

50376
1983
11

N° d'ordre : 1059

50376
1983
11

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : «Amélioration et Transformation des Productions
Végétales et Microbiennes»

Option : MICROBIOLOGIE

par

Lahcen HASSANI

LA LYSOGENIE CHEZ *Rhizobium meliloti* : ETUDE DE QUELQUES EXEMPLES DE TRANSDUCTION



Soutenu le 11 Juillet 1983 devant la Commission d'Examen

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

A MES PARENTS

A TOUS LES MIENS

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I sous la Direction Scientifique de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME.

Nous lui exprimons toute notre gratitude pour l'accueil qu'il nous a réservé et pour l'aide qu'il nous a prodiguée.

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

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à Monsieur M. WERQUIN pour son aide et la sympathie qu'il nous a toujours témoignée.

Enfin nos remerciements vont aussi à tout le personnel du Laboratoire de Microbiologie et plus particulièrement à Monique ANDRIANTSIMIAVONA ainsi qu'à Edith TAHON et Michèle DELECOURT pour l'aide qu'ils nous ont apportée pour la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

	Pages
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	3
I. HISTORIQUE	3
II. GENERALITES	9
a) Le cycle lytique	10
1) Adsorption du phage et injection de l'ADN phagique .	10
2) Développement intracellulaire des phages	11
3) Lyse bactérienne	14
b) Aperçu sur la lysogénie	14
c) Restriction-modification	18
MATERIEL ET METHODES	19
I. SOUCHES BACTERIENNES ET CONSERVATION	19
II. BACTERIOPHAGES DE LA COLLECTION	19
III. BACTERIOPHAGES TEMPERES	19
IV. MILIEUX DE CULTURE	19
a) Milieu " <i>Rhizobium</i> complexe" (RC)	19
b) Source de carbone	23
c) Milieu riche TY	23
d) Milieu R	23
e) Milieu gélosé pour bactériophages	24
V. MULTIPLICATION DES BACTERIOPHAGES	24

a) Sur milieu gélosé	24
b) En milieu liquide	25
c) En fermenteur	25
1) Paramètres de la fermentation	26
2) Préparation et ensemencement du fermenteur	26
3) Appréciation de la lyse de la culture	27
VI. DENOMBREMENT DES PARTICULES PHAGIQUES INFECTIEUSES	28
VII. CONCENTRATION DES SUSPENSIONS PHAGIQUES	29
a) Tampons	29
b) Mode opératoire	29
VIII. MISE EN EVIDENCE DE PHAGES TEMPERES ET RECHERCHE DE LEURS SOUCHES INDICATRICES	32
a) Agents inducteurs	32
1) Les rayons ultra-violets	32
2) Action de la mitomycine C	33
3) Traitement à la N.T.G.	33
b) Recherche de souches lysogènes et de souches indicatrices	33
IX. MISE EN EVIDENCE DE L'EFFET INHIBITEUR DES IMMUN-SERUMS SUR LES PHAGES	34
X. DETERMINATION DU POURCENTAGE DE PHAGES ADSORBES	35
XI. DETERMINATION DE LA PERIODE DE LATENCE ET DU RENDEMENT INDIVIDUEL MOYEN DES BACTERIES	36
a) Après infection	36
b) Après induction par les ultra-violets	38
XII. TRANSDUCTION	39
a) Préparation de lysats	39
b) Technique de transduction	39

c) Préparation de particules phagiques alourdis à la 5-Bromo-uracile	40
d) Centrifugation en gradient de chlorure de cesium	40

RESULTATS ET COMMENTAIRES

CHAPITRE I : RECHERCHE DE SOUCHES LYSOGENES ET DE SOUCHES INDICATRICES	42
a) Choix de l'agent inducteur	42
1) Mitomycine C	42
2) N.T.G.	42
3) Les rayons U.V.	42
b) Mise au point des conditions optimales d'induction	46
1) Dose U.V.	46
2) Milieu de culture	46
c) Mise en évidence de phages tempérés	47
1) Nomenclature des phages tempérés	47
2) Libération spontanée de phages par les souches lysogènes	48
3) Spectre lytique des phages tempérés	49
4) Commentaires sur le tableau 6	49
5) Influence de la souche indicatrice sur l'efficacité d'étalement	53
CHAPITRE II : LYSOGENISATION EXPERIMENTALE	57
a) Recherche de clones ayant perdu leur prophage	57
b) Technique de lysogénisation	59
c) Facteurs influençant la lysogénisation	59
1) Milieu de culture	60
2) Température	61
3) Multiplicité d'infection	63
d) Influence de la lysogénie sur la sensibilité aux phages de souches de <i>Rhizobium meliloti</i>	63
1) Sensibilité aux phages de la souche M5N1 et de ses mutants auxotrophes m ₂ , m ₃ et m ₄	63

2) Conséquences de la lysogénéisation des souches M9S et M13S par le phage Ø M20	66
e) Etude comparative des phages Ø 1, Ø 2, Ø 3, Ø L9 et Ø M20	70
1) Lyse en fermenteur	70
2) Action de l'immun-sérum anti Ø L9 sur les phages Ø 1, Ø 2, Ø 3, Ø L9 et Ø M20	73
3) Etude de la multiplication du phage Ø M20 en une seule étape	73
 CHAPITRE III : ASPECTS DE LA TRANSDUCTION CHEZ <i>RHIZOBIUM</i> <i>MELILOTI</i>	 77
a) Transfert du transposon Tn5	77
b) Transduction du caractère "Met ⁺ "	77
c) Influence de la multiplicité d'infection sur la transduction	80
d) Origine de l'ADN des particules transductrices	80
 CONCLUSION GENERALE	 83
 BIBLIOGRAPHIE	

AVANT

PROPOS

Tandis que la population mondiale s'accroît de façon exponentielle, le déséquilibre dans la répartition des richesses protéiques devient chaque jour flagrant. Ainsi, alors que la production de protéines dans le monde tend à s'élever légèrement, le bilan par tête de terrien accuse en fait un déficit qui ne cesse de s'accroître et auquel les Etats tentent de remédier.

D'innombrables techniques sont donc mises en jeu pour assurer la survie de l'humanité. Actuellement, les traitements des protéines végétales représentent un grand espoir pour les chercheurs. En effet, les végétaux sont les seuls organismes supérieurs de la biosphère capables de transformer, à l'aide de micro-organismes, l'azote atmosphérique en substances nutritives. Cette transformation est rendue possible par suite de la symbiose qui s'établit entre les plantes de la famille des Légumineuses et les bactéries du genre Rhizobium. La connaissance approfondie de tout ce qui peut modifier de près ou de loin la fixation de l'azote gazeux, est donc nécessaire.

Ce phénomène suscite actuellement l'attention d'un nombre croissant de chercheurs dans de nombreux laboratoires de par le monde. La cause essentielle de cet intérêt se devine aisément si l'on sait que le coût des approvisionnements énergétiques n'a cessé d'augmenter ces dernières années.

Ces recherches sont donc orientées vers le remplacement des procédés de synthèse chimique des engrais azotés par une augmentation de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les plantes.

Par ailleurs, ces études représentent un grand espoir pour l'humanité, celui de pouvoir induire l'assimilation de l'azote moléculaire à d'autres plantes cultivées telles que les céréales.

Une grande partie des études entreprises dans ce domaine est consacrée à la génétique de Rhizobium. Parmi ces études, figure la transduction, processus biologique au cours duquel une partie du génome d'une bactérie peut être véhiculée vers une autre bactérie grâce à un bactériophage. On voit donc l'intérêt que présente le fait de pouvoir apporter à une bactérie, le caractère d'efficacité dans la fixation de l'azote.

