après centrifugation à 8 800 g durant 15 minutes, le surnageant contenant les phages est définitivement débarrassé des derniers débris bactériens par filtration sur membrane Millipore de porosité 0,45 μ .

Le stock de phages est ensuite dosé et conservé à + 4° C.

2) Multiplication en milieu liquide

Une souche sensible de R. meliloti en phase exponentielle de croissance en milieu R.C. (sous un volume de 3 ml) est infectée par les phages prélevés à l'aide d'un fil de platine dans une plage de lyse obtenue sur milieu solide.

Après la lyse des bactéries, qui se traduit par une chute de la densité optique, la suspension est centrifugée et filtrée dans des conditions identiques aux précédentes.

3) Dénombrement

Le dénombrement des phages contenus dans les suspensions réalisées selon les techniques précédentes constitue le dosage du stock. Trois méthodes peuvent être utilisées :

a) Numération des plages de lyse en milieu solide

Des dilutions appropriées de la suspension phagique sont ajoutées à des cultures de la bactérie sensible. Une partie aliquote de chacun des mélanges est coulée sur un milieu gélosé permettant la croissance bactérienne et la multiplication des phages qui se manifeste par l'apparition de plages de lyse dans le tapis bactérien ; ces plages sont comptées et les résultats sont exprimés en nombre de phages par ml de la suspension originelle.

b) Détermination de la dernière dilution lytique

Il s'agit de déterminer la plus petite quantité de suspension phagique capable de lyser une culture de la bactérie sensible. En considérant qu'un seul phage peut détruire la culture bactérienne, on mesure ainsi le nombre de particules phagiques dans la préparation.

c) Mesure du temps de lyse

Les phages et les bactéries sensibles sont mis en contact et on mesure le temps nécessaire pour obtenir une diminution de la turbidimétrie du mélange jusqu'à une valeur arbitrairement fixée. Connaissant les dilutions phagiques utilisées, ce temps de lyse permet de déterminer la concentration initiale en phages car il est inversement proportionnel au logarithme de cette concentration. Le résultat est exprimé en unités arbitraires définies par l'application de la méthode à un témoin constitué d'une suspension phagique connue.

Nous avons pour notre part choisi la première méthode en utilisant la technique de la double couche et les milieux décrits précédemment.

B - RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

Des échantillons de terre analysés, nous avons obtenu 20 phages donnant des plages de lyse d'aspects différents sur R. meliloti. Elles peuvent être claires ou troubles, parfois entourées d'un halo plus ou moins limpide. Leur taille est également variable.

Par la suite, deux variétés du phage Φ_{13} ont été isolées : l'une présente des plages de lyse claires (Φ_{13c}), l'autre des plages entourées d'un halo (Φ_{13h}).

Parmi les souches de Rhizobium soumises aux rayons ultra-violets, la M_{13}^S et la 2011 Str^S se sont révélées porteuses d'un prophage. Elles nous ont permis d'isoler les phages ΦM_{13} et $\Phi 2011$ Str^S.

Enfin, chez la souche M_{5-1} qui s'est avérée lysogène, la mitomycine C a induit la sortie du phage ΦM_{5-1} .

Dans le tableau II, nous avons reporté l'ensemble des bactériophages que nous avons isolés ainsi que les concentrations obtenues sur les R. meliloti sensibles correspondants.

L'isolement de ces phages, leur multiplication ainsi que leurs dénombrements ont été exclusivement réalisés sur milieu solide. Cette technique a un avantage certain, celui de permettre de contrôler l'aspect des plages de

BACTERIOPHAGES	SOUCHE INDICATRICE	NOMBRE DE PARTICULES/ML
Φ_1	M ₉ S	4,6 . 10 ⁹
Φ_2	M ₉ S	4,8 . 10 ⁹
Φ_3	M ₉ S	8,0 . 10 ⁹
Φ_{L9}	M ₉ S	7,7 . 10 ⁹
Φ_{10}	M ₁₂ S	1,3 . 10 ⁹
Φ_{19}	M ₁₂ S	5,7 . 10 ⁹
Φ_{20}	M ₁₂ S	6,5 . 10 ⁹
Φ_{21}	M ₁₂ S	7,3 . 10 ⁹
Φ_{11}	M ₁₃ S	2,1 . 10 ⁹
Φ_{14}	M ₁₃ S	7,0 . 10 ⁹
Φ_{16}	M ₁₈ S	11,7 . 10 ⁹
Φ_{13a}	M ₁₄ S	14,8 . 10 ⁹
Φ_{13h}	M ₁₄ S	4,0 . 10 ⁹
Φ_{13c}	M ₁₄ S	1,5 . 10 ⁹
Φ_4	M ₁₁ S	10,0 . 10 ⁹
Φ_{5t}	M ₁₁ S	1,3 . 10 ⁹
Φ_6	M ₁₁ S	10,5 . 10 ⁹
Φ_7	M ₁₁ S	10,0 . 10 ⁹
Φ_9	M ₁₁ S	7,6 . 10 ⁹
Φ_{12}	M ₁₁ S	8,3 . 10 ⁹
Φ_{22}	M ₂₈ S	5,7 . 10 ⁹
Φ_{M5-1}	Ls ₂ A	4,1 . 10 ⁹
Φ_{M23}	M ₂₇ S	3,2 . 10 ⁹
$\Phi_{2011} \text{ Str}^S$	L5-30	0,4 . 10 ⁹

TABLEAU II : Phages isolés, leurs souches sensibles et les résultats des dénombrements de leurs stocks.



lyse au fur et à mesure des expériences et de déceler, le cas échéant, toute modification morphologique. Cependant, elle entraîne une perte partielle de phages ; ceux-ci restent emprisonnés dans la gélose, et ne pouvant pas être récupérés.

La technique de multiplication des bactériophages en milieu liquide présente elle aussi des inconvénients. Elle est souvent appréciée en suivant la baisse de la densité optique de la culture ; cependant, l'apparition de bactéries mutantes résistantes au phage peut modifier les résultats. Cet inconvénient est d'une importance considérable lorsque l'on effectue une lyse en continu car alors ce sont ces bactéries qui se multiplient et la production de phages est arrêtée puisqu'ils ne peuvent plus se développer sur les mutants résistants.

En culture discontinue, si toutes les bactéries ne sont pas lysées au cours du premier cycle lytique, on assiste à une augmentation de la turbidité suivie d'une diminution de celle-ci reflétant une nouvelle lyse. A la fin de la lyse, un nombre non négligeable de phages restent adsorbés sur les enveloppes des bactéries lysées et lors de la première centrifugation, ils sont entraînés dans le culot.

Les dénombrements ne reflètent donc pas tout-à-fait le nombre de particules phagiques "viables" présentes dans la suspension.

En dépit des inconvénients inhérents à ces techniques, elles nous ont permis d'obtenir des stocks de phages titrant environ 5.10^9 particules/ml. Il est nécessaire d'obtenir de telles concentrations afin de pouvoir, le cas échéant, faire varier le rapport phage / bactérie, lors de l'infection "in vitro" de R. meliloti.

Chapitre II

ETUDE DES BACTERIOPHAGES
CAPABLES, DANS NOS
CONDITIONS EXPERIMENTALES,
DE LYSER RHIZOBIUM MELILOTI
EN L'ABSENCE DE Ca^{2+} ET Mg^{2+}

Au cours des expériences de multiplication des phages en milieu liquide, nous nous sommes aperçus que certains d'entre-eux ne lysaient pas R. meliloti dans nos conditions expérimentales.

Sur dix huit phages isolés des échantillons de terre, onze sont incapables de lyser R. meliloti en milieu liquide. Dans la suite de notre travail, ils sont appelés "phages lyse solide ou L.S."

Les sept autres capables de lyser Rhizobium en milieu liquide sont appelés "phages lyse liquide ou L.L".

L'étude de ces sept phages a fait l'objet d'une publication(50) dont les résultats sont repris dans ce chapitre.

MICROBIOLOGIE. — *Étude des bactériophages de Rhizobium meliloti* (1) Note (*) de Michel Werquin, Mohamed Tahar Ben Brahim et Draga Krsmanovic-Simic, présentée par M. Jacques Tréfouël.

Parmi les bactériophages de notre collection, sept d'entre-eux, capables de lyser *Rhizobium meliloti* en milieu liquide en l'absence de Ca^{2+} ou Mg^{2+} sont étudiés. L'ensemble de leurs propriétés les différencie nettement des phages incapables de lyser *Rhizobium meliloti* dans les mêmes conditions.

Among the bacteriophages in our collection, seven are studied which can lyse Rhizobium meliloti in a liquid medium in the absence of Ca^{2+} or Mg^{2+} . The total of their properties clearly differentiates them from phages which are unable to lyse Rhizobium meliloti under identical conditions.

Nous avons isolé de nombreux phages de *Rhizobium meliloti* des terres du Nord de la France et dans une note antérieure (2), nous avons étudié et classé selon leur morphologie et leur spécificité d'hôte certains de ceux-ci présentant la particularité de ne pouvoir lyser les bactéries en milieu liquide en absence d'ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} . En effet, les phages provoquant la lyse bactérienne dans tous les cas en milieu liquide n'avaient pu être examinés au microscope électronique du fait de la fragilité de leurs structures. Dans ce travail, nous avons tenté de caractériser ces bactériophages en nous basant sur leur inhibition par les sérums antiphages, leur spécificité d'hôte et leur degré de dépendance pour les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} pour lyser le *Rhizobium* en milieu liquide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES : — Souches bactériennes — Ce sont celles décrites précédemment (2).

— Bactériophages — Trois souches appartenant aux trois premiers groupes de la classification de Bradley (3) étudiées dans la Note antérieure ont servi de référence. Il s'agit des souches CM_1 (Groupe A), NM_1 (Groupe B) et MM_1 (Groupe C), capables de lyser *Rhizobium meliloti* en l'absence de Ca^{2+} ou Mg^{2+} , seulement en milieu gélosé (Lyse en milieu solide = phages L.S.). Les sept souches pouvant lyser en milieu liquide en l'absence de Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Lyse en milieu liquide = phages L.L.) sont les suivantes :

$\Phi 4$, $\Phi 5$, $\Phi 6$, $\Phi 7$, $\Phi 9$, $\Phi 11$ et $\Phi 12$.

Les stocks de phages sont obtenus selon la méthode d'Adams (4) et titrent 10^9 à 10^{10} particules infectieuses par millilitre.

— Préparation des sérums anti-phages — Ceux-ci sont obtenus par injections successives à des lapins de 1 ml de suspension de phages additionnée du même volume d'adjuvant complet de Freund.

Le pouvoir inhibiteur du sérum est donné en valeur de K (4), constante d'inhibition correspondant à :

$$K = 2,3 \frac{D}{t} \log \frac{P_0}{P}$$
 (D étant la dilution du sérum ; t, le temps de contact avec la suspension de phages ; P_0 et P le nombre de phages infectieux avant et après action du sérum).

— Lyse en milieu liquide en présence d'ions Ca^{2+} et Mg^{2+} — Les *Rhizobium* en phase exponentielle de croissance en milieu RC (5) sont dilués au demi sous un volume de 4 ml dans le même milieu contenant soit du CaCl_2 , 4×10^{-4} M soit du MgCl_2 , 5×10^{-4} M. Les phages sont ajoutés sous un volume de 0.1 ml. Après 18 heures d'incubation à 30°C les densités optiques sont lues à 600 nm sous une épaisseur de 1 cm.

TABLEAU I

Bactériophages	Antisérums			
	CM ₁	NM ₁	MM ₁	
Phages L.S	CM ₁	180	0	0
	NM ₁	0	246	0
	MM ₁	0	0	38
Phages L.L	Φ4	7,6	1,7	0
	Φ5'	0	0	0
	Φ6	0	0	0
	Φ7	0	0	0
	Φ9	4,5	0	0
	Φ11	0	0	0
	Φ12	10	8,5	0

RÉSULTATS : Dans le tableau I, sont comparées les valeurs de la constante d'inhibition K des sérums obtenus à partir des phages L.S, vis-à-vis de ces mêmes phages et des virions L.L. Les 3 sérums antiphages CM₁, NM₁ et MM₁ possèdent une constante d'inhibition K élevée pour les phages correspondants. Ceci traduit une inhibition supérieure à 90 % et une grande spécificité. Par contre, l'inhibition des phages L.L par les sérums antiphages L.S est nulle ou très faible. La propriété de ces phages de lyser en milieu liquide sans apport de Ca²⁺ ou Mg²⁺ est donc un caractère distinctif important.

TABLEAU II

Bactériophages L.L	Souches de <i>Rhizobium meliloti</i>						
	M ₃ N ₁	M ₉ S	M ₁₁ S (*)	M ₁₂ S	M ₁₃ S	M ₁₄ S	M ₁₈ S
Φ4	-	-	+	-	+	-	+
Φ5'	-	-	+	-	-	-	+
Φ6	+	+	+	+	+	+	+
Φ7	+	+	+	+	+	+	+
Φ9	+	±	+	+	+	+	+
Φ11	+	±	+	+	+	+	+
Φ12	+	+	+	+	+	+	+

(*) Les différents bactériophages L.L sont multipliés sur la souche M₁₁S.

Ces trois sérums ne permettant aucune distinction entre les sept phages L.L, nous avons essayé de les classer selon différents critères.

1° La spécificité d'hôte (tableau II) : le comportement des phages L.L vis-à-vis des souches de notre collection permet de grouper d'une part les phages Φ6, Φ7 et Φ12, d'autre part les phages Φ9 et Φ11 et enfin les phages Φ4 et Φ5'.

2° Réaction avec les sérums antiphages L.L : pour vérifier la réalité des groupes déterminés précédemment, nous avons utilisé les sérums anti-phages obtenus par injection des phages Φ4, Φ6, Φ9 et Φ12. Les résultats sont consignés dans le tableau III.

TABLEAU III

Bactériophages	Antisérums			
	Φ 4	Φ 6	Φ 9	Φ 12
(*) { Φ 4	57	71	100	104
{ Φ 5'	78	100	118	100
(*) { Φ 6	79	104	124	90
{ Φ 7	66	103	131	91
Φ 9	157	135	195	109
(*) { Φ 11	80	71	154	83
{ Φ 12	109	78	166	61

(*) Bactériophages isolés du même échantillon de terre.

On constate que les valeurs de la constante K sont très proches les unes des autres; les sérums obtenus à partir de ces 4 phages sont donc peu spécifiques des différents phages de ce groupe. Les phages Φ5', Φ6 et Φ7 semblent sérologiquement proches et le phage Φ9 différent des autres. On peut remarquer que les phages Φ4 et Φ12 sont moins inhibés par leur propre sérum que par ceux correspondant aux autres phages. Ce phénomène a déjà été signalé pour d'autres phages de *Rhizobium* [(⁶), (⁷)] et il peut faire douter de la validité des résultats de l'inhibition phagique pour cette classe de phages L.L.

TABLEAU IV

Bactériophages	Milieu RC		
	Sans Ca ²⁺ ni Mg ²⁺	Avec Ca ²⁺	Avec Mg ²⁺
Φ 4	±	++	-
Φ 5'	±	++	-
Φ 6	++	++	++
Φ 7	++	++	++
Φ 9	+	++	-
Φ 11	+	++	++
Φ 12	++	++	-

3) Exigence en ions Ca²⁺ et Mg²⁺ pour la lyse en milieu liquide.

Les résultats du tableau IV permettent de constater que l'activité lytique des phages L.L. varie selon la composition du milieu en ions Ca²⁺ et Mg²⁺. La lyse bactérienne est activée par Ca²⁺ et inhibée par Mg²⁺ pour les phages Φ4, Φ5' et Φ9. Elle est favorisée par Ca²⁺ ou Mg²⁺ pour le phage Φ11 et indifférente à la présence de ces ions pour les phages Φ6 et Φ7. Enfin, le Φ12 ne lyse pas *Rhizobium* en milieu additionné de Mg²⁺ et est indifférent à la présence d'ions Ca²⁺.

CONCLUSION : Parmi les bactériophages de *Rhizobium meliloti* que nous avons isolés, nous avons différencié deux grandes classes qui se caractérisent nettement l'une de l'autre. D'une part, ceux qui lysent *Rhizobium meliloti* en absence de Ca²⁺ et Mg²⁺ seulement

en milieu gélosé; ils ont une structure relativement stable et répondent spécifiquement aux sérums leur correspondant. D'autre part, ceux qui lysent *Rhizobium meliloti* en milieu liquide en absence de Ca^{2+} ou Mg^{2+} ont des structures plus fragiles et aucune communauté antigénique avec les sérums des phages de la première classe. Au sein de ce groupe il n'a pas été possible de classer les bactériophages selon les critères choisis.

(*) Séance du 21 février 1977.

(¹) Ce travail a bénéficié de l'aide de la Communauté Économique Européenne (contrat n° 454).

(²) D. KRSMANOVIC-SIMIC et M. WERQUIN, *C. R. Acad. Sc. Paris.*, 276, Série D, 1973, p. 2745.

(³) D. E. BRADLEY, *Bact. Rev.*, 31, 1967, p. 230.

(⁴) M. H. ADAMS, *The Bacteriophages*, N. Y. Intersc., 1959.

(⁵) J. M. DELATTRE, *Thèse de Docteur Ingénieur*, n° 121, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 1971.

(⁶) R. STANIEWSKI, M. KOWALSKI, E. GOGACZ et F. SOKOLOWSKA, *Acta Microbiol. Pol.*, 11, 1962, p. 245.

(⁷) G. J. ATKINS, *J. Virol.*, 12, 1973, p. 149.

Laboratoire de Microbiologie.
Université des Sciences et Techniques de Lille.
B.P. 36,
59650 Villeneuve d'Ascq.

Chapitre III

ETUDE DES PARAMETRES POUVANT INFLUER SUR LA LYSE BACTERIENNE EN MILIEU LIQUIDE

Au cours des recherches concernant les phages L.L ayant nécessité des conditions expérimentales nouvelles, nous nous sommes aperçus que certains phages dits L.S. étaient capables d'effectuer la lyse en milieu liquide.

Il était donc nécessaire de mieux connaître la physiologie de la lyse phagique de R. meliloti en milieu liquide.

Nous avons donc réalisé des cinétiques en faisant varier quelques paramètres physico-chimiques afin de déterminer les conditions lytiques optimales non seulement pour les sept phages précédemment étudiés, mais pour l'ensemble des bactériophages de notre collection, à l'exclusion de ceux issus de souches bactériennes lysogènes.

A - MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - Détermination de la lyse par mesure de la densité optique

Au cours des expériences suivantes, les conséquences de la variation des paramètres culturels au cours de la lyse bactérienne sont suivies par la mesure de la densité optique à 600 nm. Dans le cas où ces lyses sont effectuées en tube ou en erlenmeyer, l'évolution de la turbidité est mesurée au spectrophotomètre (ZEISS MK II) en cuve de 1 cm de chemin optique sur des échantillons de 2 ml. Si ces lyses sont effectuées durant des temps relativement longs (plus de 15 heures), on utilise une lecture de la densité optique en continu en biophotomètre (JOBIN et YVON).

II - Procédés de culture

Les tubes 20/200 (sous un volume de 10 ml) ou les erlenmeyers de 300 ml (sous un volume de 50 ml) sont placés à 30° C dans un bain-marie ou sur une table d'agitation. Ces derniers sont actionnés par un dispositif à mouvement rectiligne ou rotatif.