Sur le plan fondamental, il est intéressant de connaître la morphologie des bactériophages et d'étudier leurs propriétés biologiques, chimiques ou physiques.

Sur le plan agricole, il faut noter que les bactériophages jouent vraisemblablement un rôle dans la compétitivité entre les souches de Rhizobium présentes dans la rhizosphère (21)

INTRODUCTION

I) HISTORIQUE

En 1915, TWORT (61) remarqua que certaines colonies de microcoques devenaient vitreuses et transparentes. Il fit quelques observations très importantes au sujet de ce phénomène qu'il appela "transformation vitreuse".

1) L'examen des surfaces vitreuses ne montre que de minuscules granules et ne révèle aucune bactérie.

2) Si une culture pure de microcoques est touchée par une partie de l'une des colonies vitreuses, elle devient elle aussi transparente.

3) Le filtrat obtenu à partir de colonies vitreuses est capable de rendre transparente une culture pure de microcoques.

4) La "transformation vitreuse" est transmissible ; elle peut être communiquée à de nouvelles cultures saines pendant un nombre indéfini de générations.

Après ces constatations, TWORT émit l'hypothèse que la "transformation vitreuse" était provoquée par un agent infectieux, filtrable qui tuait les bactéries.

Deux ans plus tard, D'HERELLE (25) décrit un phénomène semblable à celui observé par TWORT, il écrit : "what caused my clear spots was in fact an invisible microbe, a filtrable virus, but a virus parasitic on bacteria".

Il confirme ainsi la découverte de TWORT et donne le nom de "bactériophagie" à ce phénomène.

Cette découverte a divisé les chercheurs en deux clans opposés :

D'un côté, ceux qui admettent la conception virale du phénomène.

De l'autre côté, ceux qui contestent cette hypothèse. Ils expliquent ce phénomène par une autodestruction due à des agents lytiques tels que les enzymes. Parmi eux BORDET (15) pense que la lyse bactérienne est due à une "viciation nutritive" provoquée par des agents extérieurs.

En 1933, les recherches d'Eugène et Elisabeth WOLLMAN (66), ont incontestablement placé le problème des bactériophages sur la bonne voie. Selon eux, il existe des bactéries dites lysogènes qui sont capables de produire des bactériophages dans certaines conditions et de les répandre autour d'elles. Mais, le plus intéressant est que ces bactéries lysogènes n'en contiennent pas elles-mêmes sous la forme infectieuse.

Ces auteurs estiment surtout, que dans une bactérie lysogène, le bactériophage se comporte comme un gène.

Ce fait important a conduit plusieurs auteurs dont LWOFF (40), à distinguer 2 types de bactériophages :

- les phages virulents qui lysent la presque totalité de la culture bactérienne sensible

- les phages tempérés qui lysent une partie de la culture sensible et lysogénisent l'autre partie.

Par ailleurs, LWOFF (40) a insisté sur le fait qu'une bactérie lysogène ne porte pas un phage infectieux, mais un précurseur qui peut se transformer, dans certaines conditions, en un "vrai" phage infectieux. Ce précurseur est appelé prophage.

La recherche sur les phages a pris un nouvel essor avec DELBRÜCK (14), en 1940, qui montre que chaque bactérie infectée libère environ 100 phages après la lyse. Il dénomme

sept phages virulents sur Escherichia coli : T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ et T₇ (T pour type).

L'observation directe des bactériophages n'a été possible qu'après l'invention du microscope électronique et la mise au point des techniques de coloration négative.

C'est ainsi qu'en 1942, LURIA et ANDERSON (39) étudient des bactériophages au microscope électronique et les caractérisent du point de vue morphologique.

De même BRADLEY, en 1960 (10), observe plusieurs phages de provenances diverses et les classe dans 6 groupes morphologiques différents. La classification de BRADLEY est actuellement l'une des plus utilisées dans la systématique des bactériophages.

Ce n'est qu'en 1956 que MARSHALL (42) a pu mettre en évidence la lysogénie chez Rhizobium trifolii ; phénomène jusque là inconnu chez le genre Rhizobium.

En 1958, DAVIES (12) décrit un phage tempéré qu'il a isolé à partir d'une souche lysogène de R. meliloti.

De leur côté, TAKAHASHI et QUADLING (60), en 1961, en utilisant la souche lysogène SU 298 de MARSHALL et la souche indicatrice SU 297, ont confirmé la découverte de MARSHALL. En effet, ils ont montré que la souche SU 298 porte deux prophages inductibles par un phage de la souche SU 297.

De même, SZENDE et ÖRDÖGH (59), en 1960 ont étudié 152 souches de Rhizobium meliloti dont 44 d'entre elles se sont révélées lysogènes.

En 1966, KOWALSKI (33) isole 24 phages tempérés de R. meliloti dont un, le phage L₅ possède une propriété

transductrice (34). Ce phage peut transférer le caractère de résistance à la streptomycine d'une souche résistante à une souche sensible à cet antibiotique. Par cette découverte, KOWALSKI présage l'essor de la génétique bactérienne de Rhizobium, discipline jusque là basée seulement sur la transformation BALASSA 1963 (5), ELLIS et coll. 1962 (19) ZELAZNA 1963, 1964 (68,69) et GABOR 1965 (23) .

Six ans plus tard, KOWALSKI et DENARIE (35) décrivent la cotransduction du gène "Leucine" et d'un gène contrôlant la fixation de l'azote. En effet, ils ont montré qu'une mutation de R. meliloti L5-30 provoque simultanément l'auxotrophie pour la leucine et la perte du pouvoir fixateur d'azote sur la luzerne. Après transduction, tous les recombinants prototrophes retrouvent l'efficacité.

En 1965, SCHWINGHAMER (61) met en évidence un phénomène jusque là inconnu chez Rhizobium ; il s'agit de la restriction-modification. Cet auteur a montré que la possibilité de multiplication d'un phage sur une souche bactérienne donnée, dépend considérablement de la souche d'origine sur laquelle on a reproduit le phage.

Alors que les études de la restriction-modification chez Rhizobium, n'ont pas permis d'avoir des renseignements satisfaisants sur ce phénomène, d'autres études génétiques telles que la conjugaison et la transduction ont, au contraire, vu leur évolution progresser et ont contribué à une connaissance plus profonde de Rhizobium. Parmi les travaux réalisés dans ce sens, on peut citer ceux de SVAB et coll. (58) qui ont réussi à mobiliser le gène chromosomique "cystéine" de Rhizobium meliloti, grâce au phage tempéré 16-3. Par ces travaux, ils ont donc mis en évidence la transduction spécialisée chez R. meliloti

Par ailleurs, BUCHANAN-WOLLASTON (11), en 1979, en travaillant sur Rhizobium leguminosarum et R. trifolii, ont réussi à transférer des gènes chromosomiques et des gènes plasmidiques par l'intermédiaire de phages virulents. De même, ils ont mis en évidence la transduction interspécifique en transférant des gènes de R. leguminosarum à R. trifolii.

En 1980, SIK et coll. (53) constatent que le phage 11 de R. meliloti peut transduire plus d'un gène à la fois. Ils ont donc exploité cette propriété pour établir une ébauche de la carte génétique de R. meliloti.

Il faut également noter qu'outre leur pouvoir transducteur, les bactériophages ont servi dans la classification des souches de Rhizobium. C'est ainsi qu'en 1968, des méthodes de typage basées sur la sensibilité des bactéries à des phages spécifiques (lysotypie), ont permis à STANIEWSKI (56) de subdiviser des souches de Rhizobium trifolii, R. meliloti, R. leguminosarum et R. phaseoli et de contribuer ainsi à une classification jusqu'alors basée uniquement sur le genre de la plante hôte.

Par ailleurs, en 1974, STANIEWSKI et KOWALSKA (57) ont montré que des mutants de Rhizobium obtenus par traitement à l'acide nitreux, présentent des changements dans leur sensibilité aux phages, ce qui les différencie de la souche sauvage dont ils sont issus.

Des travaux du même genre ont été réalisés par PATEL (48) en 1976, sur des souches de Rhizobium "lotus".

Plus récemment, LESLEY (36) en 1982, a mis au point un schéma de lysotypie à partir de 15 bactériophages spécifiques de Rhizobium meliloti. Il a pu ainsi subdiviser 350 souches en 80 groupes distincts.

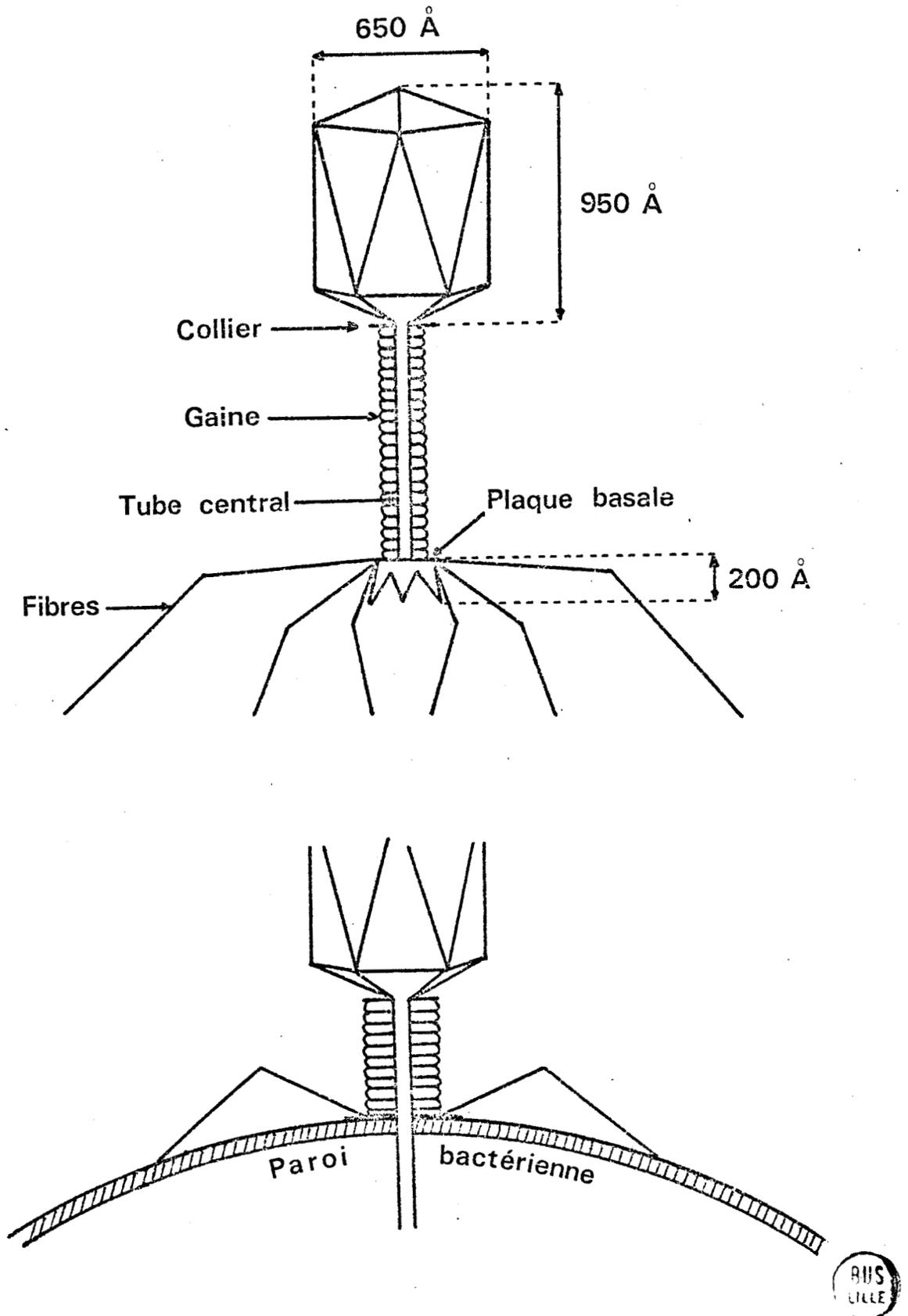


Figure 1 : Représentation schématique de la particule infectieuse du phage T4.

D'après LURIA et DARNELL. General Virology, Wiley, 1967

II) GENERALITES

Après avoir relaté un bref historique sur les bactériophages, et avant d'aborder notre sujet proprement dit, nous avons jugé utile de rappeler succinctement quelques généralités, maintenant devenues classiques, sur les bactériophages.

Les bactériophages sont constitués essentiellement de protéines et d'un acide nucléique qui peut être, soit de l'ADN, soit de l'ARN.

Actuellement, les bactériophages les plus étudiés et les mieux connus sont ceux de la série T (T_1, T_7) qui ont pour hôte Escherichia coli. Ces phages sont constitués d'une tête icosaédrique (ou icosaédre allongée) et d'une queue contractile (figure 1). D'autres phages, infectant d'autres espèces bactériennes, possèdent une queue non contractile, laquelle peut être vestigiale ou même absente. Ces variations morphologiques ont permis à BRADLEY (10) de classer les bactériophages en 6 groupes :

- groupe A : queue contractile
- groupe B : longue queue non contractile
- groupe C : queue courte non contractile
- groupe D : sans queue, grands capsomères
- groupe E : sans queue, petits capsomères
- groupe F : sans tête, sous forme de filament flexible

Lorsqu'une cellule bactérienne sensible est infectée par un phage, ce dernier s'adsorbe sur la paroi bactérienne et injecte son acide nucléique dans la bactérie. Etant à l'intérieur de la bactérie, l'ADN phagique peut suivre l'une des voies suivantes :

- déclencher le cycle lytique, et dans ce cas il va

servir de matrice pour diriger la synthèse de nouveaux constituants phagiques

- s'insérer dans une zone déterminée du chromosome bactérien et se comporter alors comme partie intégrante du génome bactérien. Dans ce cas, il va se répliquer de façon synchrone avec le chromosome bactérien. On nomme prophage, un tel génome viral intégré dans le chromosome de l'hôte ; les bactéries portant des prophages sont dites lysogènes ; et les phages dont l'ADN peut engendrer des prophages sont appelés phages tempérés.

- être dégradé par les endonucléases de restriction de la bactérie hôte

- être dilué pendant la croissance bactérienne ; c'est le cas d'un phage tempéré infectant une bactérie lysogène immune.

a) Le cycle lytique

Le phage T_4 d'E. coli étant l'un des phages les plus étudiés, nous allons donc nous rapporter à ce phage pour décrire les différentes étapes du cycle lytique ; et ceci depuis l'adsorption du phage sur la bactérie jusqu'à la lyse bactérienne.

1) Adsorption du phage et injection de l'ADN phagique

Pour qu'un phage puisse s'adsorber sur une bactérie, il faut que celle-ci possède des récepteurs pariétaux spécifiques reconnaissables par l'appareil de fixation du phage (la plaque basale et les fibres), (figure 1)

Dans le cas du phage T₄, les sites récepteurs sont localisés au niveau de la couche externe de la paroi bactérienne (38). Cette couche est essentiellement constituée de lipopolysaccharides (LPS), dont la synthèse est gouvernée par des gènes bactériens. Une mutation au niveau de ces gènes rend donc la bactérie résistante au phage.