Lorsque la lyse est suivie en continu, la lecture est réalisée dans les fioles de 7 ml du biophotomètre sous un volume de 5 ml. L'agitation est réalisée à l'aide d'un barreau aimanté.

III - Milieux de culture

Outre le milieu R C , déjà décrit dans le chapitre I, nous avons utilisé également les milieux minimum R (51) et R gélosé. Leurs compositions sont les suivantes :

1) Le milieu R

Phosphate dipotassique ($K_2H PO_4$)	0,5 g
Nitrate d'ammonium ($NO_3 NH_4$)	0,5 g
Sulfate de magnésium ($MgSO_4, 7 H_2O$)	0,2 g
Eau distillée q. s. p.	1 1

le pH est ajusté à 7,2

2) Le milieu R gélosé

Le milieu R + 15 grammes d'agar (Difco).

3) Source de carbone

Une solution aqueuse de fructose est préparée à la concentration de 40 pour 100 et utilisée à 1 pour 100.

4) Sels de calcium et de magnésium

Les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} sont préparés en solutions aqueuses sous forme de chlorure et utilisés à des concentrations respectives de 4.10^{-4} M et 5.10^{-4} M.

Ces cinq produits sont stérilisés à 105° C pendant 30 minutes.

B - RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

I - Rôle de la source de carbone

Au début de ce travail, nous utilisons le milieu R.C. glucosé à 1 pour 100 pour la culture de R. meliloti. Ce milieu nous permet d'obtenir des cultures en phase exponentielle de croissance. Cependant, il a été démontré que la biodégradation du glucose provoque une acidification importante (52) ; de plus, certaines souches de R. meliloti ont tendance à s'agréger et à sédimenter ce qui fausse plus ou moins la lecture de la densité optique. Les souches chez lesquelles nous avons observé ce phénomène sont : M_2S , M_3S , $M_{15}S$, $M_{23}S$, $M_{28}S$, L_5 (L_5) $LS_{51}B$ et parfois la souche 2011 Str^S.

Nous pensons que la baisse du pH du milieu pourrait être à l'origine de ce phénomène : en effet, lorsqu'on utilise le fructose à 1 pour 100 comme source de carbone, il n'y a pas d'acidification (53). Nous avons constaté que les souches précitées floconnaient beaucoup plus faiblement et la lecture de densité optique était possible après une simple homogénéisation.

Il est important de signaler qu'une baisse importante de pH influence considérablement le métabolisme bactérien et inhibe partiellement la multiplication phagique.

Le fructose a donc été choisi comme source de carbone pour les cultures de R. meliloti.

Dans le tableau III nous avons reporté les résultats d'une expérience montrant l'évolution de la densité optique d'une culture de la souche M₁₃S en milieu RHB₁ fructosé à 1 pour 100 et glucosé à 1 pour 100. Il est à noter que le pH en fin d'expérience est acide.

II - Evaluation du nombre de phages à utiliser par bactérie

Une culture de R. meliloti sensible peut être totalement lysée en 4 heures si initialement nous mettons en présence approximativement 20 bactériophages pour une bactérie.

Mais si nous inversons cette proportion, la lyse est très lente et plusieurs cycles lytiques se développent successivement.

Pour étudier la lyse bactérienne en milieu liquide dans des conditions précises, rapides et reproductibles, nous avons recherché les concentrations phagiques et bactériennes les plus favorables. La souche M₁₁S de R. meliloti, cultivée en erlenmeyer de 300 ml sous un volume de 50 ml de R.C. fructosé à 1 pour 100, est infectée par le phage $\Phi 6$ en présence de Ca²⁺ et Mg²⁺ aux concentrations respectives de $4 \cdot 10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M. Les numérations de phages sont effectuées après 18 heures, mais la lyse est suivie par mesure de la densité optique durant 32 heures.

Heure du prélèvement	D.O. de la culture de $M_{13}S$ en présence du glucose (x 100)	D.O. de la culture de $M_{13}S$ en présence du fructose (x 100)
0 heure	32,0	32,0
4 heures	49,0	47,5
6 heures	62,3	61,0
8 heures	86,5	95,0
20 heures	160,0	143,0
25 heures	154,0	137,0
30 heures	105,0	123,0
42 heures	98,0	128,0

TABLEAU III : Mesure de la croissance de la souche $M_{13}S$ de R. meliloti en milieu RHB_1 utilisant comme source de carbone le glucose d'une part et le fructose d'autre part. En fin d'expérience, le pH est de 5,1 pour le premier cas et 6,8 pour le second cas.



Les résultats sont donnés dans le tableau IV et présentés dans la figure 2

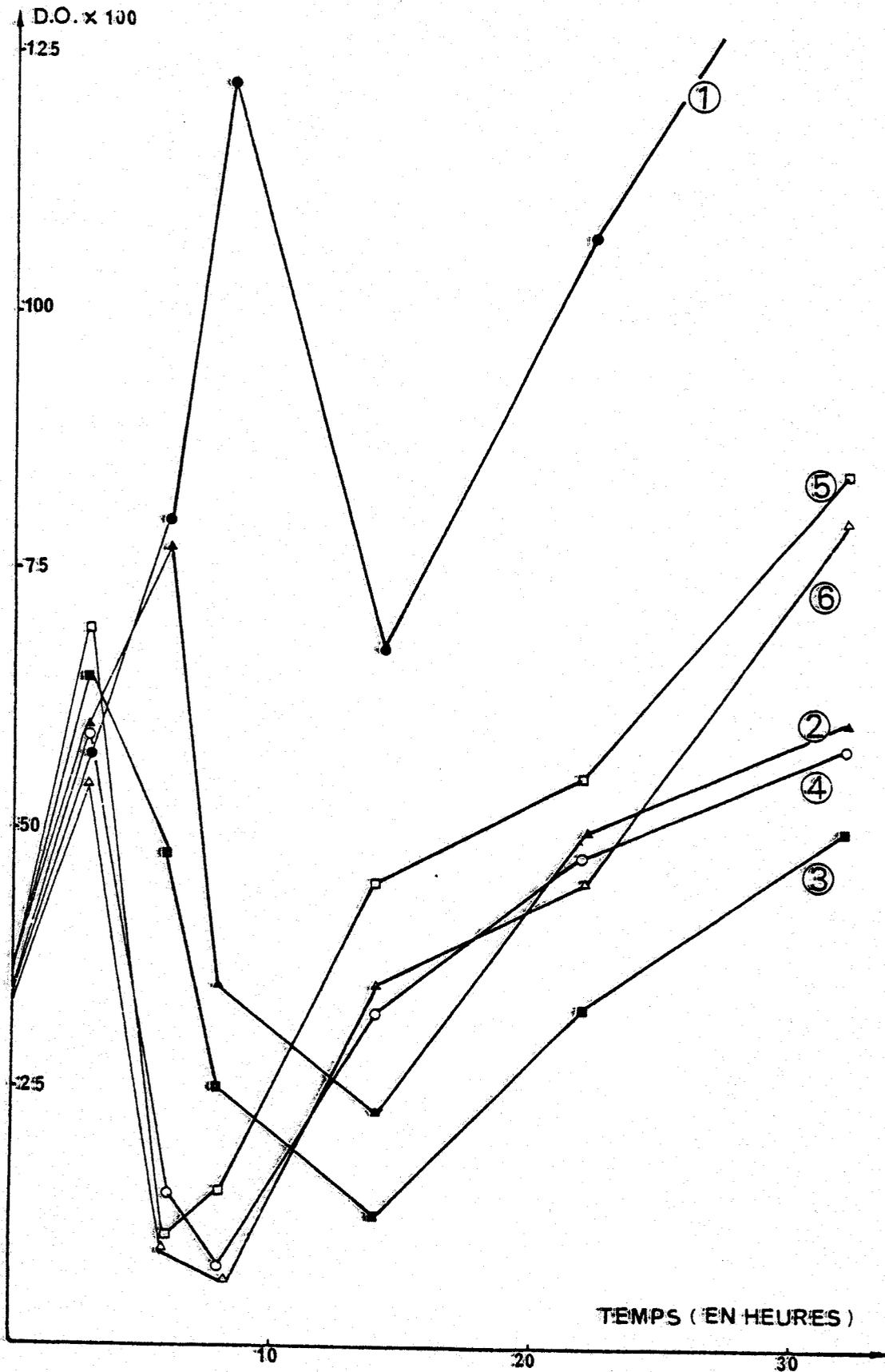
Nombre de phages utilisés par bactérie	1 Φ /10 β	1 Φ /5 β	1 Φ /1 β	5 Φ /1 β	10 Φ /1 β	20 Φ /1 β
Concentration phagique par ml après 18 heures de lyse	1,2.10 ⁹	3,0.10 ⁹	7,9.10 ⁹	1,3.10 ¹⁰	2,0.10 ⁹	8,5.10 ⁸
Courbes de D.O. figure	①	②	③	④	⑤	⑥

TABLEAU IV : Concentrations phagiques obtenues en fonction du rapport phage/bactérie (β) après 18 heures de lyse (R. meliloti M₁₁S, phage Φ 6).

On remarque que l'on obtient un nombre de phages plus important lorsque l'on met en contact 1 ou 5 phages par bactérie. Dans ce cas, les numérations donnent des valeurs voisines de 10¹⁰ phages/ml alors que nous n'en obtenons que 8,5.10⁸ lorsque nous adoptons une proportion de 20 phages/bactérie.

Les mesures de la densité optique indiquent que, d'une façon générale, la lyse est d'autant plus rapide que le nombre de phages est élevé, à condition toutefois de ne pas dépasser une certaine limite. En effet, nous ne constatons pas de différences notables entre les courbes ⑤ et ⑥ de la figure 2, qui représentent la lyse bactérienne en fonction du temps pour des concentrations de phages 10 et 20 fois supérieures à celles des bactéries. En six heures, la densité optique de la suspension est parvenue à son minimum.

FIGURE 2 - Cinétiques de lyse d'une culture de *Phizchiur meliloti* M_{115} par le Φ_6 en fonction de la multiplicité d'infection.



Ce même résultat est obtenu en 8 heures pour une proportion phage-bactérie de 5 (courbe (4)) et en 14 heures pour des proportions plus faibles (courbes (1), (2), et (3)).

Il est normal que la densité optique remonte par la suite, ce qui traduit le développement de mutants bactériens résistants au phage.

Il peut sembler paradoxal qu'une lyse maximale rapide observée avec les courbes (5) et (6) ne corresponde pas à une multiplication phagique maximale. Mais ceci résulte du phénomène de lyse externe qui intervient lorsqu'un nombre excessif de phages sont adsorbés sur une bactérie. Dans ce cas, le lysozyme viral détruit la bactérie avant que le cycle infectieux puisse démarrer. On a donc une lyse bactérienne sans production de nouveaux phages.

Pour nos expériences ultérieures, nous avons donc choisi de mettre en présence trois phages pour une bactérie. Ce rapport est capable de produire une lyse relativement rapide et un nombre élevé de phages.

Nous avons vérifié ce dernier point avec trois autres phages. Le tableau V montre effectivement des concentrations voisines de 10^{10} particules/ml après 18 Heures d'incubation

Phage utilisé ($3\Phi/1\beta$)	Φ 21	Φ 7	Φ 13a
Souche sensible	M_5N_1	$M_{11}S$	$M_{14}S$
Concentration phagique par ml après 18 heures de lyse	$2,0 \cdot 10^{10}$	$1,4 \cdot 10^{10}$	$2,3 \cdot 10^{10}$

TABLEAU V : Dénombrement de 3 rhizobiophages après 18 heures de lyse en milieu liquide.

III - Rôle de l'agitation

Dans tous les cas, une agitation trop importante des milieux empêche la lyse vraisemblablement parce que les phages ne peuvent pas s'adsorber convenablement sur les bactéries en raison du brassage trop rapide. Par contre, dans un milieu non agité, il n'y a pas d'oxygénation possible. Or l'anaérobiose ralentit la croissance de R. meliloti et par conséquent la multiplication des virions.

Nous avons pu déterminer les conditions optimales suivantes :

- 170 balancements par minute en agitation rectiligne pour le bain-marie (BIOLAFITTE)
- 85 périodes par minute pour la table d'agitation (GOURDON)
- 85 mouvements angulaires par minute pour le biophotomètre (BONET, HAURY et JOURDAN)

Ces résultats sont obtenus lorsque l'on emploie des tubes 20/200, des erlenmeyers de 300 ml et des fioles 7 ml sous des volumes respectifs de 10 ml, 50 ml et 5 ml.

Notons aussi que l'efficacité de l'agitation est inversement proportionnelle au volume. En effet, le rendement est meilleur lorsque l'on utilise des faibles volumes.

D'autre part, le nombre final de phages ne dépend pas de la souche employée.

Dans le tableau VI, le dénombrement phagique confirme d'une façon rigoureuse la lyse bactérienne traduite par la baisse de la densité optique tableau VII.

Phages	Temps en heures	0	1	5	11	17	36
Φ 21 / M ₅ N ₁		10 ⁶	10 ⁸	2 .10 ⁹	1,1.10 ¹⁰	2,2.10 ¹⁰	3 .10 ¹⁰
Φ 7 / M ₁₁ S		1,1.10 ⁶	2 .10 ⁷	5 .10 ⁸	2,1.10 ⁹	5 .10 ⁹	2,3.10 ¹⁰
Φ 13a/ M ₁₄ S		2 .10 ⁶	1,9.10 ¹⁰	2,8.10 ¹⁰	5,1.10 ¹⁰	6,1.10 ¹⁰	3,4.10 ¹⁰

TABEAU VI : Multiplication de 3 phages en fonction du temps (en erlenmeyer de 300 ml sous un volume de 50 ml, agitation 85 rotations/minute).

IV - Détermination des concentrations optimales de Ca²⁺ et Mg²⁺

Ces deux cations interviennent dans la fixation du bactériophage sur la bactérie qui s'effectue en deux étapes :

- une adsorption réversible fait d'abord intervenir des réactions ioniques qu'une agitation rapide, par exemple, peut briser.

- puis l'adsorption est définitive lorsqu'une protéine de la queue de phage s'unit au récepteur de la paroi bactérienne.

Nous avons montré dans le chapitre II que les phages de la "L.L" sont capables de lyser R. meliloti en absence de calcium et magnésium. Cependant, la lyse est stimulée par l'incorporation au milieu de ces ions. Toutefois au-delà de la concentration de 8.10^{-4} M, le calcium peut provoquer une précipitation des phosphates mono et dipotassiques du milieu. Nous avons donc été amenés à étudier l'effet de concentrations inférieures.

Temps en heures	Densité optique (DO x 100) de la culture du témoin M ₁₄ S	Densité optique (DO x100) de la culture du ø 13a sur M ₁₄ S
0	83	83
1	92	104
2	102	124
3	106	125
4	122	130
5	127	133
6	129	135
7	132	128
8	130	142
9	141	135
10	137	138
11	146	133
12	154	62
13	152	56
14	155	64
15	163	71
16	168	71
17	164	73
18	166	70
⋮	⋮	⋮
36	156	70

TABLEAU VII : Evolution de la lyse de R. meliloti M₁₄S par le phage ø 13a (DOx100).



Par contre, le magnésium employé dans les mêmes conditions de concentration (8.10^{-4} M) ne provoque pas un tel phénomène.

Il s'avère, d'après la figure 3, que chaque bactériophage a besoin de concentrations déterminées de calcium et magnésium pour fournir une lyse maximale car une quantité supplémentaire de ces cations n'augmente pas pour autant la lyse.

Les phages utilisés sont des bactériophages de "L.L" (Φ 6, Φ 9 et Φ 5t) ou de "L.S." (Φ 19).

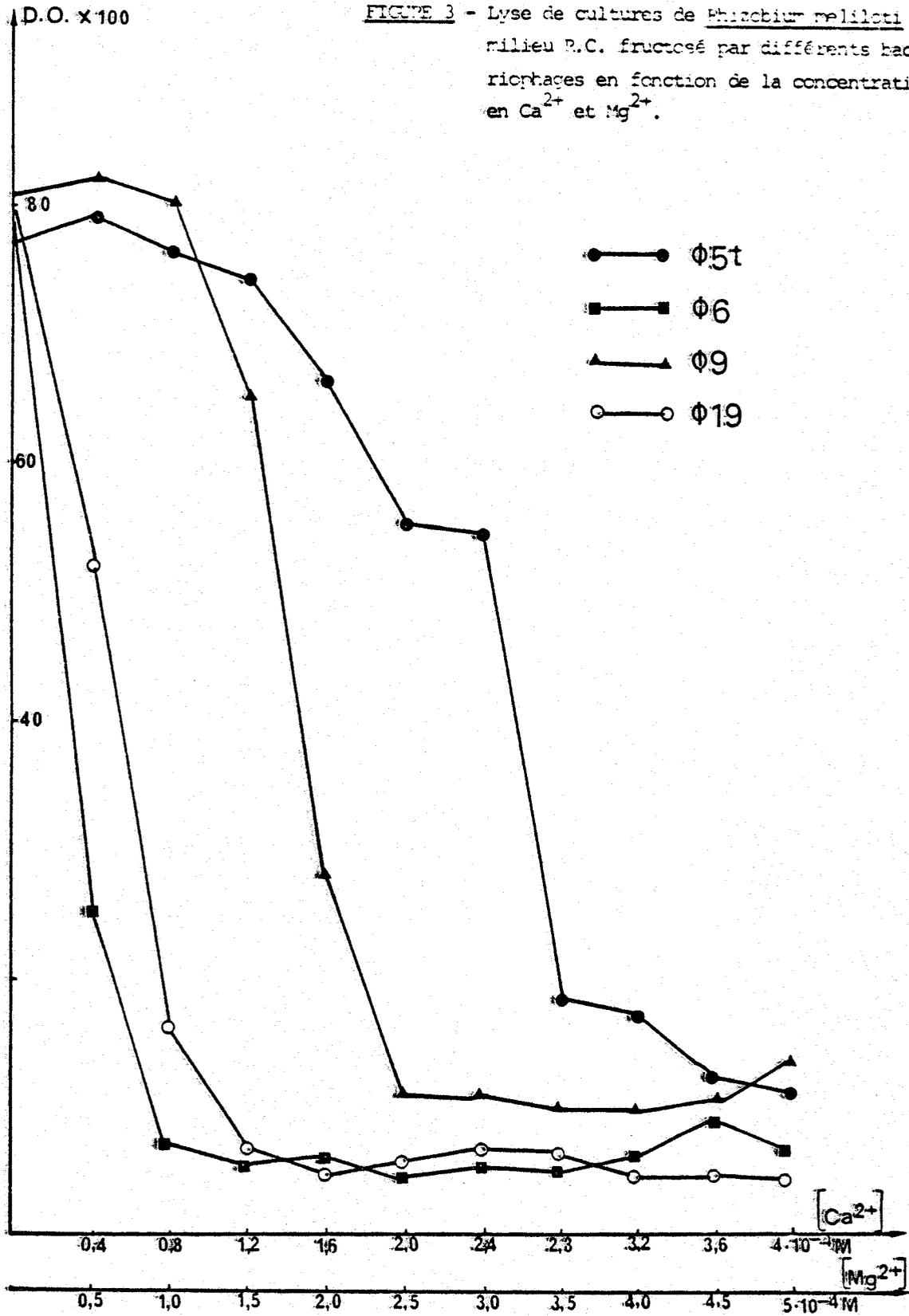
Nous observons que ce dernier, contrairement à ce que nous pensions précédemment, est parfaitement capable de lyser une culture de R. meliloti en milieu liquide à condition que lui soient fournis le calcium et le magnésium nécessaires.