Dès que le phage est fixé sur la bactérie, les fibres de la queue se plient, la gaine se contracte et le tube central pénètre dans la paroi sans franchir la membrane cytoplasmique, l'enveloppe bactérienne restant à l'extérieur (26). L'ADN phagique est ensuite injecté dans le cytoplasme bactérien et commence son cycle de développement.

2) Développement intracellulaire des phages

Après l'injection du génome phagique dans la bactérie, on assiste à un détournement de l'activité métabolique de la bactérie au profit de la synthèse des constituants phagiques (46). Autrement dit, le phage va utiliser les différents composants intracellulaires bactériens et particulièrement les ribosomes comme lieu de synthèse protéique.

Certains gènes phagiques, dits précoces, vont commencer à fonctionner alors que d'autres, appelés tardifs, ne vont entrer en action que vers la moitié du cycle.

Parmi les protéines synthétisées au début du cycle (protéines précoces), on trouve essentiellement des enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN phagique (31).

Les protéines constitutives, quant à elles, sont gouvernées par des gènes tardifs (63).

Le développement s'achève par l'assemblage des différentes sous-unités protéiques pour donner des particules phagiques fonctionnelles.

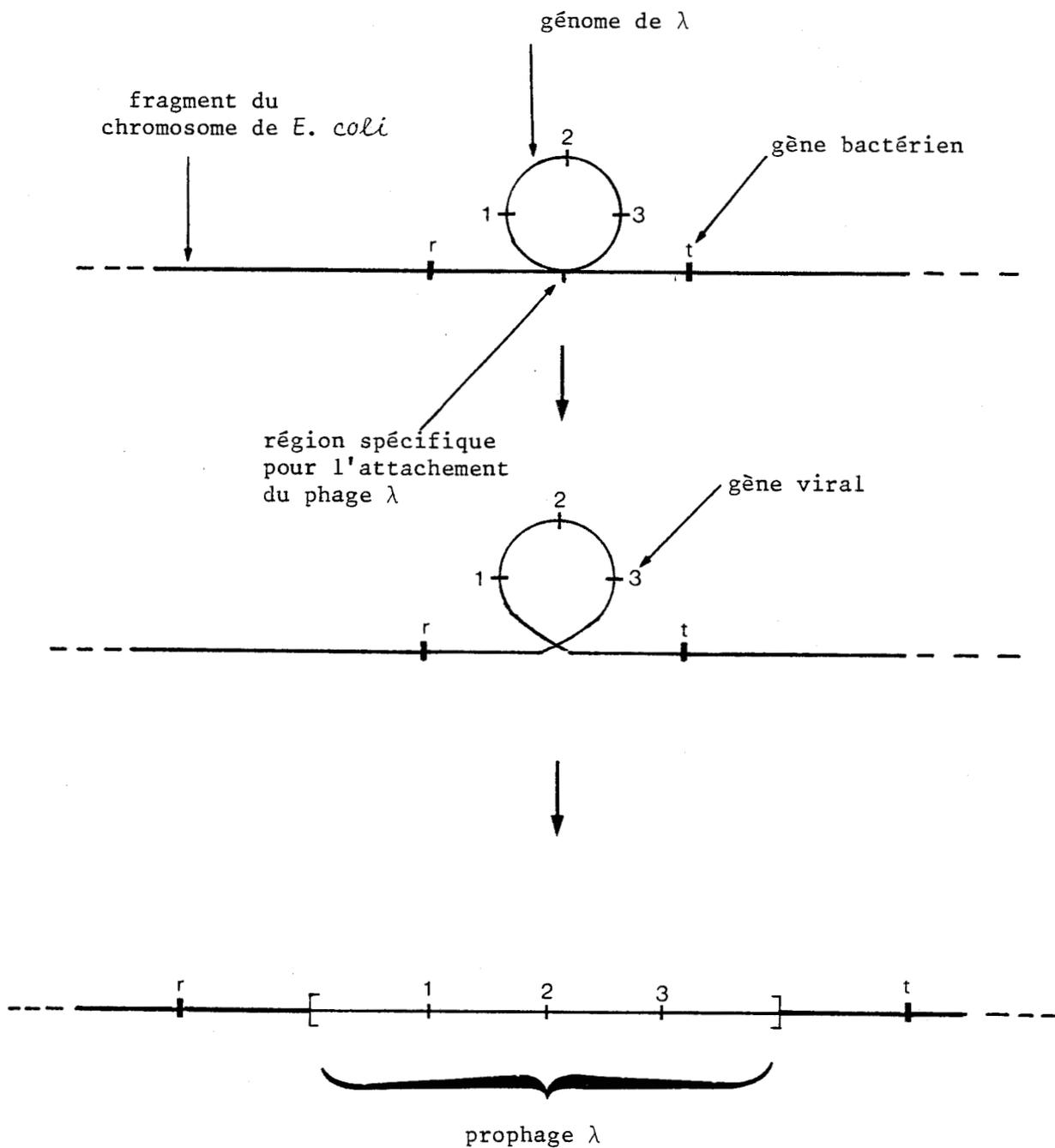


Figure 2 : Insertion du génome du phage λ dans le chromosome d'*E. coli* par crossing over. D'après WATSON (63).

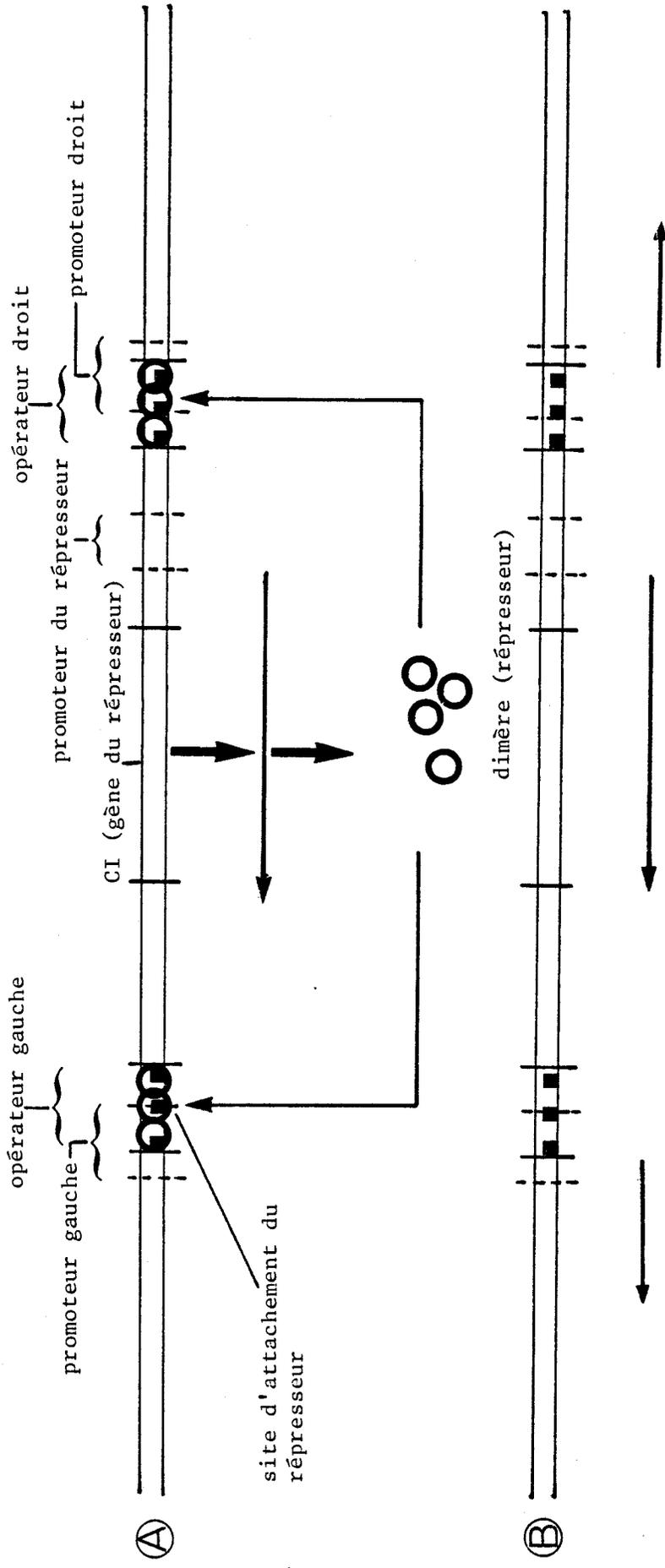


Figure 3 : Dans l'état lysogène (A) seul l'ARNm du répresseur de λ est synthétisé. L'inactivation (B) du répresseur permet la transcription des classes précoces (de gauche et de droite) d'ARNm. D'après WATSON ().