La distinction entre phages de "L.L" et phages "L.S" est donc fictive si les exigences en cations sont respectées.

V - Lyse en milieu minimum

Le milieu R.C. utilisé dans les expériences précédentes donne certes satisfaction, mais il présente l'inconvénient de contenir de l'extrait de levure, produit de composition complexe et plus ou moins constante. Avant de poursuivre notre travail, nous avons voulu étudier la possibilité d'utiliser un milieu synthétique qui aurait pour avantage de rendre plus rigoureuse la reproductibilité des conditions expérimentales. Notre choix s'est porté sur le milieu minimum RHB₁ souvent utilisé au Laboratoire pour la culture des Phizobium.

FIGURE 3 - Lyse de cultures de *Phaenocarpa meliloti* en milieu R.C. fructosé par différents bactériophages en fonction de la concentration en Ca^{2+} et Mg^{2+} .



En milieu RHB₁, R. meliloti a une croissance plus lente que sur R.C. mais ceci est habituel, les bactéries cultivant sur milieu synthétique minimum doivent en effet synthétiser tous les éléments nécessaires à leur croissance.

La viscosité des cultures due à la synthèse de polysaccharides est cependant plus faible, ce qui favorise les mesures de la densité optique, l'oxygénation de la culture et les filtrations sur membranes Millipore.

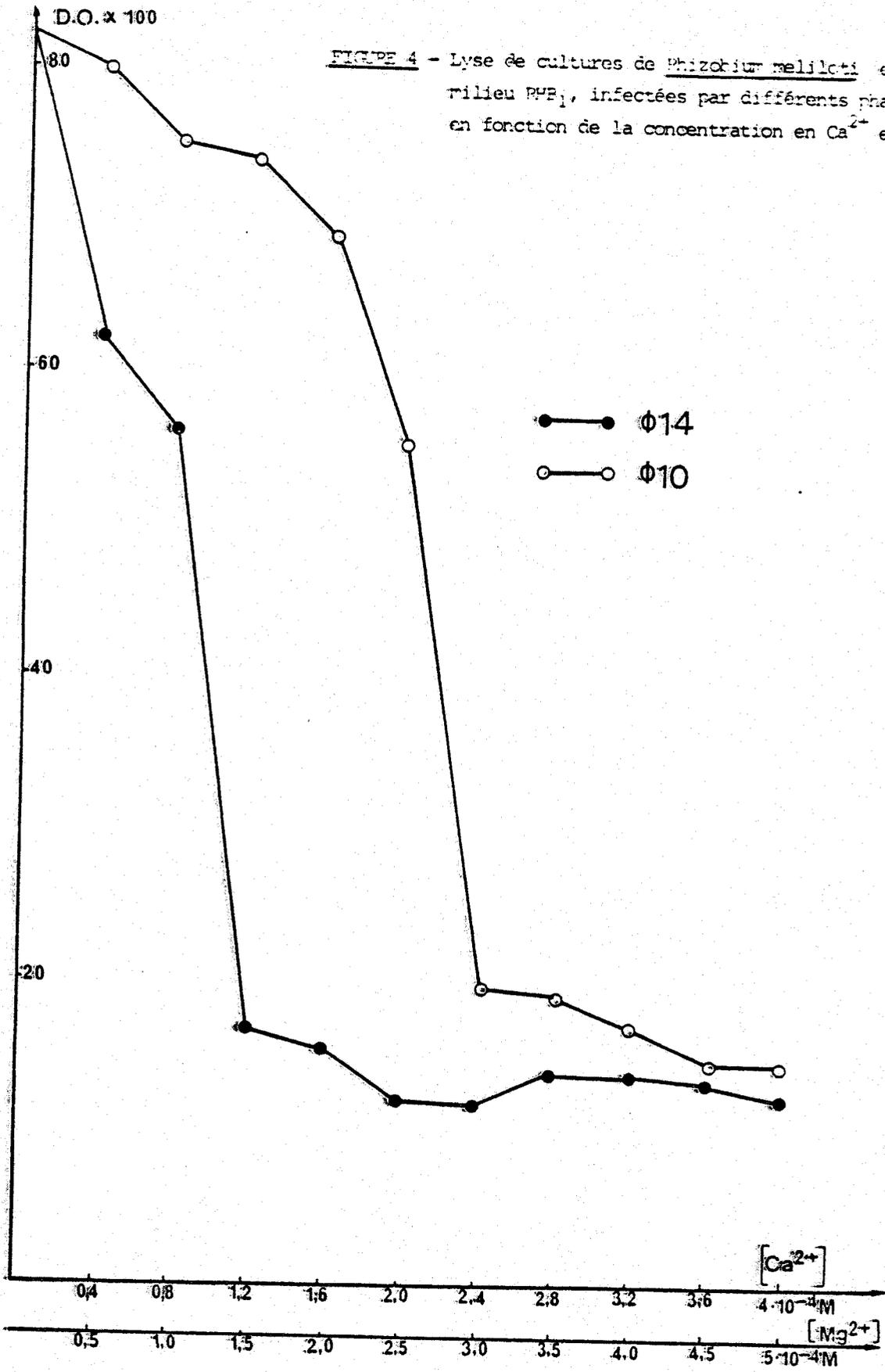
Nous avons infecté des cultures de R. meliloti en phase exponentielle de croissance en milieu RHB₁ à l'aide des phages $\Phi 10$ et $\Phi 14$ à raison de trois phages par bactérie. Les milieux contiennent des concentrations croissantes de calcium et magnésium.

La figure 4, montre que le phage $\Phi 14$ lyse la culture bactérienne pour des concentrations de $1,2 \cdot 10^{-4}$ M en calcium et $1,5 \cdot 10^{-4}$ M en magnésium.

Le phage $\Phi 10$ a besoin de concentrations respectives en calcium et magnésium de $2,4 \cdot 10^{-4}$ M et $3 \cdot 10^{-4}$ M.

Ces résultats sont dans l'ensemble très proches de ceux obtenus sur milieu complexe R.C.

De plus, nous avons remarqué qu'en milieu minimum, nous pouvions éventuellement augmenter les concentrations des deux cations avant que ne se produise la précipitation observée auparavant. Ce phénomène n'intervient qu'au delà de 10^{-3} M en calcium.



Dans cette expérience, la multiplication des bactériophages $\Phi 10$ et $\Phi 14$ s'est réalisée sans difficulté mais le temps de lyse est plus long (14 heures au moins).

Par contre, la figure 5, montre que les phages $\Phi 2$ et $\Phi 19$ n'ont pas été capables de lyser la culture de R. meliloti de façon nette en 15 heures même en présence de Ca^{2+} ($4 \times 10^{-4} \text{M}$) et de Mg^{2+} ($5 \times 10^{-4} \text{M}$).

On peut noter que l'allongement excessif du temps de lyse présente un grave inconvénient car il favorise l'apparition et le développement de mutants bactériens résistants au phage.

En dépit des avantages que pouvait procurer l'utilisation d'un milieu synthétique minimum, nous avons en conclusion préféré l'emploi du milieu complexe R.C. qui permet une multiplication virale maximale en un temps relativement court.

VI - Applications

Des expériences précédentes, nous avons pu préciser la valeur de plusieurs paramètres dont les variations influent sur la lyse de R. meliloti par les bactériophages. Nous avons déterminé ainsi le temps de lyse qui correspond à la période qui sépare le moment de l'infection de la lyse maximale correspondant à la densité optique la plus faible. Chaque phage peut être ainsi caractérisé. Ces résultats sont regroupés dans le tableau VIII. Celui-ci montre que la lyse ne peut pas s'effectuer en absence de calcium. La réduction de moitié de la concentration en magnésium augmente la durée de temps de lyse de deux heures. Dans ce cas, on n'obtient qu'une lyse partielle.

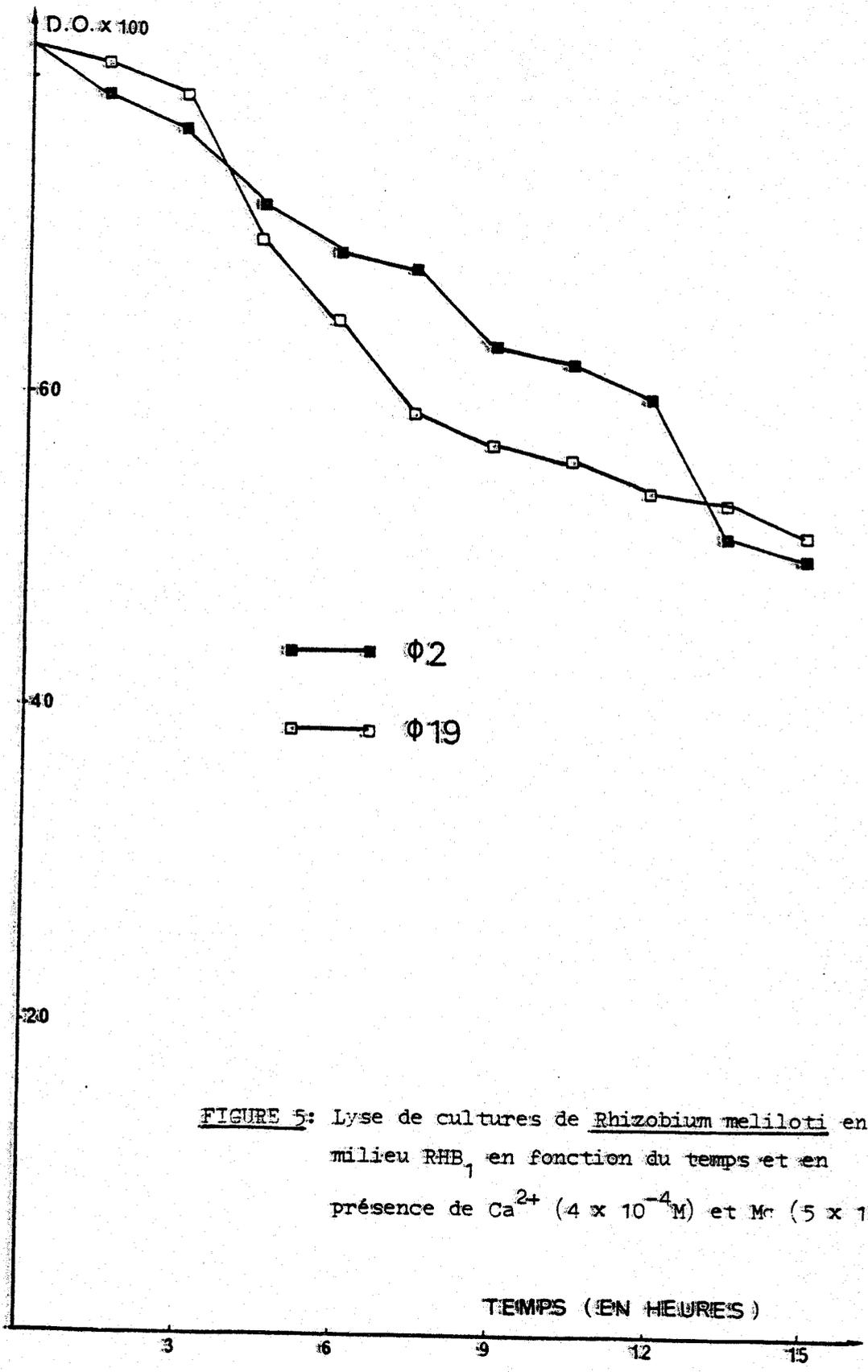


FIGURE 5: Lyse de cultures de Rhizobium meliloti en milieu RHB₁ en fonction du temps et en présence de Ca²⁺ (4 x 10⁻⁴ M) et Mg (5 x 10⁻⁴ M).



Phages	Témoin : culture de la souche sensible	Phage + souche sen- sible + Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Phage + souche sen- sible + Ca ²⁺	Phage + souche sen- sible + Mg ²⁺	Phage + souche sen- sible seulement
Φ 1	M ₉ S	6,5	5,5	-	-
Φ 2	M ₉ S	5,0	5,0	-	-
Φ 3	M ₉ S	5,0	6,0	-	-
Φ 4	M ₁₁ S	11,0	-	-	-
Φ 5t	M ₁₁ S	5,5	9	-	-
Φ 6	M ₁₁ S	8,5	10,5	-	-
Φ 7	M ₁₁ S	10,0	10,0	-	-
Φ 9	M ₁₁ S	6,0	8,5	-	-
Φ L9	M ₁₁ S	11,0	12,5	-	-
Φ 10	M ₁₂ S	3,5	5,0	-	-
Φ 11	M ₁₃ S	8,0	9,5	-	-
Φ 12	M ₁₁ S	6,5	6,5	-	-
Φ 13a	M ₁₄ S	6,5	7,5	- (14,0)	- (16,0)
Φ 13c	M ₁₄ S	11,0	-	-	-
Φ 13h	M ₁₄ S	10,5	15,0	-	-
Φ 14	M ₁₃ S	3,0	5,0	10,0	-
Φ 16	M ₁₈ S	6,5	7,5	-	-
Φ 19	M ₁₂ S	6,5	6,5	-	-
Φ 20	M ₁₂ S	7,0	10,0	-	-
Φ 21	M ₁₂ S	8,0	8,0	-	-

TABLEAU VIII: Durée de la phase de lyse (en heures) des R. meliloti en fonction de la composition du milieu en calcium et magnésium.



Lorsque le milieu contient à la fois du calcium et du magnésium, le temps de lyse pour l'ensemble des bactériophages de notre collection, est compris entre trois et onze heures.

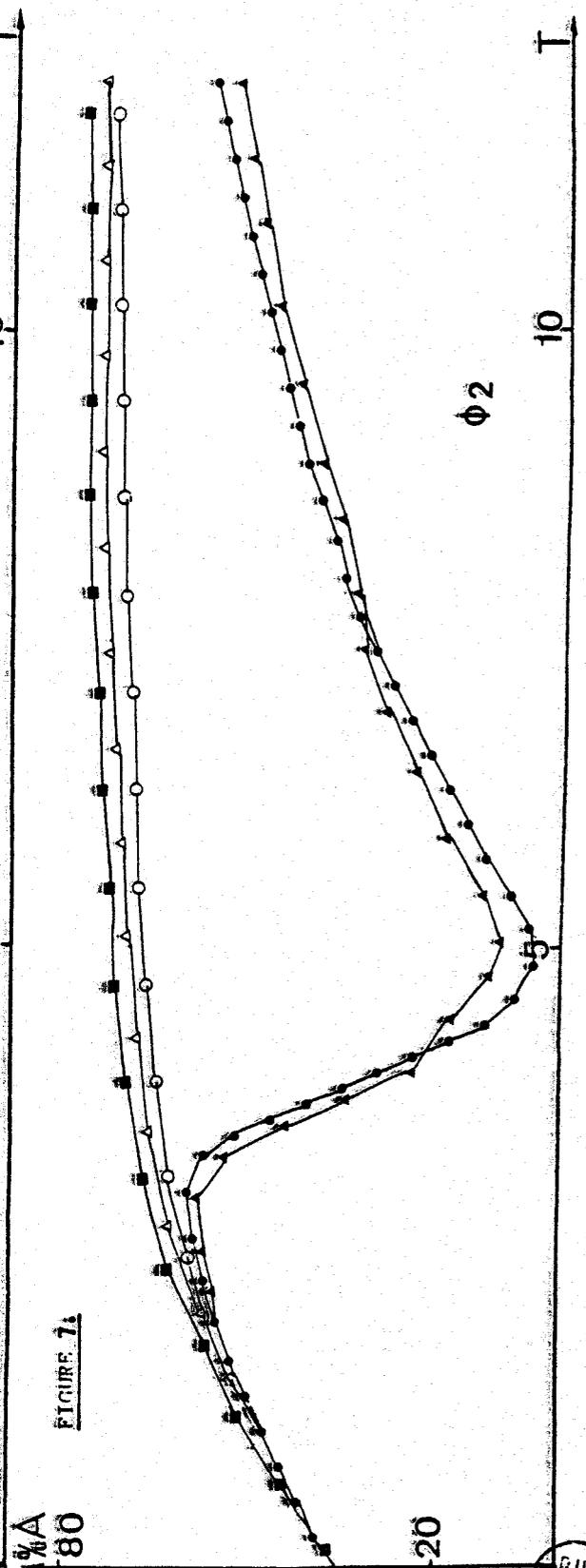
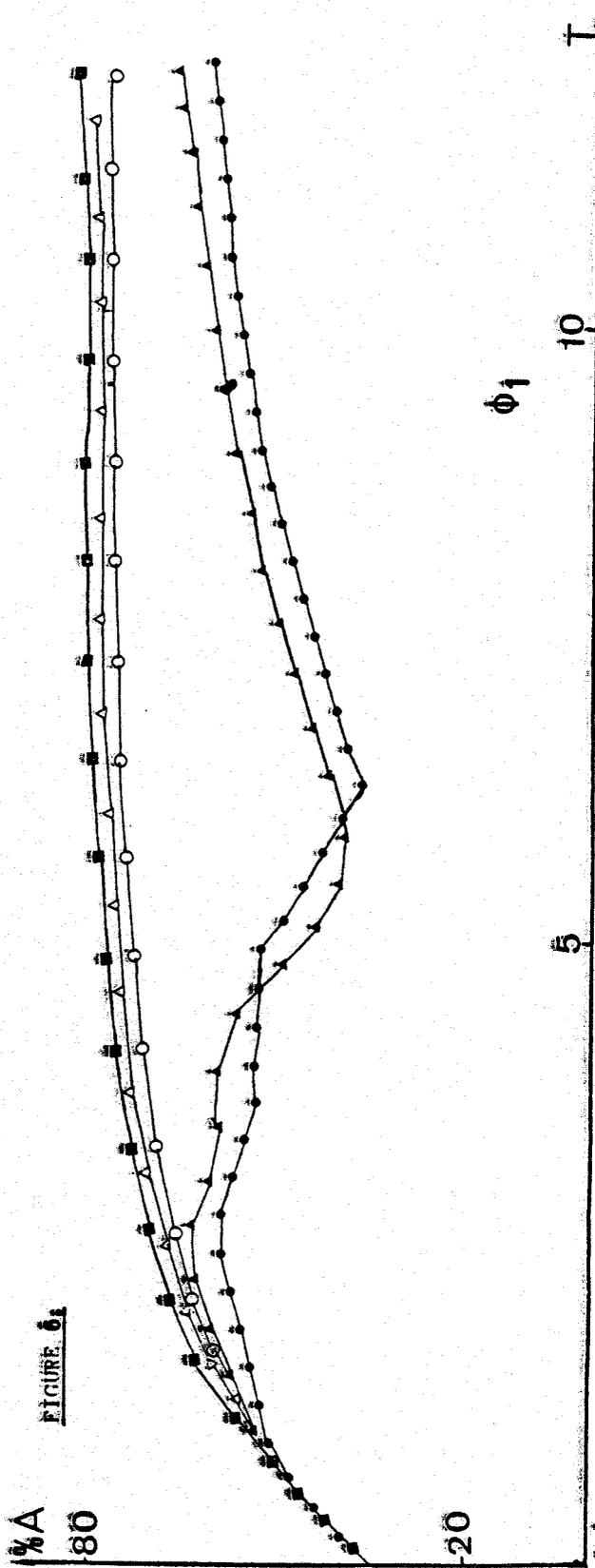
Ces deux cations sont donc indispensables à la lyse rapide de R. meliloti en milieu liquide.

Toutes les expériences sont réalisées en biophotomètre et la multiplication phagique est contrôlée par dénombrement sur milieu solide. Les résultats correspondants à cette lyse sont portés sur les figures 6 à 25 .

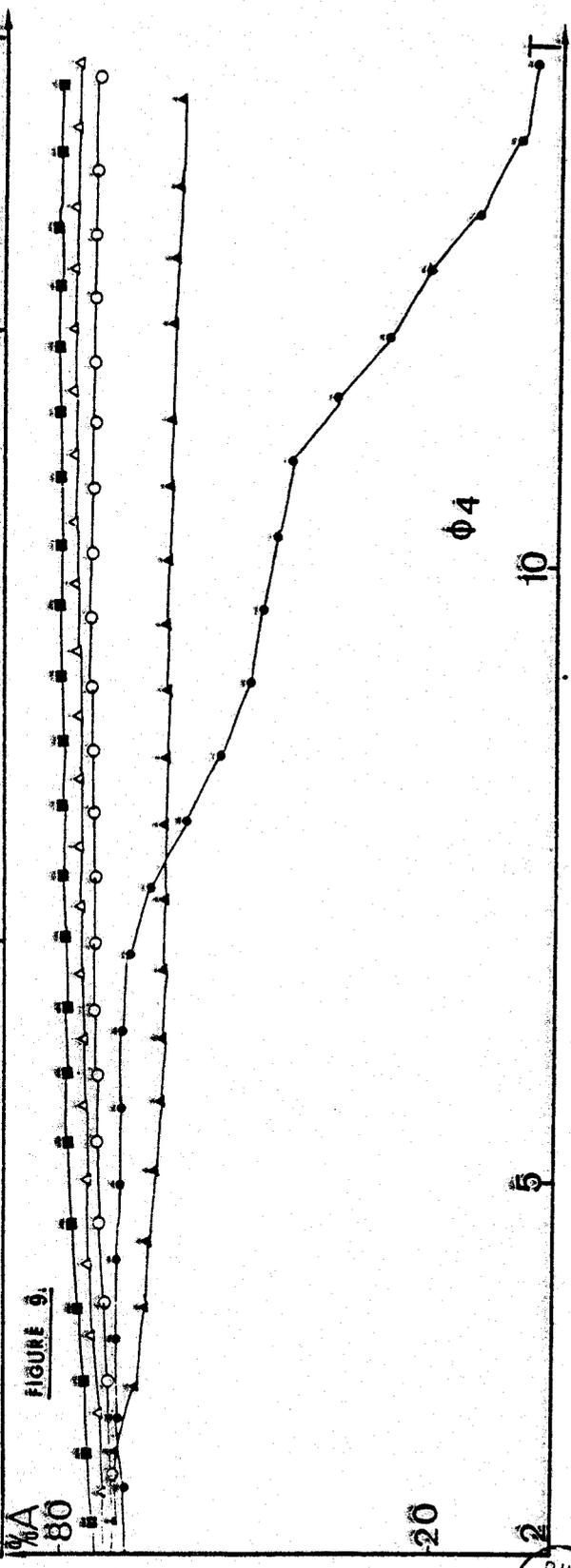
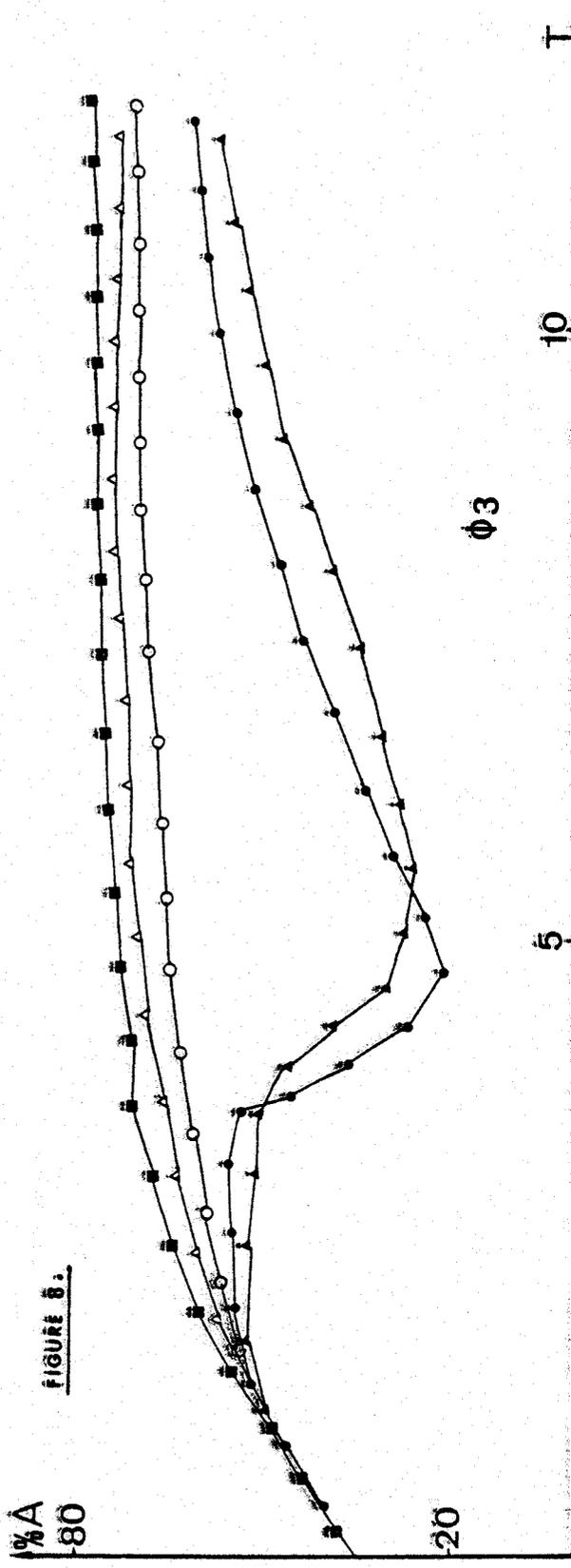
FIGURES 6 à 25 : Cinétiques de lyse en biophotomètre de cultures
de *Rhizobium meliloti* infectées par différents phages.

Légende

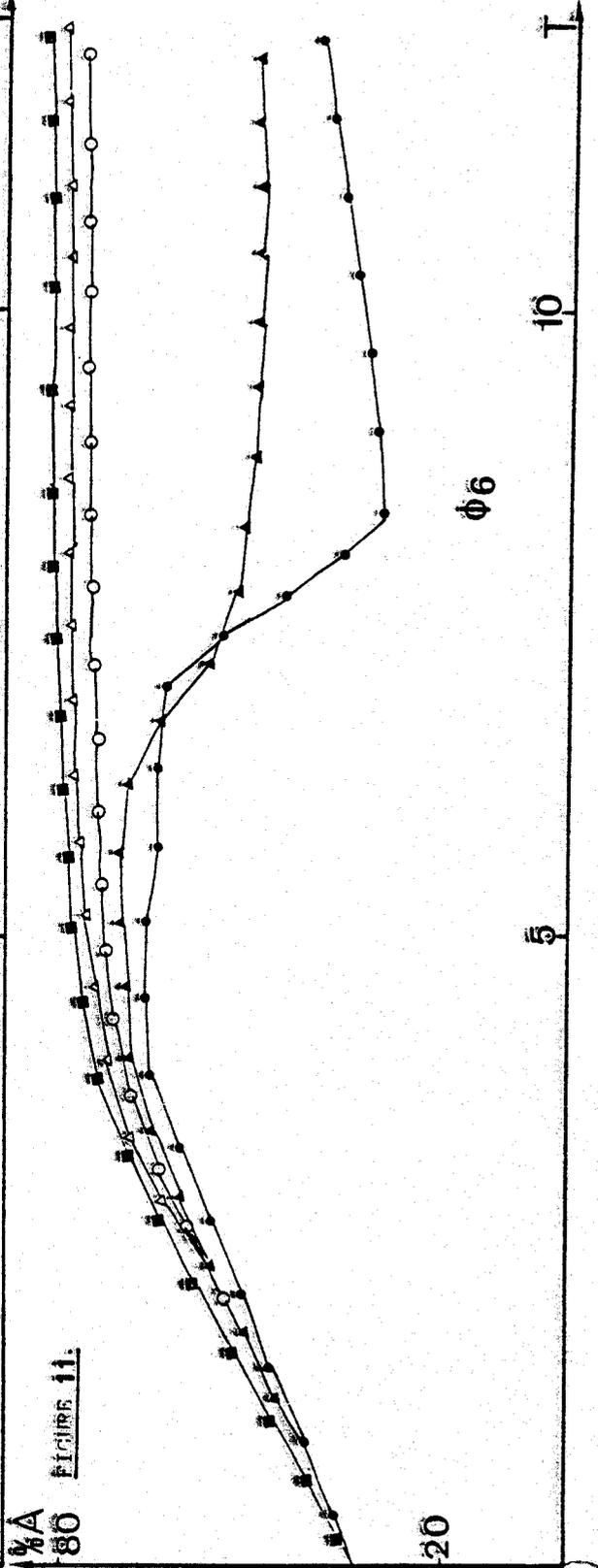
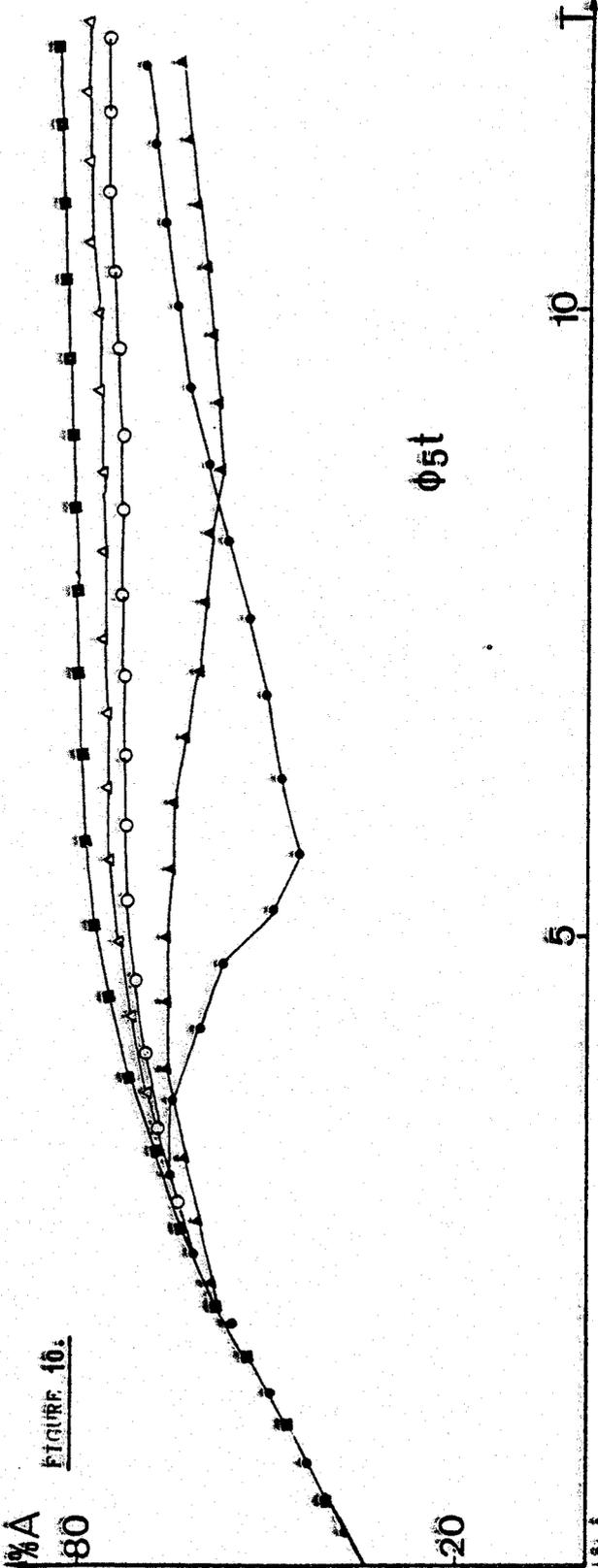
- — ■ TEMOIN (HOTE BACTERIEN)
 - △ — △ PHAGE + HOTE
 - — ○ PHAGE + HOTE + Mg^{2+} [$5 \cdot 10^{-4} M$]
 - ▲ — ▲ PHAGE + HOTE + Ca^{2+} [$4 \cdot 10^{-4} M$]
 - — ● PHAGE + HOTE + Ca^{2+} et Mg^{2+}
- % A ABSORBANCE (EN POURCENTAGE)
- T TEMPS (EN HEURES)

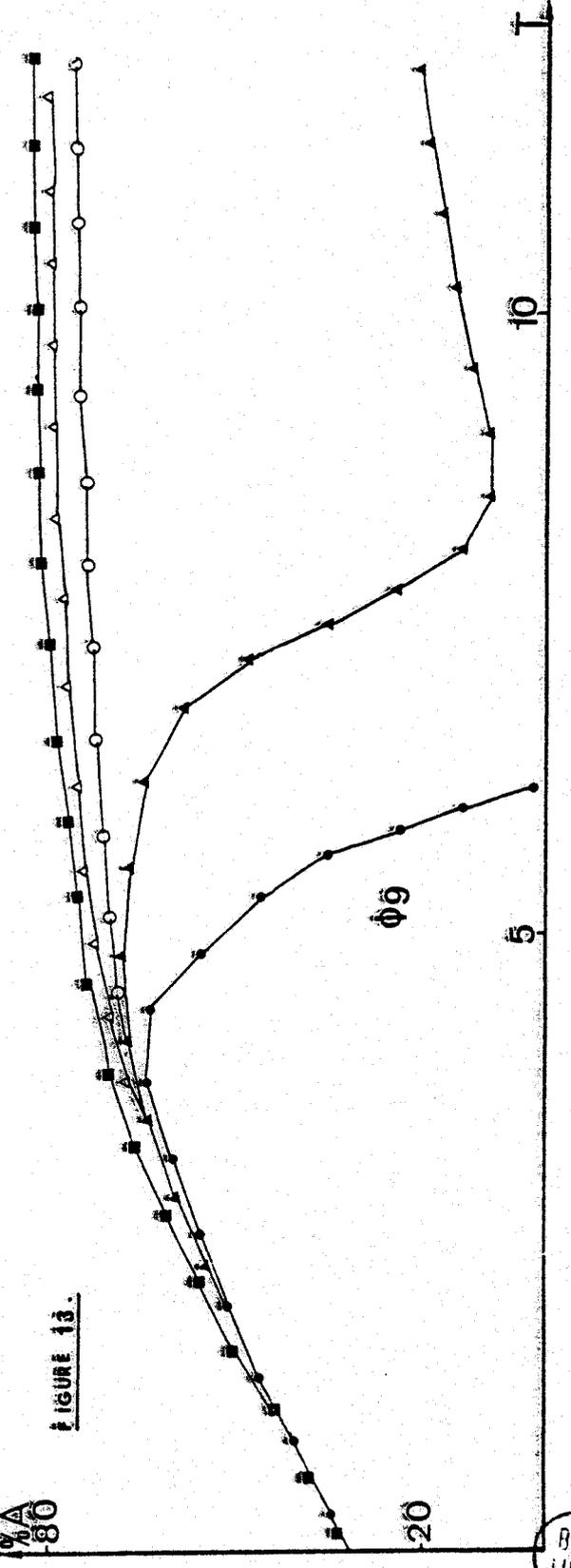
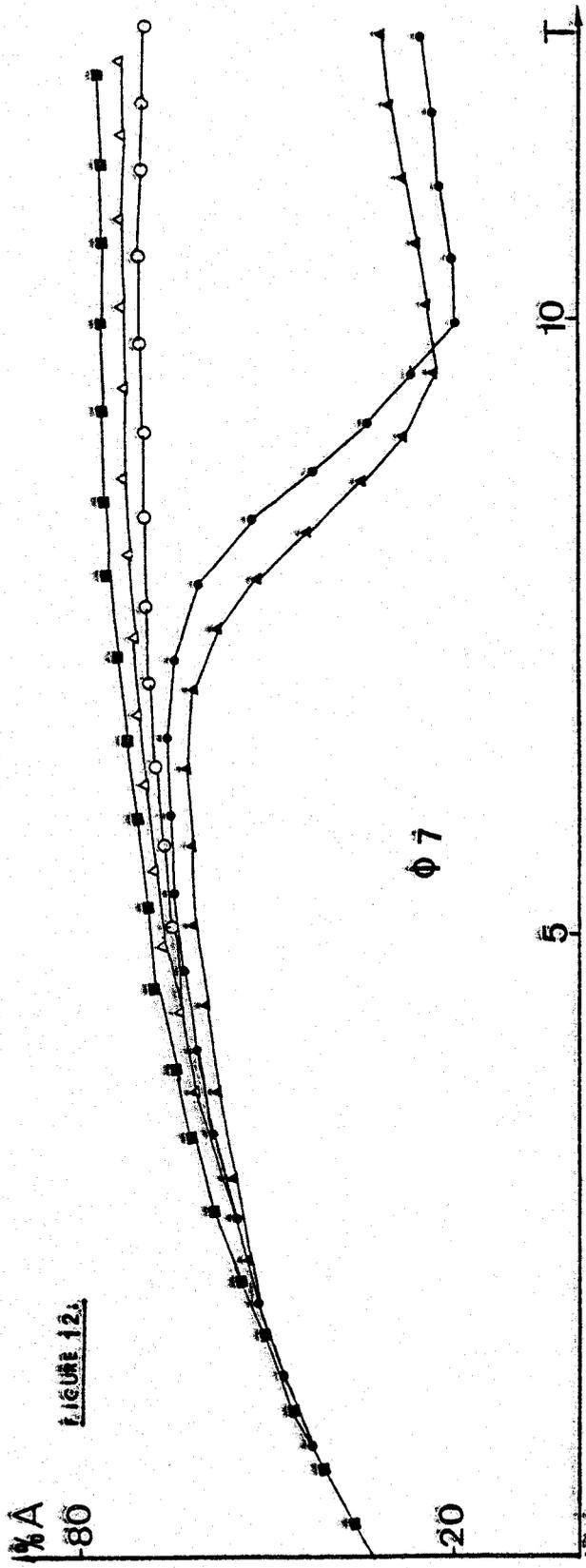