3) Lyse bactérienne

Parmi les protéines tardives figure le lysozyme. L'accumulation de cette enzyme dans la bactérie va provoquer la digestion de la paroi bactérienne ; la cellule bactérienne, devenant ainsi sensible à la pression osmotique du milieu, éclate entraînant la libération des particules phagiques nouvellement formées.

L'intervalle de temps qui s'écoule entre l'adsorption du phage et la lyse bactérienne constitue la période de latence.

Notons enfin que la destruction des bactéries est une caractéristique obligatoire de la multiplication des phages, car aussi longtemps que l'acide nucléique d'un phage reste à l'intérieur de la capsidie protéique, il ne peut en aucun cas engendrer d'autres particules phagiques.

b) Aperçu sur la lysogénie (Ex : phage Lambda)

Lambda (λ) est un phage tempéré dont le génome peut s'intégrer par recombinaison dans le chromosome d'E. coli et la rendre ainsi lysogène (figure 2). Ce phénomène est dû au blocage de la grande majorité des gènes du phage λ (49); l'élément responsable de cette inhibition est une protéine dimérique dite répresseur, dont la synthèse est codée par un gène phagique désigné par C I.

L'attachement du répresseur aux opérateurs gauche et droit renforce l'ADN duplex et rend ainsi moins probable le déroulement du promoteur, phénomène nécessaire à l'attachement de l'ARN polymérase.

La présence de cette protéine empêche donc la transcription des deux opérateurs gauche et droit (figure 3), qui sont spécifiques d'ARN messagers précoces. Ceci rend impossible la synthèse des protéines précoces, à l'exception du répresseur lui-même (47).

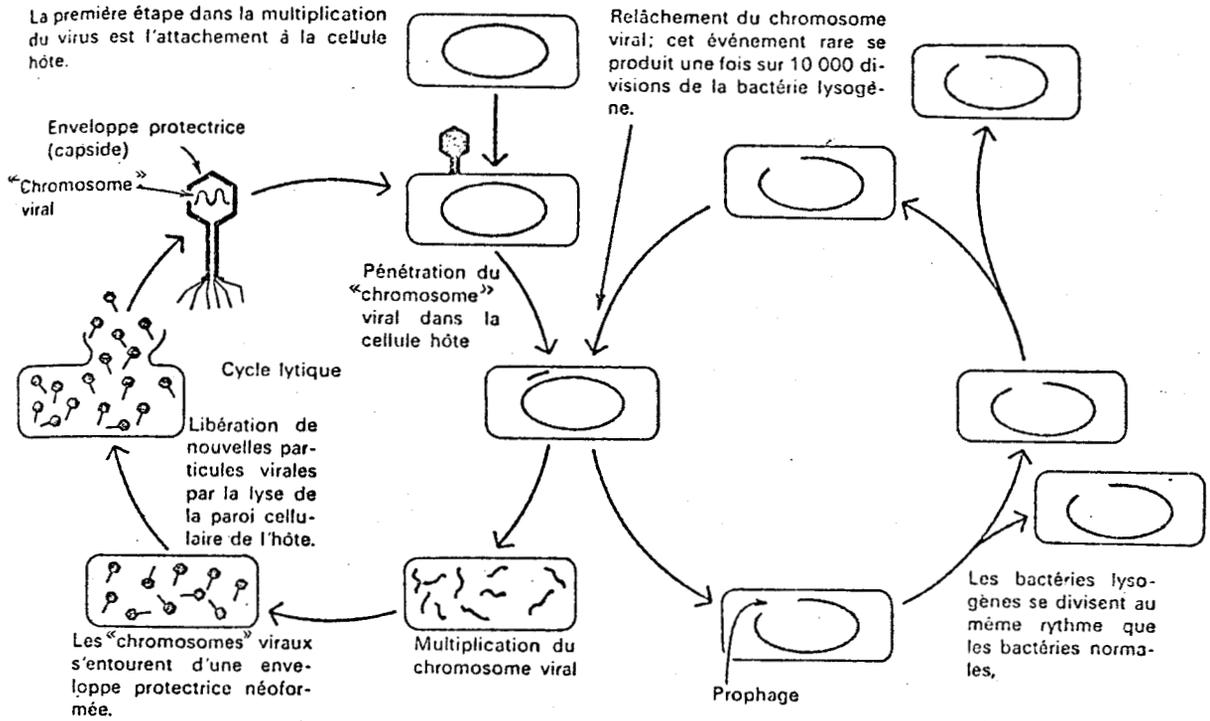


Figure 4 : Cycle d'un bactériophage tempéré. D'après WATSON (63).

Après l'entrée de l'ADN viral dans la cellule-hôte, il peut soit s'y multiplier à la manière d'un phage virulent, soit être transformé en prophage.

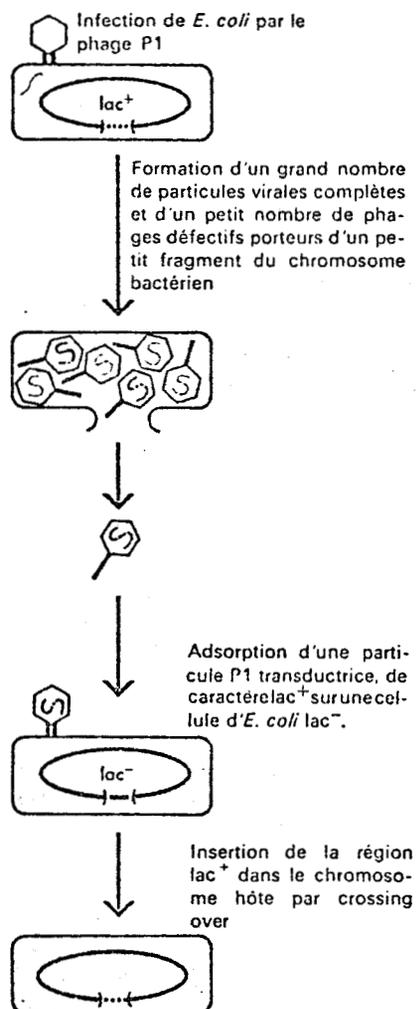


Figure 5 : La transduction : transfert du matériel génétique d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire de particules phagiques. D'après WATSON (63).

Dans certaines conditions (par exemple après traitement par les rayons ultraviolets), le represseur est inactivé ; les deux opérateurs précoces peuvent alors fonctionner. Parmi les protéines précoces, on trouve (63) :

- des enzymes nécessaires aux phénomènes de recombinaison qui vont permettre au prophage de se décrocher du chromosome bactérien.

- une protéine qui va inhiber le gène du répresseur (C I) ; elle est codée par le gène "tof" qui se situe juste à droite du gène C I .