BUS
LILLE

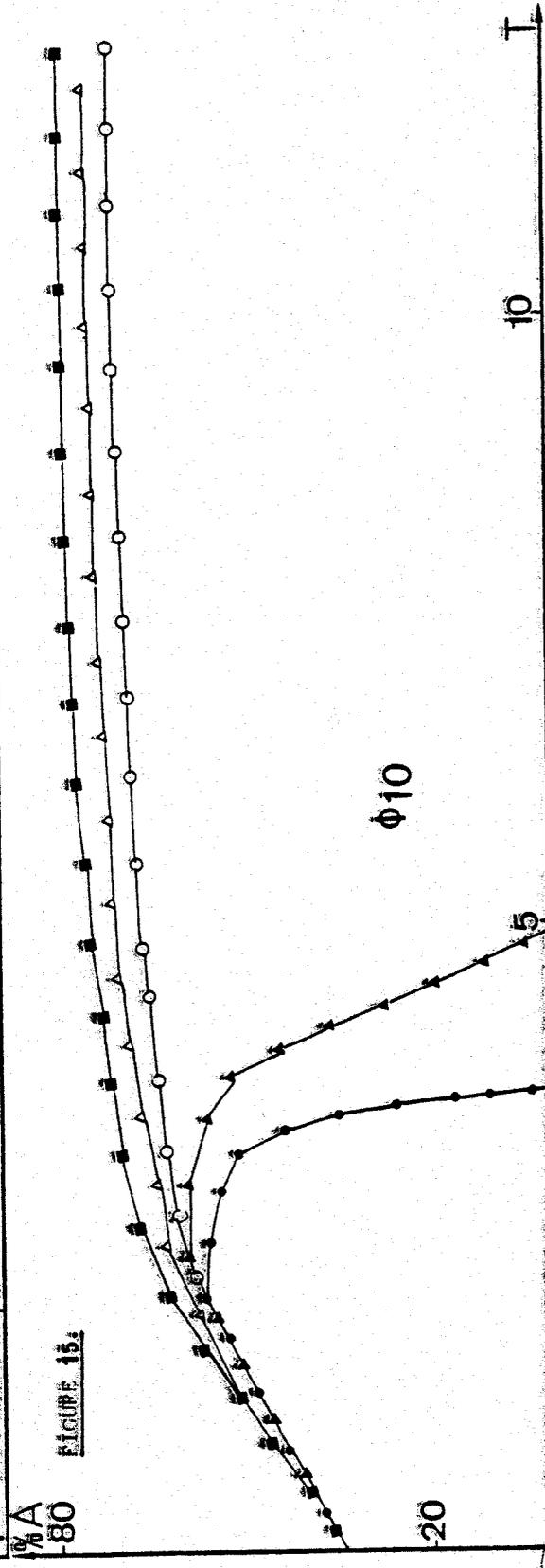
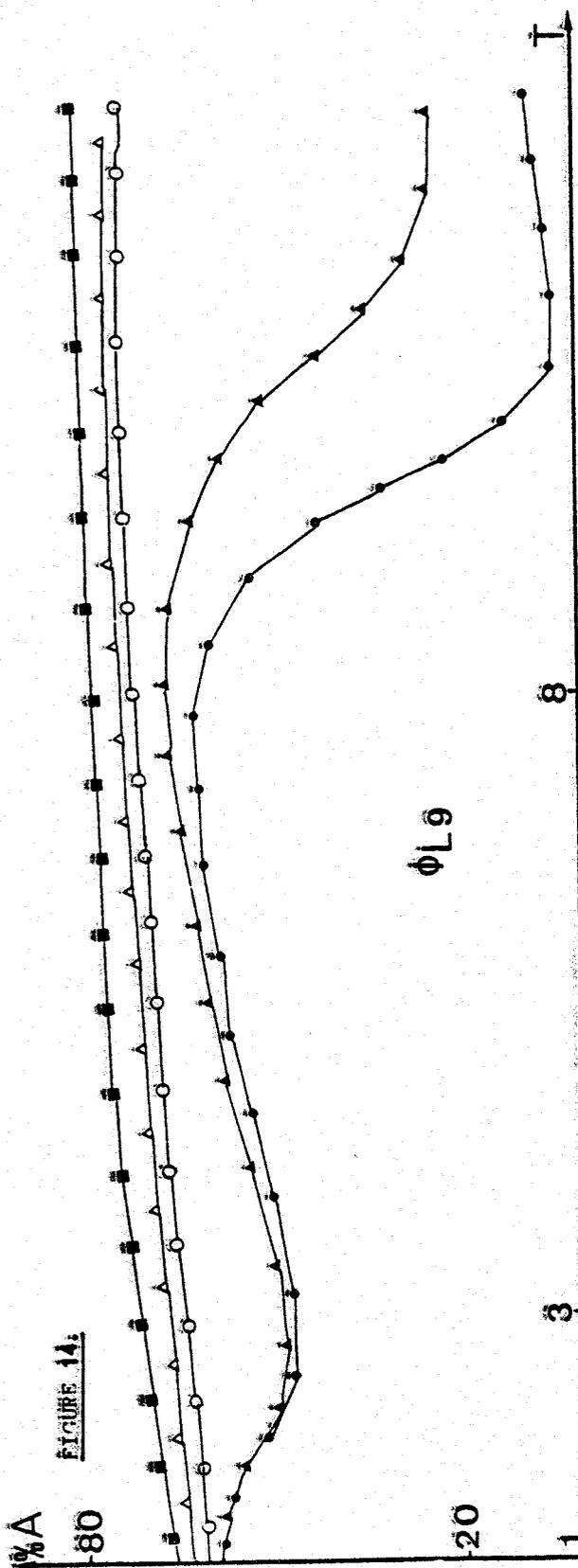


BIIS
LILLE

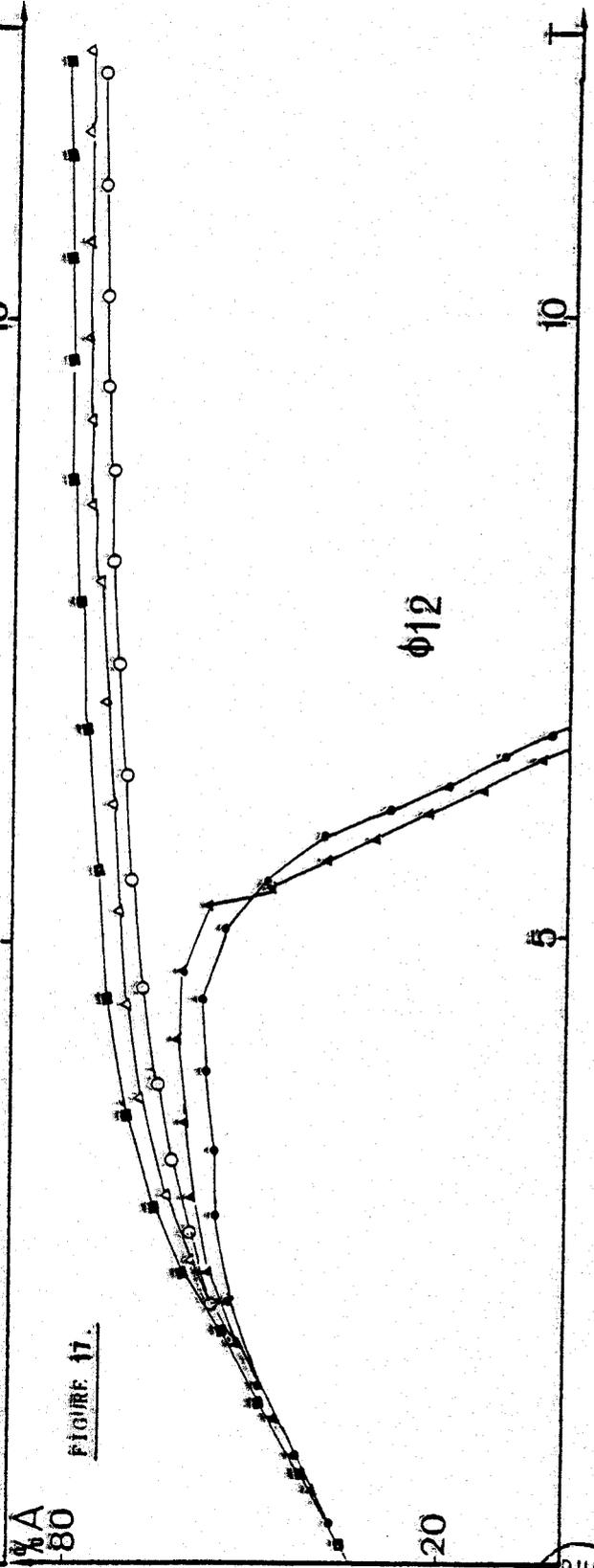
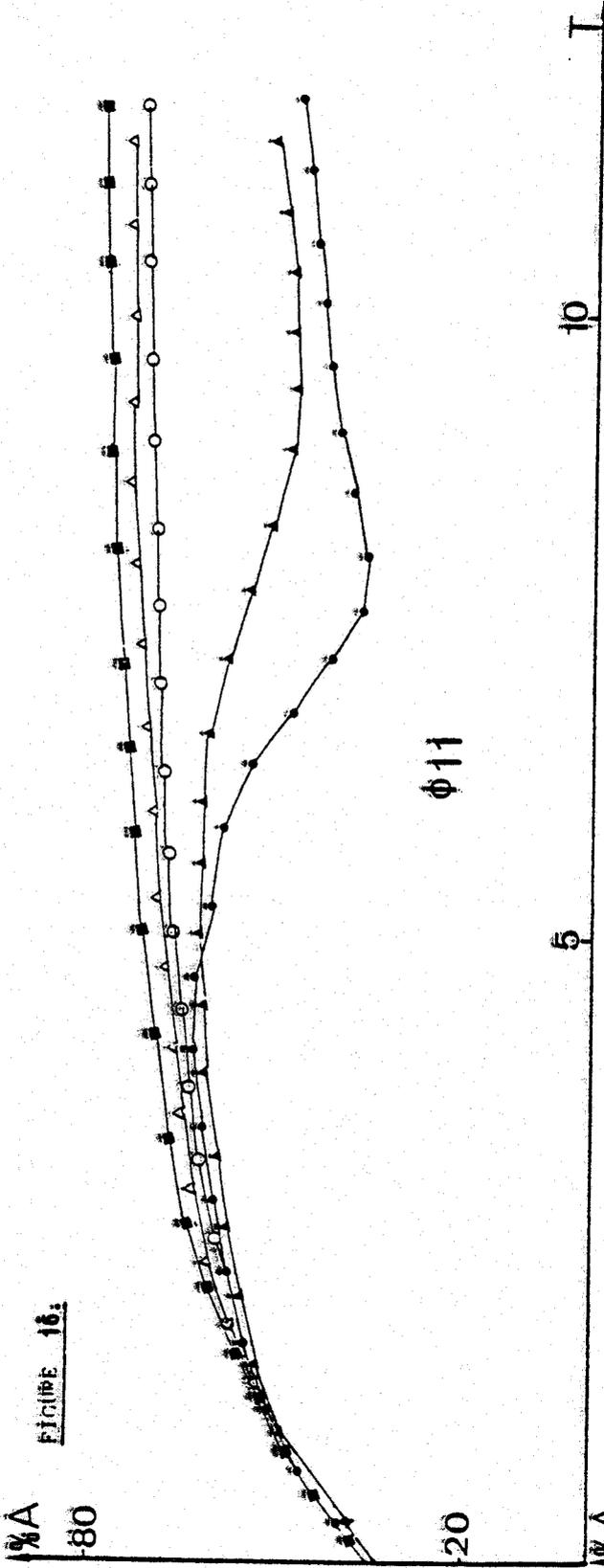


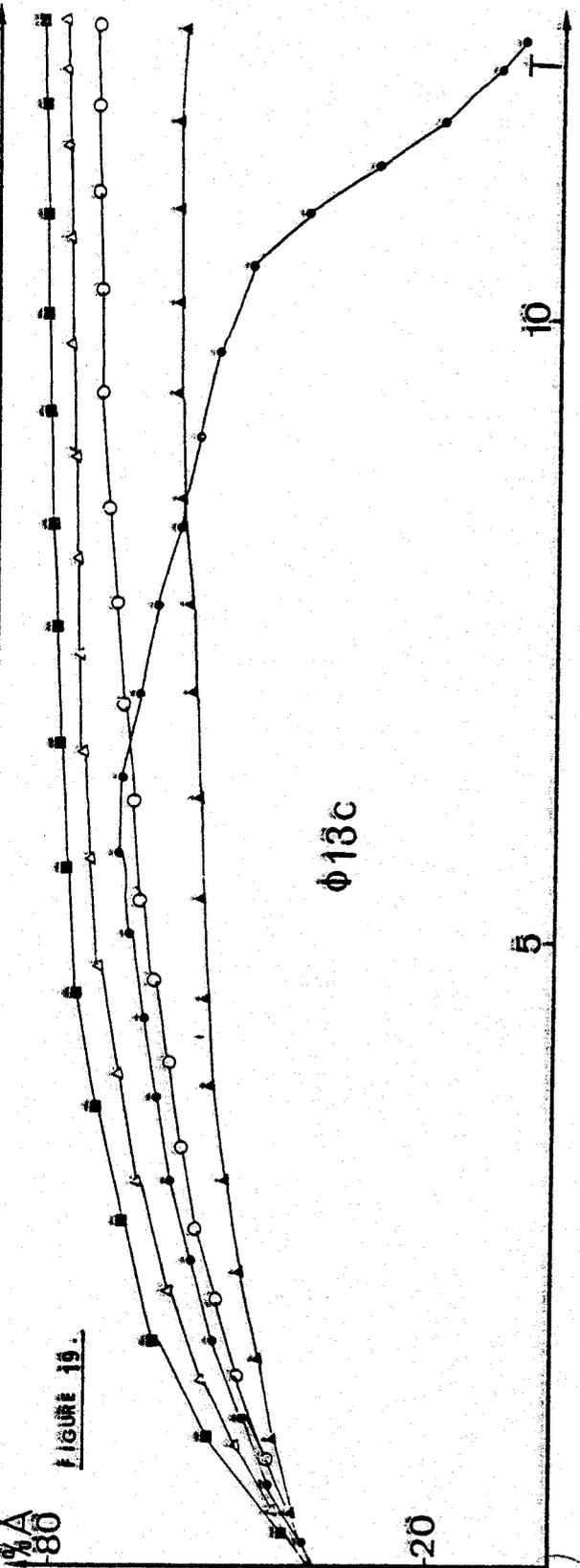
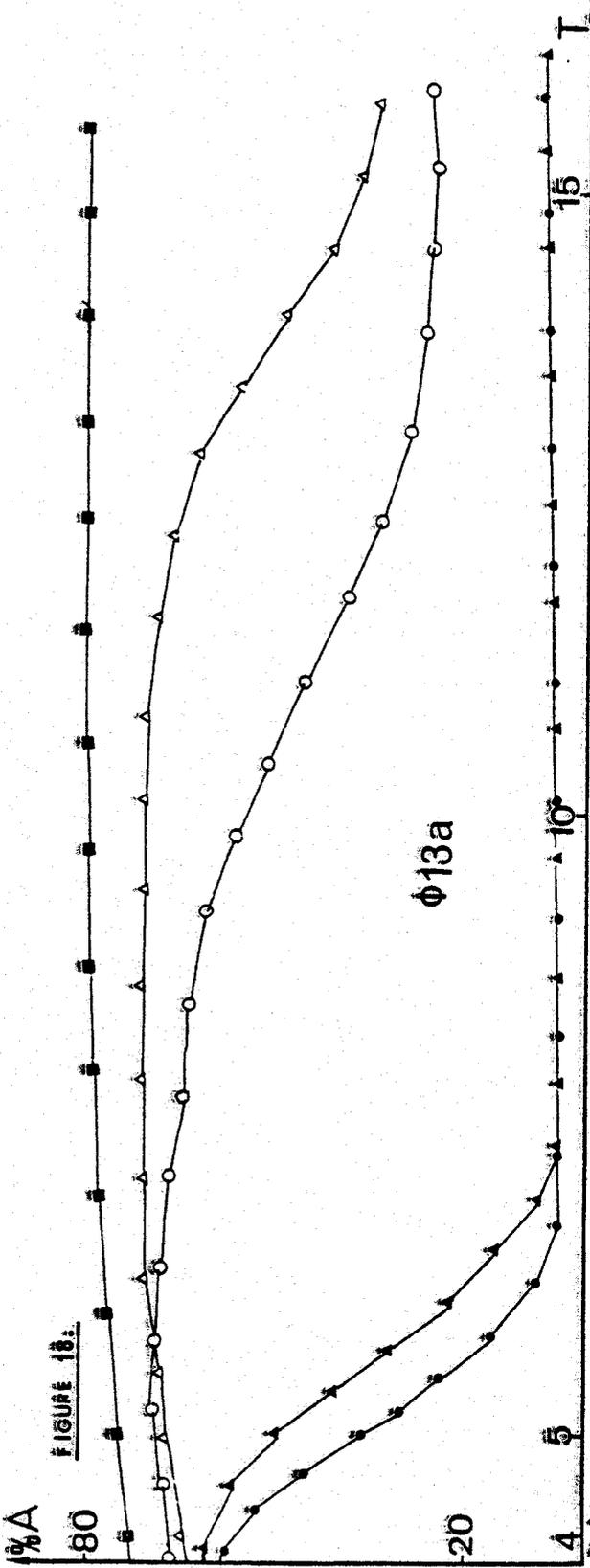