- des enzymes qui vont permettre la replication de l'ADN de Lambda.

La synthèse de l'ARN messager commence au niveau des deux promoteurs mais s'arrête au bout d'une courte distance (63). Ceci est dû au fait que les signaux "stop" sont reconnus par le facteur de terminaison ρ de E. coli. Ce facteur est inhibé par le produit du gène phagique "N" appelé facteur d'anti-terminaison (62), ce qui permet la transcription de parties beaucoup plus longues. Ensuite viendra la transcription des gènes tardifs qui sont sous la dépendance d'un seul promoteur (63). Ainsi on a un cycle lytique qui se terminera par la lyse de la bactérie et la libération de nouveaux phages (figure 4).

Il peut arriver qu'une particule phagique incorpore une partie du chromosome de l'hôte. Lors d'une seconde infection, on peut voir s'exprimer chez la bactérie infectée, l'information génétique transférée par le phage. Ce phénomène est la transduction (figure 5).

c) Restriction-modification

Il existe plusieurs processus par lesquels une bactérie peut recevoir un ADN étranger. On peut citer la transformation, la conjugaison et la transduction.

Des bactéries s'opposent à cette intrusion grâce à un système de défense qui est la restriction-modification.

Ce phénomène est généralement dû à deux activités enzymatiques (4) : une endonucléase et une méthylase.

L'endonucléase est capable de couper l'ADN en des sites spécifiques à chaque système de restriction. La méthylase, quant à elle, permet la modification de certains sites de l'ADN par insertion de groupes "méthyl", ce qui empêche l'action de l'endonucléase. Elle permet donc à la bactérie qui la possède d'être protégée contre sa propre endonucléase et de reconnaître son ADN d'un ADN étranger.

La majorité des systèmes de restriction modification sont codés par des gènes chromosomiques bactériens. Cependant, il s'est avéré que des gènes plasmidiques (29) ou phagiques (24) peuvent eux aussi coder pour des enzymes de restriction.

Enfin, les endonucléases de restriction constituent actuellement un outil très important pour l'étude de l'ADN. Elles permettent en effet d'obtenir des segments d'ADN assez courts de façon à ce que l'on puisse en déterminer la séquence nucléotidique.

Ainsi, grâce à ces enzymes on a pu établir des cartes de restriction de plusieurs plasmides et d'ADN phagiques. De plus, elles ont permis la fabrication de molécules d'ADN hybrides entre acides nucléiques de provenances diverses.

**MATERIEL
ET
METHODES**

I. SOUCHES BACTERIENNES ET CONSERVATION

Nous avons utilisé pour ce travail 45 souches sauvages de Rhizobium meliloti.

L'origine et le phénotype de chaque souche sont mentionnés dans le Tableau I.

Elles sont conservées à -20°C dans du milieu RC fructosé à 1 p.100 et glycérolé à 20 p.100.

II. BACTERIOPHAGES DE LA COLLECTION

Nous nous sommes servi des bactériophages de Rhizobium meliloti de la collection du laboratoire, isolés de la terre par KRSMANOVIC-SIMIC et WERQUIN (32). Ces bactériophages sont conservés au congélateur dans du milieu RC fructosé à 1 p.100 et glycérolé à 50 p.100.

Dans le Tableau II, nous avons reporté les différents phages utilisés, ainsi que leurs souches sensibles respectives.

III. BACTERIOPHAGES TEMPERES

Des phages tempérés sont isolés à partir de souches lysogènes de R. meliloti. Leur nomenclature sera décrite au cours de l'exposé des résultats.

IV. MILIEUX DE CULTURE

a) <u>Milieu Rhizobium complexe (RC) (13)</u>	
K_2HPO_4	1 g
$\text{Mg SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	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

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121° pendant

20 min.

TABLEAU 1 : SOUCHES DE R. MELILOTI UTILISEES

<u>Souches sauvages</u>	<u>Origine</u>
M ₂ S	U.S.T.L.
M ₃ S	U.S.T.L.
M ₅ S	U.S.T.L.
M ₅ N ₁	U.S.T.L.
M ₉ S	U.S.T.L.
M ₁₀ S	U.S.T.L.
M ₁₁ S	U.S.T.L.
M ₁₂ S	R. I. O.
M ₁₃ S	U.S.T.L.
M ₁₄ S	U.S.T.L.
M ₁₅ S	U.S.T.L.
M ₁₈ S	U.S.T.L.
M ₁₉ S	U.S.T.L.
M ₂₀ S	U.S.T.L.
M ₂₂ S	U.S.T.L.
M ₂₃ S	U.S.T.L.
M ₂₆ S	U.S.T.L.
M ₂₇ S	U.S.T.L.
M ₂₈ S	U.S.T.L.
L ₅ (L ₅)	M. KOWALSKI (Pologne)
LB1	M. OBATON (I.N.R.A.)
Ls 2 A	M. OBATON (I.N.R.A.)
Ls 18	M. OBATON (I.N.R.A.)
Ls 5 B	M. OBATON (I.N.R.A.)
Ls 5 1 B	M. OBATON (I.N.R.A.)
2011 S	U.S.T.L.
44	C. I. A. T.
2001	R. C. R.
2003	R. C. R.
2004	R. C. R.
2009	R. C. R.
444	M. TRUCHET (Marseille)
445	Inconnu
F M 1	S. R. M. S.
Ve 26	S. R. M. S.



Souches sauvagesOrigine

U45	C.S.I.R.O.
Su 47	C.S.I.R.O.
M ₁ -5	U.S.T.L.
A 145	R.I.J.P.K.
A 161	R.I.J.P.K.
Ar 16	S.R.M.S.
M ₃₁	M. BONNIER (Gembloux)
Tu 20	S.R.M.S.
Wu 498	U.W.A.
Wu 499	U.W.A.

Souches mutantesOriginePhénotype

M ₅ N ₁ m2	U.S.T.L.	Ilv ⁻ Try ⁻
M ₅ N ₁ m3	U.S.T.L.	Ilv ⁻ Try ⁻ Arg ⁻ Fix ⁻
M ₅ N ₁ m4	U.S.T.L.	Ilv ⁻ Try ⁻ Arg ⁻ Fix ⁺
444 :: Tn 5.17	U.S.T.L.	Met ⁻ Km ^r
444 :: Tn 5.40	U.S.T.L.	Leu ⁻ Km ^r

Km^r : résistance à la kanamycine

Arg⁻, Ilv⁻, Leu⁻, Met⁻, Try⁻ : exigeants en arginine, isoleucine-valine, leucine, méthionine, tryptophane

Fix⁺ : efficiente

Fix⁻ : inefficiente

- C.I.A.T. Centre International Agricultura Tropical de COLOMBIA
- C.S.I.R.O. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation of Canberra, AUSTRALIA
- R.C.R. Rothamsted collection of Rhizobium (Harpenden Hert-fordshire, United Kingdom)
- R.I.O. Research Institute of Ontario, CANADA
- U.S.T.L. Université des Sciences et Techniques de Lille, FRANCE
- U.W.A. The University of Western Australia (Nedlands, AUSTRALIA)
- R.I.J.P.K. Rijksdienst voor de ijsselmeer polders Kampen, THE NEDEERLANDS
- S.R.M.S. Station de Recherches de Microbiologie du sol de Dijon, FRANCE.
- I.N.R.A. Institut National de Recherches Agronomiques, FRANCE.