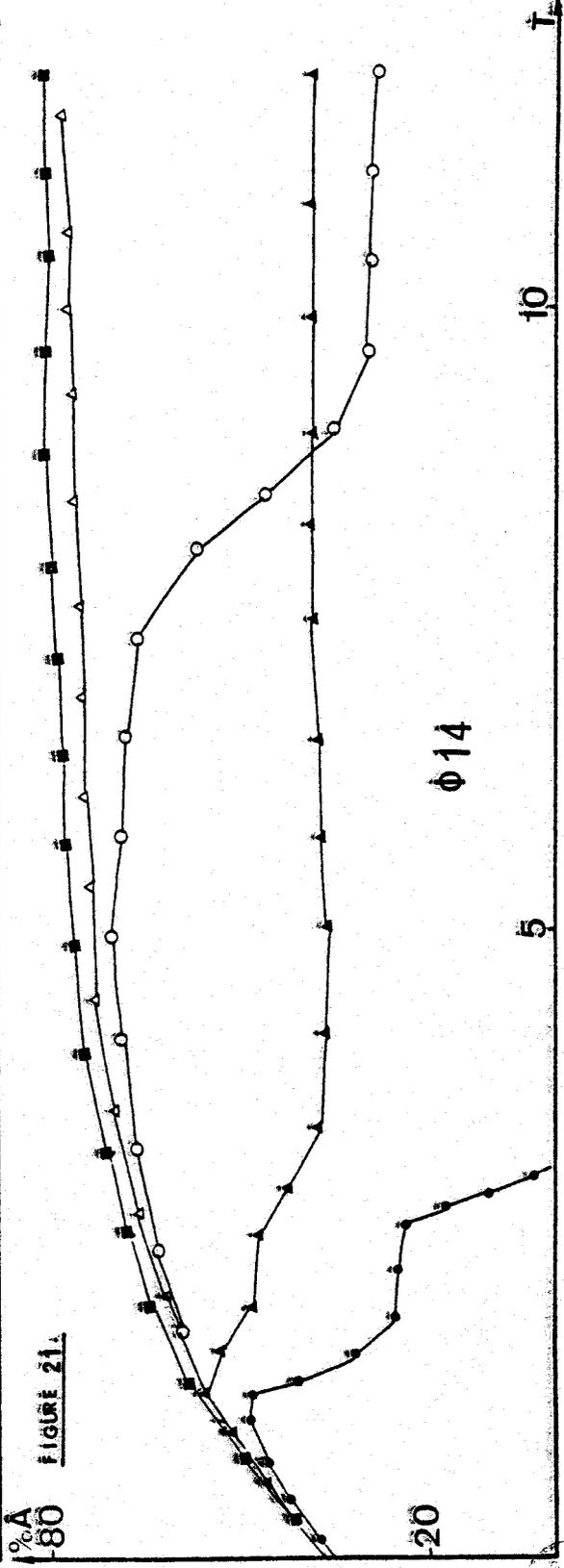
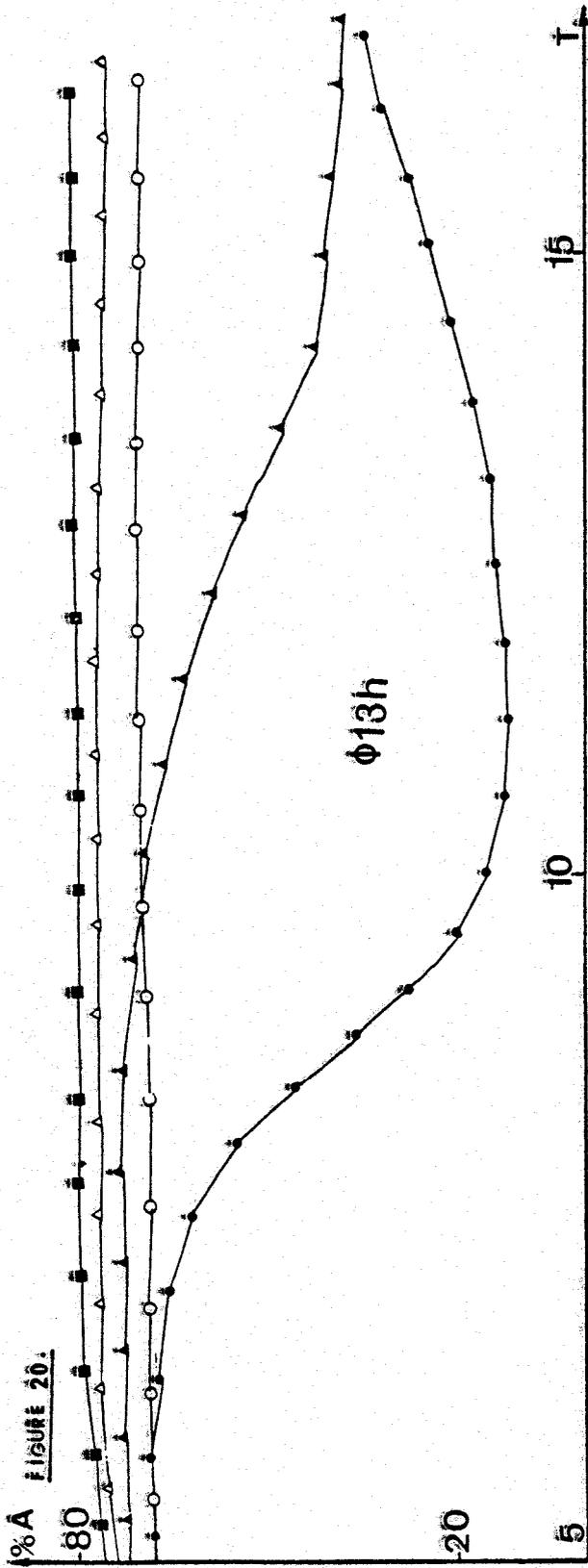
BUS
LILLE

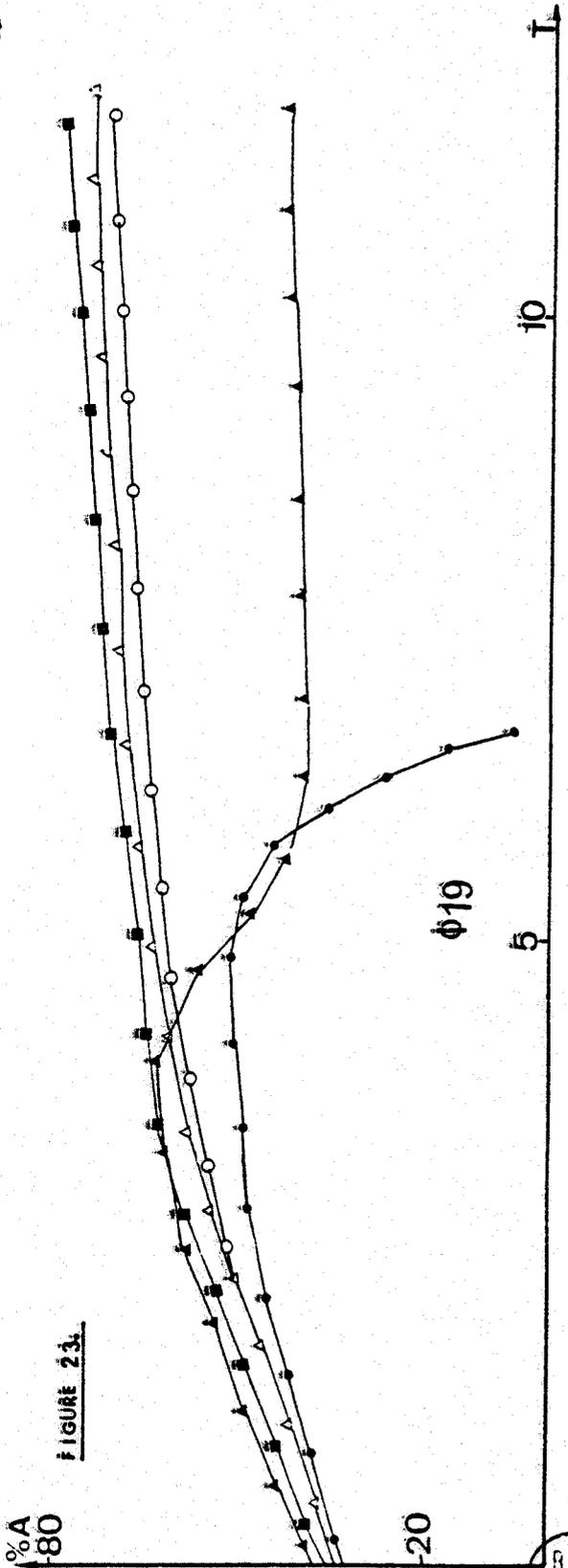
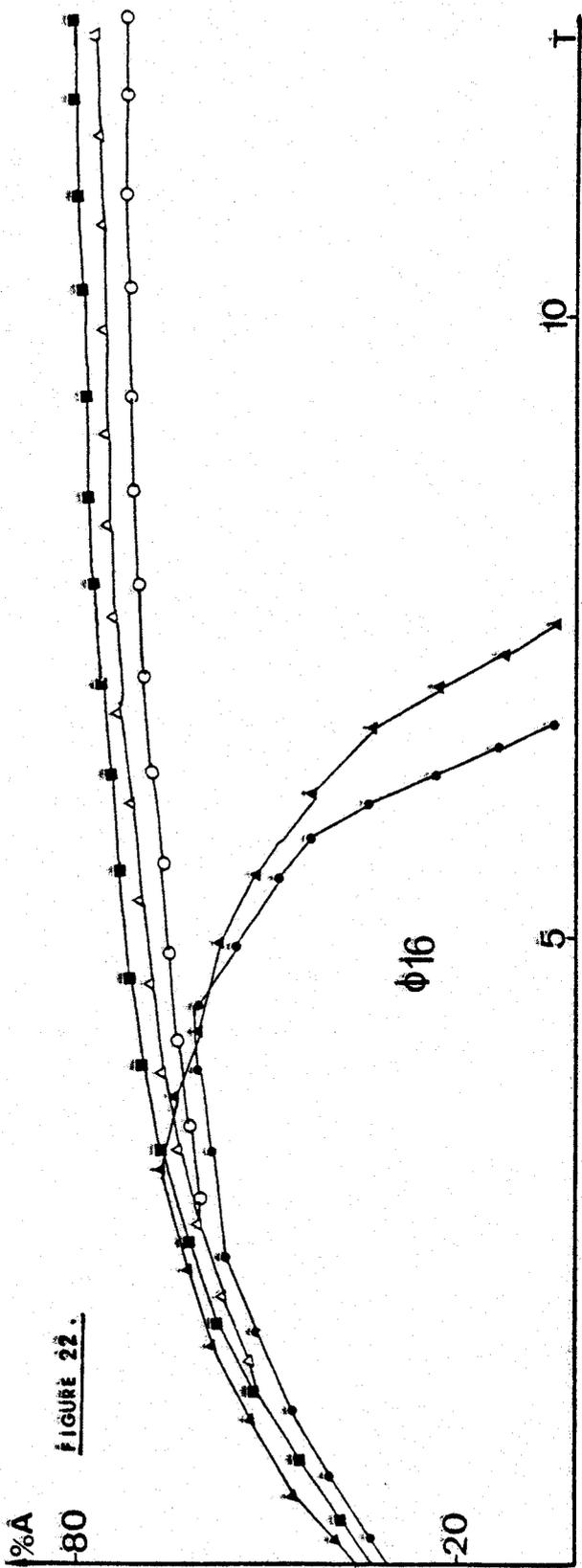


BUS TITLE

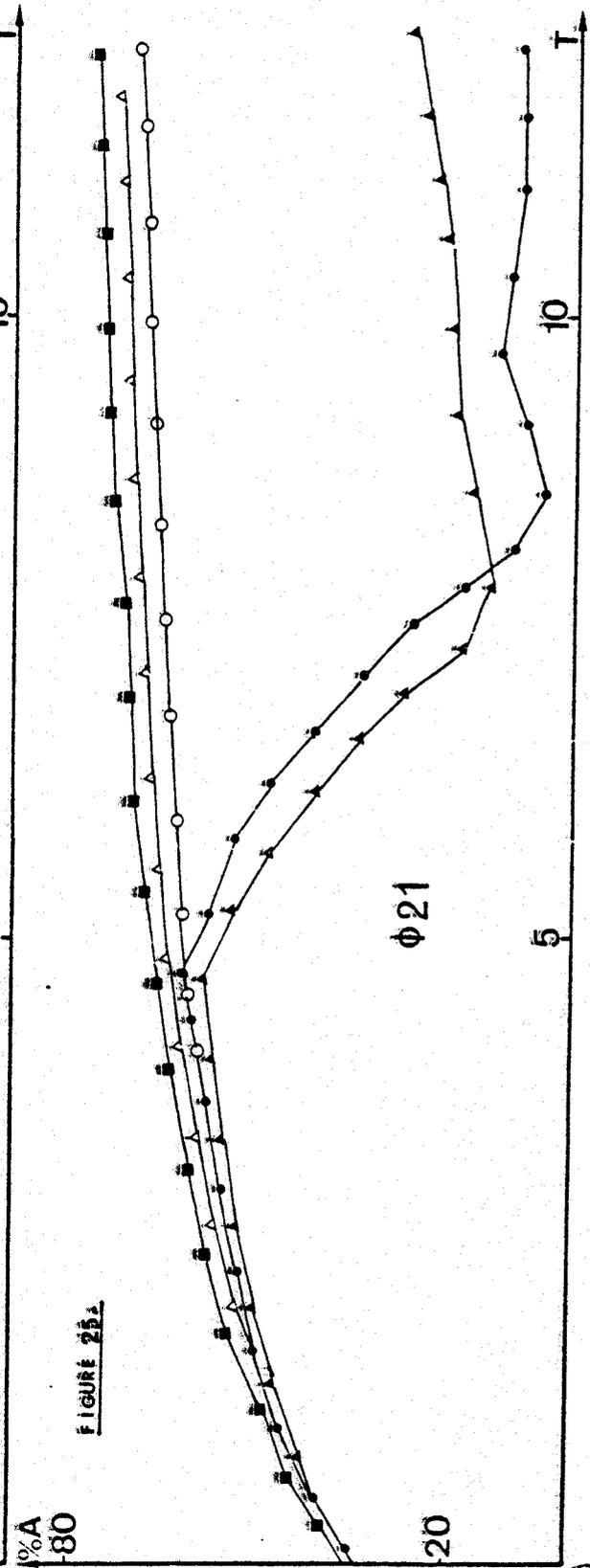
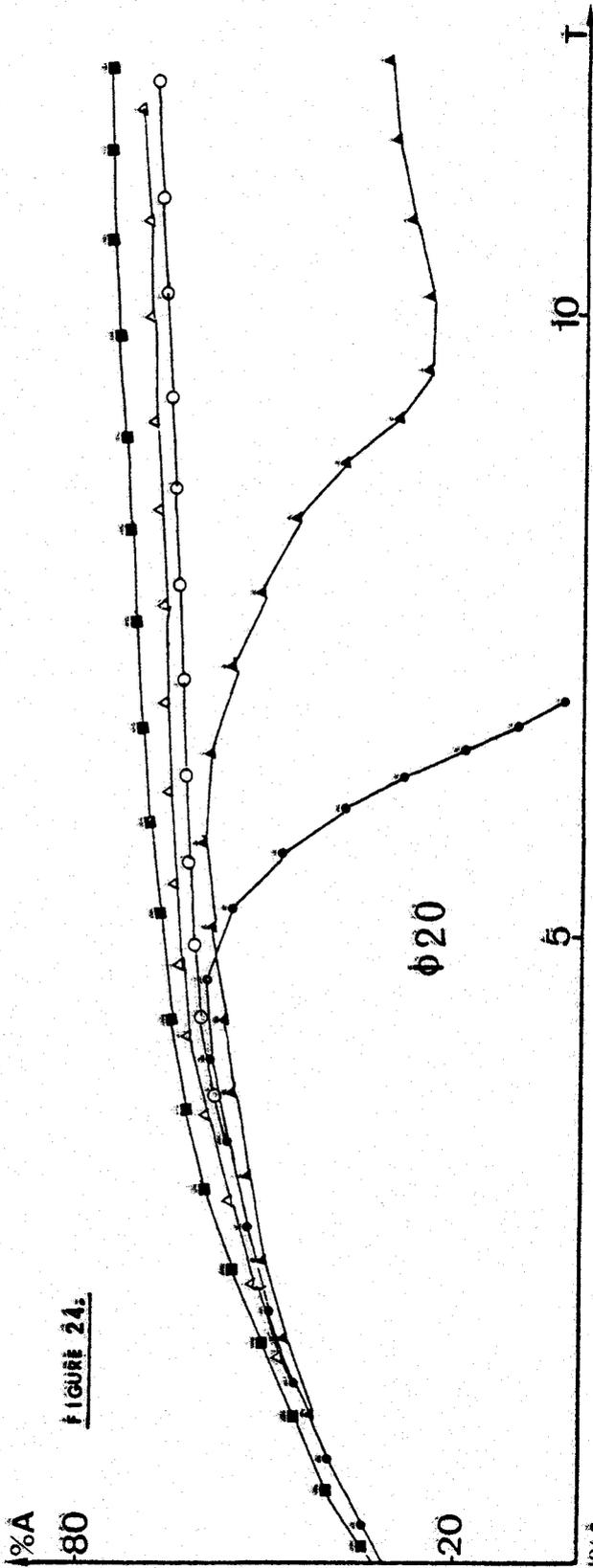








BUS LILLE



BUS
CICLE

Chapitre IV

ETUDE MORPHOLOGIQUE

DES

BACTERIOPHAGES "L. L."

Les bactériophages sont des particules aux dimensions faibles invisibles au microscope optique. Leur observation directe ne peut se faire que grâce à l'utilisation du microscope électronique.

Avant de pouvoir les observer, il faut que les suspensions virales soient concentrées. En effet, la recherche des bactériophages sur une grille porte objet ne peut se faire que si l'on respecte un nombre minimum de particules phagiques.

Pour ce faire, avant d'examiner leur morphologie, nous avons recherché une technique de concentration adéquate.

A - MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - Concentration des phages

D'après BRENNER (54), une observation convenable des virus de la taille du virus Influenza ne peut être réalisée que si le nombre de particules est de l'ordre de 10^9 à 10^{10} par ml. De même pour le Poliovirus, le titre de la suspension doit être voisin de 10^{12} particules par ml. Pour les bactériophages de R. meliloti, nous avons donc cherché à obtenir une concentration phagique de cet ordre.

1) Préparation d'un stock de phages

Un stock de phages est réalisé à partir d'une cinquantaine de boîtes de PETRIensemencées selon la technique de la double couche décrite précédemment. La gélose superficielle contenant les phages est récupérée, homo-

générisée et centrifugée à 8 800 g pendant 20 minutes. Le surnageant est passé sur filtre Millipore de porosité 0,45 μ puis 0,22 μ afin de le débarrasser du maximum d'impuretés. Le filtrat obtenu, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, contient de l'ordre de 10^9 à 10^{10} particules par ml. Il nous a donc fallu ensuite concentrer ces suspensions.

2) Techniques de centrifugation

Deux procédés peuvent être utilisés :

a - Obtention d'un culot de phages :

Cette technique consiste à centrifuger la suspension virale à 55 200 g pendant 180 minutes (à l'aide d'une ultracentrifugeuse BECKMANN L₂ 65B avec le Rotor 60 Ti). Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans 0,5 ml d'acétate d'ammonium à 1 pour 100 stérilisé par filtration. Ce stock de phages concentré est conservé à + 4° C jusqu'à l'observation.

b - Gradient de chlorure de césium :

Ce second procédé utilise un gradient préformé constitué de 4 couches de solutions de chlorure de césium de densité 1,5 - 1,6 - 1,7 et 1,8. La suspension phagique obtenue précédemment est déposée à la surface du gradient. Après 18 heures de centrifugation à 64 400 g (centrifugeuse BECKMANN L₂ 65B, Rotor SW 65-1), il est facile de repérer au sein du gradient une bande opaque au niveau de laquelle les particules phagiques sont venues se concentrer.

II - Indice de réfraction

Le gradient est récolté par le bas du tube en une vingtaine de fractions de même volume qui sont analysées au réfractomètre d'ABBE à 25° C

afin d'en connaître l'indice de réfraction. De cette valeur, on peut facilement déduire la densité relative du phage. La position du phage dans le gradient est ensuite repérée plus précisément en mettant en contact une partie aliquote de chaque fraction avec la souche bactérienne sensible. Les fractions contenant les phages sont alors dialysées pendant 18 heures contre du tampon pH 7 afin d'éliminer le chlorure de césium.

III - La coloration négative

La coloration négative, encore appelée "méthode de contraste négatif", consiste à envelopper les particules à observer d'une substance dense aux électrons de telle sorte que l'échantillon apparaisse blanc sur fond noir au microscope électronique. Cette technique permet d'avoir une vue tridimensionnelle de l'objet et d'en apprécier facilement les dimensions. Lorsque l'on veut observer un objet mesurant environ 100 \AA de diamètre, il est nécessaire d'en augmenter le contraste pour mettre en évidence ses sous unités ayant des dimensions de l'ordre de $10 \text{ à } 30 \text{ \AA}$.

Le matériau utilisé doit avoir une densité sensiblement double de celle des particules. Il doit être hautement soluble dans l'eau ; la chaleur dégagée par le bombardement électronique ne doit pas en provoquer l'évaporation.