BactériophagesSouches indicatrices

Ø1	M ₉ S
Ø2	M ₉ S
Ø3	M ₉ S
Ø4	M ₁₁ S
Ø5t	M ₁₁ S
Ø6	M ₁₁ S
Ø7	M ₁₁ S
Ø9	M ₁₁ S
ØL9	M ₉ S
Ø10	M ₁₂ S
Ø11	M ₁₃ S
Ø12	M ₁₁ S
Ø13	M ₁₄ S
Ø14	M ₁₃ S
Ø16	M ₁₈ S
Ø19	M ₁₂ S
Ø20	M ₁₂ S
Ø21	M ₁₂ S

TABLEAU 2 : Bactériophages isolés du sol et leurs souches bactériennes indicatrices.



Ce milieu est utilisé couramment pour la conservation des souches bactériennes et de bactériophages.

Le milieu, éventuellement gélosé à 15 g/l d'agar (RCG), est utilisé pour la numération des cellules bactériennes viables, et des particules phagiques infectieuses.

b) Source de carbone

Une solution aqueuse de fructose est préparée à la concentration de 40 p. 100 ; elle est utilisée à la concentration finale de 1 p. 100.

c) Milieu riche TY (Tryptone-yeast)

Bacto Tryptone (Difco).....	5 g
Extrait de levure (Difco).....	3 g
CaCl ₂ , 6 H ₂ O.....	1,3 g
Eau distillée q.s.p.....	1 l

Le pH est ajusté à 7,2-7,5 et le milieu est autoclavé pendant 20 min. à 121°C.

Ce milieu est utilisé pour la préculture des souches de Rhizobium meliloti.

d) Milieu R

Mg SO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NH ₄ NO ₃	0,5 g
Eau distillée q.s.p.....	1 l

pH 7,2 - 7,5. Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

Ce milieu, additionné de glucose à 1 p.100, de biotine à 0,01 µg/ml et de thiamine à 0,5 µg/ml (concentrations finales), peut servir comme milieu minimum de croissance.

Ce milieu, éventuellement gélosé (RG) avec 15 g/l d'Agar, est utilisé pour la sélection de clones prototrophes soit après réversion soit après transduction.

e) Milieu gélosé pour bactériophages

Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O.....	0,45 g
Na ₂ SO ₄ , 10 H ₂ O.....	0,06 g
KNO ₃	0,06 g
Fe Cl ₃	0,01 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O.....	0,06 g
Mg Cl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,10 g
Mannitol.....	10 g
Agar (Difco).....	7,5 g
Eau distillée q.s.p.....	1 l
pH 7. Stérilisation à 105°C pendant 30 min.	

Ce milieu est utilisé pour la numération des particules phagiques infectieuses.

V. MULTIPLICATION DES BACTERIOPHAGES

a) Sur milieu gélosé

Cette technique dite de "la double couche" est due à ADAMS (1).

Les suspensions phagiques conservées au réfrigérateur à + 4°C sont diluées au 1/10. Si la conservation a été faite à -20°C, la dilution est inutile. A 0,1 ml de la suspension phagique, on ajoute 0,3 ml d'une culture bactérienne sensible en phase exponentielle de croissance. Après 20 min. de contact à la température du laboratoire (ceci pour permettre une adsorption convenable des bactériophages sur les bactéries), on ajoute 3 ml de gélose bactériophage préalablement fondue au bain-marie bouillant et maintenue à 50°C. Le tout est ensuite coulé en boîtes de Petri à la surface du milieu RC gélosé et fructosé à 1 p.100. L'incubation est réalisée à 28°C pendant

environ 15 heures. La couche superficielle est ensuite récupérée à l'aide d'un étaleur de verre stérile et placée dans un tube à centrifuger (5 à 6 boîtes par tube). On ajoute dans chaque tube 7 à 9 ml de RC fructosé à 1 p.100 et l'ensemble est homogénéisé, par brassage à l'aide d'une pipette et laissé pendant 20 min. à la température du laboratoire.

On centrifuge ensuite à 12000 g pendant 15 min. Le surnageant contenant les phages est débarassé définitivement des débris bactériens par filtration sur membrane Millipore de porosité 0,45 μm ou 0,22 μm . Après dosage de la suspension phagique (voir la méthode plus loin), elle est conservée à + 4°C. Si la conservation doit durer plus longtemps, la suspension phagique est glycérolée à 50 p.100 puis placée à -20°C.

b) En milieu liquide

Pour obtenir un lysat en phase liquide, 35 ml d'une suspension phagique titrant entre $5 \cdot 10^9$ et 10^{10} particules phagiques/ml sont ajoutés à 750 ml de la culture bactérienne en phase exponentielle de croissance.

L'évolution de la lyse bactérienne est suivie au spectrophotomètre par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm. Lorsque la lyse est complète (ce qui se traduit par une baisse de la densité optique), les débris bactériens ainsi que les bactéries survivantes sont éliminés par centrifugation pendant 15 min. à 12000 g ; le surnageant contenant les bactériophages est filtré et dosé.

c) En fermenteur

Les cultures sont effectuées en fermenteur "Setric", type F 7 T (Toulouse), à agitation magnétique, de 4,5 litres.

On peut à tout instant contrôler la température, le pH, le débit d'air et la vitesse d'agitation dans le fermenteur. De même, on peut enregistrer, sur papier, les variations instantanées de pH et du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu de culture.

1) Paramètres de la fermentation

Pour toutes nos expériences, nous avons adopté les valeurs suivantes :

- une température de 30°C. Il s'agit en fait de la température optimale de croissance de Rhizobium.

- un débit d'air de 60 litres par heure permet d'avoir les meilleurs résultats.

- la vitesse d'agitation est fixée à 300 tours/min.

En ce qui concerne le pH, nous avons observé qu'il varie dans la zone de croissance optimale de Rhizobium, alors nous avons jugé inutile de le réguler.

- le pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu de culture est fixé en début d'expérience, à 80 ou 90 p. 100

2) Préparation et ensemencement du fermenteur

La cuve du fermenteur est remplie de 2,5 litres de milieu RC et stérilisée par autoclavage à 120°C pendant 30 min.

Le milieu est ensuite complété par addition de :

- 75 ml de fructose à 40 p.100 pour avoir une concentration finale de 1 p.100.

- 75 ml de peptones à 10 p. 100 pour obtenir une concentration de 0,25 p.100.

- 30 ml de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ à 1 p.100 pour avoir une concentration en ions Mg^{++} de 0,5 mM.

- et 30 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ à 0,6 p.100 pour obtenir une concentration de 0,4 mM en ions Ca^{++} .

Il est ensuite ensemencé avec 300 ml d'une préculture de 15 heures de Rhizobium meliloti.

La suspension phagique (150 ml, titrant entre $5 \cdot 10^9$ et 10^{10} particules phagiques infectieuses/ml), est injectée dans le fermenteur après 2 heures à 2 heures 30 min. de culture, temps nécessaire aux cellules bactériennes pour parvenir en phase exponentielle de croissance. L'injection des phages est immédiatement suivie d'un arrêt de 20 min. de l'agitation et de l'aération pour permettre aux particules phagiques infectieuses de s'adsorber convenablement sur les bactéries. Ceci se traduit sur les graphiques par l'apparition d'un pic reflétant la baisse de la teneur d'oxygène dissous dans le milieu.

3) Appréciation de la lyse de la culture

L'évolution de la lyse est suivie de deux façons différentes :

. les bactéries, en se lysant, entraînent une baisse de la densité optique (D.O.) de la culture bactérienne. Ainsi, des prises d'échantillons successives et la mesure de leur D.O. à 600 nm nous permettent de suivre l'évolution de la lyse.

. les variations du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu de culture sont détectées par une sonde à oxygène dissous, et enregistrées sur papier. Le débit d'air apporté dans le fermenteur restant constant durant toute la fermentation, la lyse de la culture bactérienne s'accompagne d'une augmentation du taux d'oxygène dissous dans le milieu.