1) Produits

Pour réaliser cette coloration, deux produits sont couramment utilisés. Il s'agit de l'acide phosphotungstique et l'acétate d'urane.

a - ~~l'acide phosphotungstique~~ (APT)

L'APT, de formule chimique $H_3PO_4 \cdot 12WO_3 \cdot nH_2O$, est employé en solution de 0,5 à 2 p. 100. Le pH de ce "colorant" étant fonction de l'échantillon à observer, il est ajusté à des pH de 5-6-6,5-6,8-7 ou 7,2 avec de la potasse 2,5 N. On utilise de façon courante une solution à 1 pour 100 de pH compris entre 6 et 7. Avant l'emploi, la solution est passée sur filtre Millipore de porosité 0,22 μ et conservée à + 4° C.

b - ~~l'acétate d'urane~~

L'acétate d'urane, de formule chimique $(CH_3 CO_2)_2 UO_2 \cdot 2H_2O$, est utilisé à des concentrations variant entre 0,5 et 1,2 pour 100 à pH 4,5. Là encore, les résultats de la coloration dépendent du type d'échantillon à observer. Avant l'emploi, la solution d'acétate d'urane est traitée comme la solution d'APT.

2) Techniques du contraste négatif

De nombreuses techniques peuvent être utilisées. Parmi celles-ci, deux ont été employées.

La première consiste à mélanger une goutte de l'échantillon à observer avec le même volume de colorant. La suspension est alors déposée sur une grille porte objet pourvue d'une membrane de parlodion (à 0,8 pour 100 dans l'acétate d'isoamyle) recouverte d'un film de carbone réalisé par évaporation sous vide (Evaporateur EDWARDS 12 E₆). Après quelques minutes, le liquide est absorbé par un papier filtre et la grille est séchée à la température ambiante. L'échantillon est ensuite observé au microscope électronique.

La seconde technique consiste à déposer la suspension de phages directement sur la grille membrannée pendant une à trois minutes. L'excès de liquide est enlevé comme précédemment et remplacé par le colorant pendant 30 à 60 secondes. L'échantillon est ensuite traité comme dans la première méthode.

Avant de mettre l'échantillon et afin de faciliter l'étalement de la suspension phagique sur la membrane de parlodion, nous avons recouvert la grille d'un mouillant constitué d'une solution d'albumine de bœuf à 0,05 p. 100 dans l'eau.

Les bactériophages capables de lyser R. meliloti en milieu liquide ont été colorés soit à l'acide phosphotungstique à 1 pour 100 pH 7 selon BRENNER et Coll. (54), soit à l'acétate d'urane à 1,2 pour 100 pH 4,5 selon BARNET (43).

B - RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

I - Densité relative des phages $\Phi 4$ et $\Phi 6$

Le premier procédé de centrifugation décrit précédemment a l'avantage d'être simple et rapide. Il permet d'obtenir une suspension de phages contenant de l'ordre de $5 \cdot 10^{11}$ particules par ml. Ce titre est suffisant pour réaliser l'observation au microscope électronique. Par contre, la seconde technique semble être plus drastique pour certains phages. En effet, la centri-

fugation en gradient de chlorure de césium ne permet pas d'obtenir les phages L.L en parfait état. Leur fragilité apparente pourrait être due à la pression osmotique exercée par le chlorure de césium. Cependant, ce procédé est utile pour déterminer la densité relative du virus à étudier, comme l'indique le tableau IX.

Fractions	Indice de réfraction	Repérage du phage $\Phi 4$ sur $M_{11}S$	Indice de réfraction	Repérage du phage $\Phi 6$ sur $M_{11}S$
1	1,4007	-	1,4007	-
2	1,3993	-	1,3999	-
3	1,3971	-	1,3980	-
4	1,3932	-	1,3950	-
5	1,3943	-	1,3932	-
6	1,3912	-	1,3911	-
7	1,3885	++	1,3864	+
8	1,3850	+++	1,3837	+++
9	1,3846	++	1,3814	+++
10	1,3808	-	1,3780	-
11	1,3768	-	1,3752	-
12	1,3753	-	1,3729	-
13	1,3729	-	1,3701	-
14	1,3712	-	1,3684	-
15	1,3692	-	1,3673	-
16	1,3680	-		
17	1,3666	-		

TABLEAU IX : Position et indices de réfraction des phages $\Phi 4$ et $\Phi 6$ après centrifugation en gradient de chlorure de césium.

Des résultats obtenus pour les fractions n° 7, 8 et 9, on peut facilement déduire la densité relative \bar{d} des 2 phages :

- pour le phage $\Phi 4$: $1,531 < \bar{d} < 1,582$

- et pour le phage $\Phi 6$: $1,506 < \bar{d} < 1,550$

II - Observation des bactériophages L.L.

Elle a été réalisée au microscope électronique (HITACHI HU12, 75 KV). L'aspect des particules phagiques (planches I et II et tableau X), permet de les placer dans les deux premiers groupes de la classification de BRADLEY (55) (A = queue contractile, B = queue non contractile). Aucun représentant du groupe C (phage sans queue) n'a été mis en évidence parmi les phages L.L.

Phages (L.L.)	Groupe	Type	Diamètre de la tête en Å	Longueur de la queue en Å
$\Phi 5$ t	A	Contractile	950	925
$\Phi 6$	A	Contractile	860	1 000
$\Phi 9$	A	Contractile	850	935
$\Phi 11$	A	Contractile	565	915
$\Phi 12$	A	Contractile	820	955
$\Phi 4$	B	Non contractile	600	1 200
$\Phi 7$	B	Non contractile	1 360	2 000

TABLEAU X : Dimensions des bactériophages capables de lyser R. meliloti en milieu liquide (L.L.)

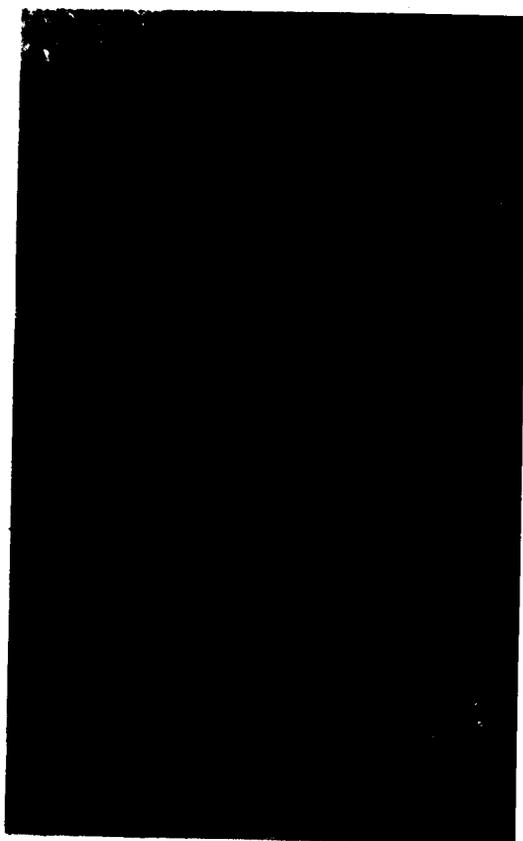
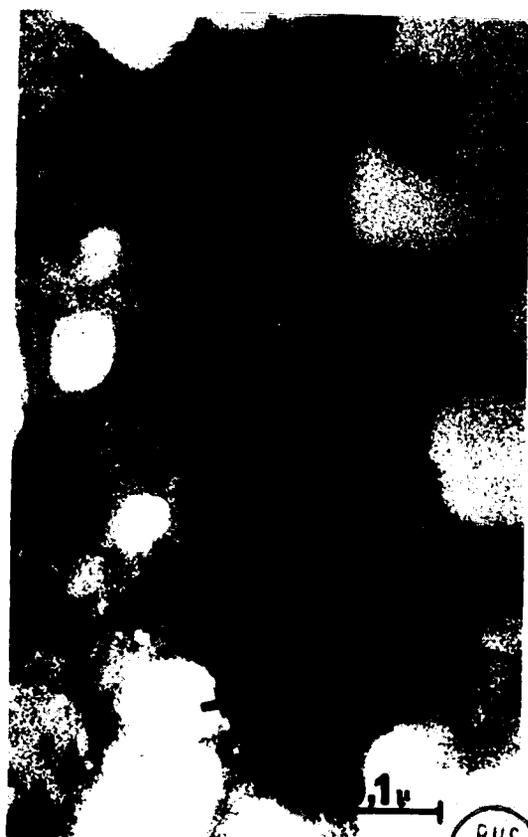


PLANCHE 1



1



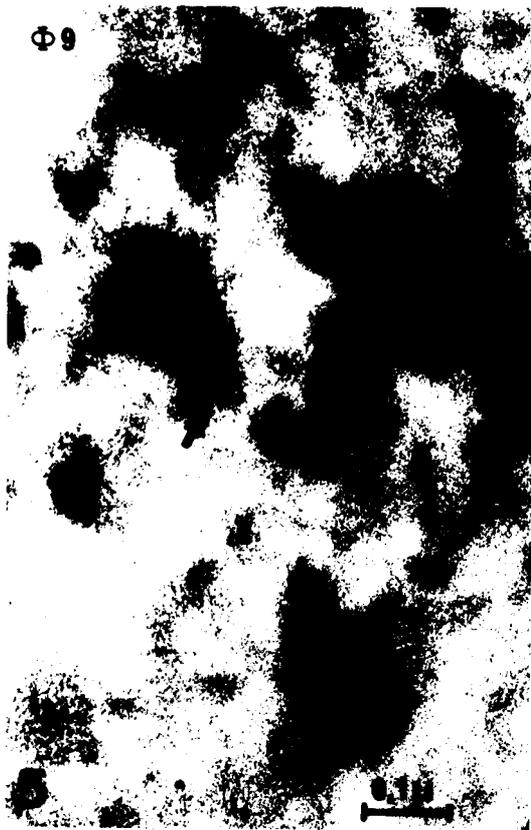


PLANCHE 2



Les photographies des planches 1 et 2 montrent à l'évidence la fragilité des structures de ces particules. En effet, malgré l'extrême soin apporté à la préparation des échantillons, de nombreux phages sont abimés. Toutes ces observations ont été réalisées après coloration à l'acide phosphotungstique. Dans ce cas, les phages apparaissent blancs sur fond noir. Nous pouvons voir que sur la photographie n° 1 ($\Phi 4$) et n° 3 ($\Phi 7$) de la planche 1, certaines têtes de phages sont noires. Il s'agit de têtes éclatées dans lesquelles le colorant a pénétré. Sur les photographies 3 ($\Phi 7$) et 4 ($\Phi 6$), on voit très nettement les têtes détériorées (flèches). Sur les photographies 2 ($\Phi 5t$) et 4 ($\Phi 6$) de la planche 1, on observe des particules à queue contractée. Il en est de même sur la planche 2, photographie 5 ($\Phi 9$). Sur cette image, on voit nettement apparaître la partie centrale de la queue contractée (flèches). Sur la photographie n° 6 ($\Phi 11$), on peut observer également des têtes et des queues isolées. Ce phage semble l'un des plus fragiles ; les têtes sont ici éclatées.

Enfin, la photographie 7 ($\Phi 12$) montre trois particules intactes et quelques queues isolées. On note également la présence de têtes complètement vidées de leur contenu (flèches).

Chapitre V

ETUDE DE LA SPECIFICITE D' HOTES DES PHAGES DE RHIZOBIUM MELILOTI

Un bactériophage ne peut se multiplier qu'au détriment de certains clones d'une même espèce bactérienne. Cette affinité pour ces souches traduit une particularité de ce phage.

L'inventaire des souches sensibles au virion constitue donc une sorte de spectre de sensibilité caractéristique.

Les causes pour lesquelles un phage est inactif sont de différents types. Il se peut que la bactérie soit simplement résistante au phage parce que celui-ci ne peut pas s'adsorber sur la paroi bactérienne en raison de l'absence de sites moléculaires complémentaires de fixation.

Cependant, si le virion est adsorbé, il injectera son matériel génétique dans la cellule hôte. Lorsqu'il s'agit d'ADN deux phénomènes peuvent cependant empêcher son expression :

- ou bien, l'ADN viral est intégré dans le chromosome bactérien sans autre manifestation, c'est la lysogénisation. Le phage est devenu tempéré et pourra redevenir virulent sous l'action d'activateurs tels que les rayons ultra-violetts ;

- ou encore, l'ADN parasite est détruit dans le cytoplasme de la bactérie par des endonucléases que l'on appelle aussi enzymes de restriction. Toutefois pour une population phagique mise en présence de bactéries restrictives, ce phénomène est souvent partiel. Une certaine proportion de virions subissent des modifications de leur ADN et peuvent s'exprimer car ils échappent alors à la restriction.

L'ensemble des phénomènes qui permettent ou non à un phage de se multiplier sur certaines souches bactériennes constitue la spécificité d'hôtes.

Nous avons mis en contact tous les phages de notre collection avec un certain nombre de souches de R. meliloti dans le but de tenter de les grouper en fonction de leur spécificité d'hôtes. Dans certains cas, nous avons étudié plus particulièrement des systèmes phages-bactéries qui semblaient présenter des phénomènes comparables à la restriction.

A - MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - Préparation des stocks de phages

Ils ont été réalisés sur milieu R C gélosé selon la technique de la double couche décrite précédemment.

II - Conservation des stocks de phages

Du glycérol stérile est ajouté volume à volume aux suspensions de phages. Les stocks phagiques sont ensuite conservés à -20° C.

III - Recherche de la spécificité d'hôtes

Chaque phage de la collection est mis en présence de 28 clones différents de R. meliloti.

Une culture bactérienne sous un volume de 0,3 ml en phase exponentielle de croissance en milieu R C fructosé à 1 pour 100 est additionnée

de 3 ml de gélose, homogénéisée et coulée à la surface d'un milieu R C gélose, fructosé à 1 p. 100 et vitaminé.

Après solidification, chaque boîte de PETRI ainsiensemencée avec une souche différente de R. meliloti reçoit deux gouttes d'une suspension de phages. L'efficacité des phages est déterminée après 18, 24 et 48 heures d'incubation à 25° C :

- Si la bactérie se développe normalement et forme un tapis, le phage n'est pas actif sur la souche concernée ; le résultat est noté (-).
- S'il y a présence de plages de lyse nombreuses et coalescentes au sein du tapis bactérien, le phage est actif, le résultat est noté (+).
- Dans certains cas, la lyse est moins nette, les plages sont troubles (T) ou bien il n'apparaît que quelques plages de lyse (gp).

IV - Détermination du coefficient d'efficacité d'étalement

Ce coefficient est donné par le rapport entre le nombre de phages par ml (de la suspension), déterminé par dénombrement sur la souche bactérienne à étudier et celui obtenu par dénombrement effectué sur la souche la plus sensible.

Par exemple : Le phage Φ 13a a pour hôte habituel Rhizobium meliloti M₁₄S. Il est toujours reproduit sur cette souche. S'il est numérisé sur M₁₄S, on obtient un titre de X phages par ml. Si maintenant, on infecte une autre souche de Rhizobium meliloti avec Φ 13a, on obtient Y phages par ml. Le coefficient d'efficacité de Φ 13a sur cette deuxième souche sera égal au rapport $\frac{Y}{X}$.

B - RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

I - Conservation des stocks en milieu glycérolé

Les effets de la conservation des phages en bouillons glycérolés à 20° C ont été étudiés à partir de suspensions dont les titres sont données dans le tableau suivant :

PHAGES	PHAGES/ML	PHAGES	PHAGES/ML
Φ 1	2,6.10 ⁹	Φ 11	0,1.10 ⁹
Φ 2	2,4.10 ⁹	Φ 12	0,6.10 ⁹
Φ 3	4,8.10 ⁹	Φ 13a	8,5.10 ⁹
Φ 4	0,2.10 ⁹	Φ 13c	5,1.10 ⁹
Φ 5t	0,6.10 ⁹	Φ 13h	3,5.10 ⁹
Φ 6	0,3.10 ⁹	Φ 14	4,0.10 ⁹
Φ 7	1,7.10 ⁹	Φ 16	0,2.10 ⁹
Φ 9	0,1.10 ⁹	Φ 19	0,5.10 ⁹
Φ 19	0,6.10 ⁹	Φ 20	0,1.10 ⁹
Φ 10	0,6.10 ⁹	Φ 21	0,8.10 ⁹

TABLEAU XI : Titres des stocks de phages

Après un séjour plus ou moins long à - 20° C, les stocks de phages sont dénombrés.

Le tableau XII présente les résultats obtenus après un séjour de 48 heures à - 20° C pour quelques phages.

Phages	$\Phi 4/M_{11}S$	$\Phi 6/M_{11}S$	$\Phi 9/M_{11}S$	$\Phi 12/M_{11}S$	$\Phi 20/M_{11}S$
Dénombrements					
Avant conservation	$2,5 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^9$	$3,7 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$
Après conservation de 48 heures	$2,5 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^9$	$3,54 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$
Taux de perte	0 %	0 %	0 %	4,4 %	0 %

TABLEAU XII : Dénombrement des bactériophages de *R. meliloti* après conservation de 48 heures en milieu glycérolé.

Comme nous pouvons le constater, la conservation pendant 48 heures en bouillon glycérolé affecte peu la concentration virale. Seul le titre du stock du $\Phi 12$ subit une baisse de 4 %. Les autres stocks ont des titres inchangés.

Nous avons été amené à dénombrer les suspensions phagiques après des séjours beaucoup plus long à - 20°. D'une manière générale, on peut dire que les titres diminuent d'une puissance de 10 par année de conservation. Cette technique de conservation est donc sûre et facile à mettre en œuvre.

II - Détermination de la spécificité d'hôte des phages de
Rhizobium meliloti

Les résultats de cette étude sont portés dans le tableau XIII.

Nous pouvons suggérer de classer ces virus en trois catégories :

- 1) Les phages ayant une étroite spécificité d'hôtes :

Ils sont actifs sur un petit nombre de souches de Rhizobium meliloti. Nous citerons les phages $\Phi 13c$, $\Phi 1$, $\Phi 2$, $\Phi 3$, $\Phi L9$ et $\Phi 13H$.

- 2) Les phages peu spécifiques :

Ils sont actifs sur un grand nombre de souches bactériennes.

Ce sont les phages : $\Phi 11$, $\Phi 6$, $\Phi 20$, $\Phi 10$, $\Phi 21$, $\Phi 7$, $\Phi 14$, $\Phi 16$ et $\Phi 19$.

- 3) Les phages a spécificité d'hôte intermédiaire :

Il s'agit des phages : $\Phi 12$, $\Phi 13a$, $\Phi 9$, $\Phi 4$ et $\Phi 5t$.

Nous avons essayé d'approfondir l'étude du comportement des bactériophages en effectuant des numérations de quelques uns d'entre-eux sur différentes souches de Rhizobium meliloti. Elles ont été choisies en fonction du fait qu'elles sont sensibles au phages, insensibles ou qu'elles ne permettent que l'apparition de plages troubles ou seulement en nombre très restreint.

Le tableau XIV donne les coefficients d'efficacité d'étalement des phages $\Phi 10$, $\Phi 5t$ et $\Phi 13a$ sur les clones de Rhizobium meliloti $M_{11}S$, $M_{12}S$, $M_{13}S$, $M_{14}S$ et $M_{20}S$.

SOUCHES DE RHIZOBIUM MELLIOTI

	M2 S	M3 S	M5 S	M5N1	M9 S	M10 S	M11 S	M12 S	M13 S	M14 S	M15 S	M18 S	M19 S	M20 S	M22 S	M23 S	M26 S	M27 S	M28 S	L5(L5)	L5-30	LB1	LS2A	LS1B	LS5B	LS51B	2011 Str S	2011 Str F	
01	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	qp	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
051	-	+	qp	-	-	-	-	+	-	-	-	+	qp	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
06	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
07	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
09	-	-	qp	qp	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
019	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
010	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	qp	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
011	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	qp	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
012	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
013a	-	-	-	qp	-	-	-	qp	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	qp
013c	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
013h	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	qp	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
014	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
016	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
019	+	+	+	+	T	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
020	+	+	+	+	T	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
021	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+

TABLEAU XIII : SPECIFICITE D'HOTES DES PHAGES DE RHIZOBIUM MELLIOTI



Phages		Souche de <u>R. meliloti</u>				
		M ₁₂ S	M ₁₁ S	M ₁₄ S	M ₁₃ S	M ₂₀ S
Φ10 / M ₁₂ S	efficacité	1	1	0,25	0,5	10 ⁻⁴
	spécificité	+	+	+	+	gp
Φ5t / M ₁₁ S	efficacité	0	1	0	1	0
	spécificité	-	+	-	+	-
Φ13a / M ₁₄ S	efficacité	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	1	10 ⁻⁷	0
	spécificité	gp	-	+	gp	-

TABLEAU XIV : Coefficient d'efficacité d'étalement et spécificité de 3 phages de Rhizobium meliloti.

Nous constatons que lorsque la recherche de la spécificité d'hôte donne des résultats positifs (+), les coefficients d'efficacité sont égaux à 1 ou 0,25 ou compris entre ces deux valeurs.

Dans le cas contraire, des coefficients nuls ou très faibles (10⁻⁷) semblent effectivement traduire une résistance de la souche bactérienne au phage. Seuls quelques virions mutants peuvent néanmoins s'exprimer.

Depuis les travaux de ARBER et DUSSOIX en 1962 (56) sur les mécanismes moléculaires de la modification du bactériophage λ par Escherichia coli, il a été prouvé que la présence d'un site de restriction sur l'ADN diminue de 100 fois le coefficient d'efficacité.

Dans le tableau XIV, nous voyons que le coefficient d'efficacité du phage $\Phi 10$ sur $M_{20}S$ est égal à 10^{-4} . Il est donc probable que nous sommes en présence d'un phénomène de restriction de la souche $M_{20}S$ sur le phage $\Phi 10$. Dans le cas présent, les endonucléases de restriction de $M_{20}S$ couperaient donc l'ADN de $\Phi 10$ en deux points.

A partir des résultats du tableau XIII, nous pouvons également établir une concordance assez nette avec ceux obtenus lors de l'étude de la spécificité d'hôte. En effet, lorsque le phage est très virulent, son coefficient d'efficacité est égal à 1, 0,5 ou 0,25. Si le phage est capable de produire quelques plages sur une souche bactérienne, son coefficient d'efficacité est de 10^{-4} . Enfin, même lorsque les coefficients d'efficacité sont nuls, ce qui traduit en principe une résistance au phage ou très faibles (10^{-7}), si des mutants peuvent néanmoins se développer, on ne peut pas exclure cependant la possibilité d'un pouvoir restrictif extrêmement fort chez Rhizobium meliloti. Des études sont en cours pour préciser cette éventualité.

Discussion
et
Conclusion

L'isolement des bactériophages de R. meliloti à partir d'échantillons de sol ou de souches bactériennes lysogènes ne pose pas de problèmes techniques particuliers. Pour obtenir des suspensions phagiques de titre élevé, nous avons choisi une méthode en milieu solide qui permet la réalisation de stocks de phages contenant environ 10^9 particules par ml. Cette technique simple et rapide élimine l'inconvénient d'avoir une multiplication bactérienne éventuelle due aux mutants résistants au phage.

Les travaux réalisés avec ces virus ont été dirigés vers l'étude des conditions de lyse en milieu liquide d'une part et vers un essai de classification de ces phages selon différents critères d'autre part, sans que ces deux orientations ne soient complètement dissociées.

En effet, en 1973, D. KRSMANOVIC et M. WERQUIN (57) ont isolé et décrit deux grandes classes de phages. L'une regroupe les phages capables de lyser R. meliloti en absence de calcium et de magnésium, mais seulement en milieu solide (phages L.S.). Ils donnent une réponse spécifique vis-à-vis des immunosérums correspondants et font partie des trois groupes de la classification morphologique de BRADLEY (55). L'autre classe est constituée de phages sans communauté antigénique avec les précédents mais susceptibles de lyser R. meliloti en absence de calcium et magnésium tant en milieu solide qu'en milieu liquide (phages L.L.). Leur apparente fragilité n'avait pas permis à cette époque de les observer de manière satisfaisante au microscope électronique.

La propriété de ces phages de lyser en milieu liquide sans apport calcique et magnésien semblait donc un caractère distinctif important et il devenait nécessaire de mieux connaître la physiologie de la lyse phagique de R. meliloti en milieu liquide.

L'étude des conditions de culture nous a permis de préciser effectivement le rôle de divers facteurs. Il a été montré que le fructose constituait une source de carbone intéressante car sa dégradation métabolique par R. meliloti ne provoque pas contrairement au glucose une acidification du milieu préjudiciable à la croissance bactérienne et par conséquent à la multiplication phagique. La croissance de R. meliloti nécessite une oxygénation du milieu qui est facilitée par l'agitation des fioles de culture contenant un faible volume de liquide. Toutefois, le brassage ne doit pas être trop rapide car il gêne alors l'adsorption des phages sur la bactérie.

Nous avons particulièrement recherché l'obtention d'une lyse rapide (de 3 à 12 heures) avec production d'une quantité importante de virions. A cet égard, nous avons remarqué que la vitesse de lyse est d'autant plus grande que le nombre de phages initialement mis en présence des bactéries est élevé. Toutefois, un seuil supérieur est à respecter. Nous l'avons expérimentalement fixé à cinq phages par bactérie. Pour répondre à ce critère de rapidité de lyse, nous avons éliminé l'utilisation éventuelle d'un milieu de culture minimum qui aurait facilité la reproductibilité des conditions expérimentales par rapport au milieu R.C. contenant des éléments de composition complexe et mal connue. En milieu minimum, le temps de génération de R. meliloti est augmenté, la production de bactériophages est très ralentie et parfois même peu abondante.

Enfin, l'étude des besoins en calcium et magnésium pour obtenir une lyse phagique maximale a montré que chaque bactériophage a besoin d'une quantité déterminée de chacun de ces cations (de $0,8$ à $2,8 \cdot 10^{-4}$ M pour le calcium et de 1 à $3,5 \cdot 10^{-4}$ M pour le magnésium). Un excès de ces sels est sans effet.

Mais surtout, il a été mis en évidence qu'un phage L.S. théoriquement incapable de lyser en milieu liquide acquiert cette propriété lorsqu'il reçoit une quantité bien précise d'ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . La distinction entre phages "lyse solide" et phages "lyse liquide" n'est donc due qu'aux conditions de culture et elle devient fictive lorsque les exigences calciques et magnésiennes sont quantitativement respectées. Ainsi l'étude de la lyse en milieu liquide nous a permis de définir de façon très précise les conditions optimales d'obtention des rhizobiophages en quantités importantes et dans un temps relativement court.

Il nous a fallu recourir à d'autres critères pour tenter de classer les bactériophages de notre collection.

Les phages que nous appelions "lyse solide" avaient été observés en microscopie électronique et rangés dans les trois premiers groupes de la classification de BRADLEY. Comme nous l'avons dit précédemment, les autres phages, dits de lyse liquide, n'avaient pu être observés en raison d'une relative fragilité. En fait, ces phages étaient certainement sensibles à la pression osmotique due au chlorure de césium utilisé pour les gradients de centrifugation puisque l'abandon de cette technique de récupération des virions et la mise en œuvre d'une concentration par simple ultra-centrifugation a permis de diminuer considérablement le nombre de bactériophages altérés. Leur observation au microscope électronique nous a alors permis de les ranger dans les groupes A et B de la classification de BRADLEY. Nous n'avons pas mis en évidence de bactériophages du groupe C.

Les résultats de nos recherches sur la spécificité d'hôtes des bactériophages de R. meliloti nous a également amené à les grouper en trois catégories. En comparant ces deux essais de classification, nous avons remarqué que les phages peu spécifiques ou à spécificité d'hôte intermédiaire se trouvent en majorité dans les groupes A et B de BRADLEY ; tandis que les phages à spécificité étroite se trouvent dans les groupes C et B.

Seuls font exception les phages $\Phi 19$ et $\Phi 13a$, mais nous ne connaissons pas les raisons de leur comportement.

Nous avons donc une concordance relative entre les deux méthodes de caractérisation de nos phages. Cette base de classification nous semble plus valable que les distinctions précédentes en fonction d'un comportement lytique différent selon le milieu liquide ou solide puisque nous en avons montré les déficiences.

Toutefois, ces résultats devront être complétés et affinés par d'autres études biochimiques telles que la détermination des acides nucléiques et des protéines phagiques par exemple.

Enfin, lorsque nous avons approfondi la recherche de la spécificité d'hôtes nous avons mis en évidence chez R. meliloti un phénomène comparable à la restriction de l'acide désoxyribonucléique observée chez d'autres espèces bactériennes.

Cette observation ouvre la voie à de nouvelles recherches concernant les systèmes de restriction-modification de l'ADN dont on suppose l'existence chez Rhizobium meliloti.

Bibliographie

- 1 - DIXON, R.A. 1969.
Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants.
Ann Rev. Microbiol., 23 : 137-158.
- 2 - LJUNGGREN, H. 1969.
Mechanisms and pattern of Rhizobium invasion into leguminous roots hairs.
Physiol. Plant. Suppl. V : 1 - 82.
- 3 - VINCENT, J.M. 1974.
Root-nodules symbioses with Rhizobium. The Biology of Nitrogen Fixation
(A. QUISPÉL, Editor). Frontiers of Biology, 33 : 265-341.
- 4 - FAHRAEUS, G. and SAHLMAN, K. 1977.
The infection of root hairs of leguminous plants by nodule bacteria.
A review of recent work and a discussion of possible mechanisms.
Ann. Acad. R. Sci. Upsal., 20 : 103-137.
- 5 - JOHNSTON, A.W.B. and BERINGER, J.E. 1977.
Chromosomal recombination between Rhizobium species.
Nature., 267 : 611-613.
- 6 - KONDOGROSI, A., KISS, G.B., FORRAI, T., VINCZE, E. and BANFALVIZ. 1977
Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome. Nature., 268 : 525-527
- 7 - MEADE, H.N. and SIGNER, E.R. 1977.
Genetic mapping of Rhizobium meliloti.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)., 74 : 2076-2078.
- 8 - BERINGER, J.E., HOGGAN, S.A. and JOHNSTON, A.W.B. 1978.
Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of R. plasmid mediated
conjugation.
J. Gen. Microbiol., 104 : 201-208

- 9 - JOHNSTON, A.W.B., BIEB, M.J. and BERINGER, J.E. 1978.
Tryptophane genes in Rhizobium. Their organisation and their transfer to other bacterial genera.
Molec. Gen. Genet., 165 : 323-330
- 10 - ZELAZNA-KOWALSKA., I and LORKIEWICZ., Z. 1971.
Conditions for genetical transformation in Rhizobium meliloti.
Acta microbiol. polon. 3 : 21-28
- 11 - DROZANSKI, D. and LORKIEWICZ, Z. 1978.
Genetic transformation in Rhizobium trifolii.
Acta microbiol. polon. 27 : 81-88
- 12 - PAGE, W.J. 1978.
Transformation of Azotobacter vinelandii strains unable to fix nitrogen with Rhizobium sp. DNA
Can. J. Microbiol. 24 : 282-288
- 13 - KOWALSKI, M. 1967.
Transduction in Rhizobium meliloti.
Acta. Microbiol. polon. 16 : 7-12
- 14 - KOWALSKI, M. 1970 a.
Transducing phages in Rhizobium meliloti.
Acta. Microbiol. polon., 2 : 109-114
- 15 - KOWALSKI, M. 1970 b.
Genetic analysis by transduction of Rhizobium meliloti mutants with changed symbiotic activity.
Acta. Microbiol. polon. Ser A. 2; 115-122
- 16 - KOWALSKI, M. 1971.
Transduction in Rhizobium meliloti.
Plant and Soil, Special Volume. 63-66

- 17 - KOWALSKI, M. 1975.
Transduction of effectiveness in Rhizobium meliloti.
Symbiotic nitrogen fixation in Plants. 7 : 63-67
- 18 - SVAB, Z., KONDOROSI, A. and OROSZ, L. 1978.
Specialized transduction of a cystein marker by Rhizobium meliloti
phage 16-3.
J. Gen. Microbiol. 106 : 321-327.
- 19 - LOEW, O. and ASO, K. 1908.
Tokyo College of Agr. Bull. 7 p 572
- 20 - DUCKWORTH, D.H. 1976.
"Who discovered bacteriophage ?"
Bact. Rev. 40 n° 4 : 793-802.
- 21 - BORDET, J. et CIUCA, M. 1921
Remarques sur l'historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible.
C. R. Soc. Biol. PARIS. 84 : 745-747
- 22 - GERRETSEN F.C., GRIJNS A., SACH J. and SCHNIGEN N.L. 1923.
Centralbl. f. Bakt. 60 Abt II: 311-316
- 23 - GRIJNS A. 1927.
Centralbl. f. Bakt. 71 Abt II : 248-251
- 24 - ISRAILSKY W. and STARYGIN. L. 1929.
Centralbl. f. Bakt. 79 AbtII : 354-370
- 25 - HITCHNER. E.R. 1930.
J. Bact. 19 : 191-201
- 26 - BURNET. F.M. 1927.
Brit. J. Exper. Pathol. 8 n° 2 : 121-129

- 27 - KOSER, S.A. 1926.
J. Lab. and Clin. Med. 12 : 1074-1086
- 28 - LAIRD, D.G. 1932.
Bacteriophage and the root nodule bacteria
Arch. Mikrobiol. 3 : 159-193
- 29 - KLECZKOWSKA, J. 1945.
The production of plaques by Rhizobium bacteriophage in poured plates
and its value as a counting method.
J. Bacteriol. 50 : 71-80
- 30 - BRADLEY, D.E. and KAY D. 1960
The fine structure of bacteriophages.
J. Gen. Microbiol. 23 : 553-563.
- 31 - TAKANASHI, I. and QUADLING, C. 1961.
Lysogeny in Rhizobium trifolii.
Can. J. Microbiol. 7 : 455-465
- 32 - SCHWINGHAMER, E.A. 1965.
Host controlled modification of Rhizobium bacteriophages
Aust. J. Biol. Sci., 18 : 333-343.
- 33 - KOWALSKI, M., 1966 a.
Lysogeny of Rhizobium meliloti.
Acta. Microbiol. Polon. 15. p 119
- 34 - BALASSA, G. 1963.
Genetic transformation in Rhizobium. A review of the work of R. BALASSA.
Bacteriological Reviews, 27 : 228-241.
- 35 - ELLIS, N.J., KALZ, G.G. and DONCASTER J.J. 1962.
Transformation in Rhizobium trifolii.
Can. J. Microbiol. 8 : 835.

- 36 - ZELAZNA, I. 1963.
Transformation in Rhizobium.
Acta. Microbiol. Polon. 12 : 166
- 37 - ZELAZNA, I. 1964.
Transformation in Rhizobium trifolii
II. Development of competence.
Acta. Microbiol. Polon. 13 : 283
- 38 - GABOR, M. 1965.
Transforming of streptomycin markers in rough strains of Rhizobium lupini.
II. The relation between the determinant of streptomycin resistance and sensitiveness.
Genetics. 52 : 905-913
- 39 - BERINGER, J.E. 1974.
R. factor transfer in Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol. 84 : 188-198
- 40 - BERINGER, J.E. and HOPWOOD, D.A. 1976.
Chromosomal recombination and mapping in Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol. 264 : 291-293.
- 41 - JOHNSTON, A.W.B., SETCHEL, S.M. and BERINGER, J.E. 1978.
Interspecific crosses between Rhizobium leguminosarum and Rhizobium meliloti,
formation of haploid recombinants and R-primes.
J. Gen. Microbiol. 104 : 209-218.
- 42 - BARNET, Y.M., and VINCENT J.M. 1970.
Lysogenic conversion of Rhizobium trifolii.
J. of Gen. Microbiol. 61 : 319-325.
- 43 - BARNET Y.M. 1972.
Bacteriophages of Rhizobium trifolii.
I. Morphologie and host range.
J. Gen. Virol. 15 : 1-5.

- 44 - KOWALSKI, M. et DENARIE. J. 1972.
Transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation de l'azote
chez Rhizobium meliloti.
C. R. Acad. Sci. D. 275 : 141-144
- 45 - VERVLIET, G., HOLSTERS, M., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1975.
Characterization of different plaque-forming defective temperate phages
in Agrobacterium strains.
J. Gen. Virol., 26 : 33-48
- 46 - PATEL. J.J. 1976.
Morphology and host range of virulent phages of lotus rhizobia.
Can. J. Microbiol. 22 n° 2 : 204-212
- 47 - DALLMANN. G., OROSZ. L. and SAIN. B. 1979.
Restriction mapping of DNA of temperate Rhizobium meliloti phage 16-3 :
comparison of genetic and physical maps indicates a long, genetically
silent chromosomal arm.
Molec. gen. Genet., 176 : 439-448.
- 48 - DELATTRE. J.M. 1971.
Thèse de Docteur Ingénieur N° 121
Université des Sciences et Techniques de Lille I
- 49 - ADAMS. N.H.
The bacteriophages. N.Y.
Intersc. 1959
- 50 - WERQUIN. M., BEN BRAHIM. M.T. et KRSMANOVIC-SIMIC. D. 1977.
Etude des bactériophages de Rhizobium meliloti.
- 51 - COURTOIS. B., DERIEUX. J.C. et HOMMEZ. J.P. 1975.
Etude des polysides de Rhizobium à croissance rapide.
Ann. Microbiol. Inst. PASTEUR, PARIS, 126 b : 1-15

- 52 - HORNEZ, J.P. 1976.
Etude des voies de dégradation du glucose et du fructose chez Rhizobium meliloti.
Thèse de Doctorat de 3e cycle Lille.
- 53 - HORNEZ, J.P., COURTOIS, B. et DERIEUX, J.C. 1976.
Mise en évidence de voies de métabolisme différentes à partir du glucose ou du fructose chez Rhizobium meliloti.
C. R. Acad. Sci. PARIS 283 D : 1559-1562.
- 54 - BRENNER, S. and HONE R.W. 1959.
A negative staining method for high resolution microscopy of viruses.
Biochem. Biophys. Acta, 34 : 103-110
- 55 - BRADLEY, D.E. 1967.
Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins.
Bact. Reviews 31 : 230-314
- 56 - ARBER, W. and DUSSOIX, D. 1962
Host specificity of DNA produced by Escherichia coli.
I. Host controlled modification of bacteriophage .
J. of Mol. Biol. 5 : 428-434.
- 57 - KRSMANOVIC-SIMIC, D. et WERQUIN, M. 1973.
Etude des bactériophages de Rhizobium meliloti.
C. R. Acad. Sc. PARIS. 276. Ser. D. 2745-2748.