Ces deux moyens d'observation ont été simultanément utilisés afin d'avoir une bonne appréciation du phénomène.

Cette technique de production de phages en fermenteur, présente deux avantages indéniables. Outre l'obtention d'une grande quantité de phages (10^{12} à 10^{13}), qui en fait une bonne méthode préparative, elle constitue un outil analytique intéressant. En effet, l'analyse des graphiques représentant l'évolution du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu de culture, nous permet de faire des comparaisons entre différents phages et d'avoir des renseignements sur la parenté entre certains phages.

VI. DENOMBREMENT DES PARTICULES PHAGIQUES INFECTIEUSES

La technique retenue est celle décrite par ADAMS (1). La suspension phagique à doser est soumise à une série de dilutions en progression géométrique de raison 10 (10^{-1} à 10^{-9}). A 0,3 ml de la culture bactérienne sensible en phase exponentielle de croissance, on ajoute 0,1 ml des dilutions choisies. Après 20 minutes à la température du laboratoire, on ajoute 3 ml de gélose bactériophage fondue et maintenue à 50°C. L'ensemble est ensuite coulé sur milieu RC gélosé et fructosé à 1 p. 100, puis mis à incuber à 28°C pendant environ 15 h. Les bactéries en se multipliant, forment un tapis. Une bactérie infectée, après lyse, libère des phages qui vont à leur tour infecter les bactéries voisines et ainsi de suite. Il se forme alors une plage de lyse, visible à l'oeil nu.

Un phage est à l'origine d'une plage de lyse. On peut donc déterminer facilement le titre de la suspension phagique initiale en multipliant le nombre de plages de lyse par le facteur de dilution. Ce titre est ramené en nombre de particules phagiques infectieuses par millilitre, encore appelées "unité formant plage" (ufp).

VII. CONCENTRATION DES SUSPENSIONS PHAGIQUES

a) Tampons

. Tampon pour bactériophages

La composition de cette solution a été mise au point par MANNASSE (41).

Na ₂ HPO ₄	1,42 g
Na H ₂ PO ₄	1,2 g
Mg SO ₄	2,47 g
Eau distillée q.s.p.....	1 l

Le pH est ajusté à 7,0 et la solution est filtrée sur membrane Millipore de porosité 0,22 μ.

. Tampon de dialyse

Ce tampon a été mis au point par WEBER et OSBORN (64).

Na ₂ HPO ₄	24,52 g
Na H ₂ PO ₄	7,01 g
Eau distillée q.s.p.....	1 l

Le pH est ajusté à 7,0.

b) Mode opératoire

Cette technique due à YAMAMOTO (67), est basée sur la propriété qu'ont les phages de précipiter en présence de chlorure de sodium et de polyéthylène glycol (P.E.G.).

Les différentes étapes du protocole expérimental sont les suivantes :

- 1) La culture de R. meliloti (réalisée en fermenteur) lysée par le phage choisi est laissée à + 4°C pendant une nuit.
- 2) Centrifugation à 12000 g pendant 15 min. pour éliminer les débris bactériens et les bactéries survivantes.

- 3) Digestion de l'ADN et de l'ARN bactériens libres par addition de DNase et RNase à raison de 1 μ g de chaque par ml de lysat. Cette opération est réalisée à 37°C pendant une heure.
- 4) Centrifugation à 12000 g pendant 15 min.
- 5) Le surnageant est additionné de NaCl afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 M, puis laissé une nuit à + 4°C
- 6) Centrifugation à 12000 g pendant 15 min.
- 7) Addition de P.E.G. 6000 pour avoir une concentration de 8 p.100. La suspension phagique est laissée plusieurs jours à + 4°C ; temps nécessaire à la précipitation des bactériophages.
- 8) Centrifugation à 2000 g pendant 15 min. du précipité. Le surnageant est écarté.
- 9) Le culot est dissous dans 10 ml de tampon bactériophage.
- 10) Centrifugation pendant 15 min. à 12000 g. Le culot est écarté.
- 11) Le surnageant est centrifugé à 78000 g pendant 90 min. (34000 t. min.⁻¹, rotor 60 Ti).
- 12) Le culot contenant les phages est dissous dans 14 ml de tampon pour bactériophages.
- 13) Après addition d'environ 9,3 g de CsCl pour obtenir un indice de réfraction de 1,379 mesuré à 25°C (réfractomètre d'ABBE), la solution est centrifugée à 100000 g pendant 15 heures (33000 t. min.⁻¹, Rotor SW 50.1).

	EFFET MUTAGENE	EFFET CARCINOGENE	EFFET INDUCTEUR	REFERENCES
Méthyl bis - (B-chloroéthyl) - amine	+	+	+	(40)
H ₂ O ₂ dans un milieu organique	+	-	+	(40)
Tertio-butyl peroxyde	+	+	+	(40)
2,4,6 - tris-éthylène-imino-1,3,5 - triazine	+	+	+	(40)
Butadiène - 1,3 - diépoxyde	+	+	+	(40)
N - méthyl - N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)	+	+	+	(52)
Mitomycine C (MC)	+	+	+	(44)
8 - méthoxy psoralène	+	N D	+	(55)

TABLEAU 3 : Quelques agents inducteurs chimiques : leurs effets mutagène et carcinogène

+ : effet positif
 - : effet négatif
 N D : effet non déterminé.



La bande visible contenant les bactériophages est récupérée par ponction du tube par le fond. Elle est ensuite dialysée pendant 48 heures à + 4°C contre du tampon phosphate dilué au 1/10, afin d'éliminer le chlorure de cesium.

La suspension phagique concentrée ainsi obtenue est dosée et conservée à -20°C.

VIII. MISE EN EVIDENCE DE PHAGES TEMPERES ET RECHERCHE DE LEURS SOUCHES INDICATRICES

a) Agents inducteurs

Les bactéries lysogènes (qui possèdent un prophage) peuvent le libérer spontanément. On peut accentuer ce phénomène par l'action d'agents physiques ou chimiques appelés inducteurs. Parmi les premiers, on peut citer : les chocs thermiques, les rayons ultraviolets, les rayons X, etc... ; les seconds sont nombreux ; la plupart d'entre eux sont cancérigènes. Nous en avons répertorié quelques uns dans le tableau 3.

Pour nos essais préliminaires, nous avons soumis des souches de R. meliloti aux rayons ultra-violets, à la mitomycine C, et à la N-méthyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG).

1) Les rayons ultra-violets (UV)

Dix millilitres d'une culture de R. meliloti de D.O. 0,2 sont irradiés par une lampe germicide à UV de type "Mazda" TG 15 d'une puissance de 15 Watts. La culture est ensuite incubée à 30°C pendant environ 15 heures, à l'obscurité pour éviter le phénomène de photoréactivation.

On procède ensuite à une centrifugation à 12000 g pendant 15 min. et on filtre le surnageant sur membrane Millipore de porosité 0,22 µm.

2) Action de la mitomycine C (MC)

A une culture de R. meliloti de turbidité initiale D.O. 0,2, on ajoute de la mitomycine C à différentes concentrations. Le tout est mis à 30°C pendant une heure, lavé deux fois avec du milieu TY puis remis à 30°C pendant 15 heures. La culture est ensuite centrifugée puis filtrée dans des conditions identiques aux précédentes.

3) Traitement à la N-méthyl-N-Nitro-N-Nitrosoquanidine (NTG)

Cette substance est surtout réputée pour son action mutagène ; or, il s'avère qu'elle possède aussi un pouvoir inducteur sur des bactéries lysogènes (52).

A 5 ml d'une culture de R. meliloti de D.O. 0,3, on ajoute 1 ml d'une solution de NTG dans du tampon Tris-maléique (600 µg de NTG par ml de tampon Tris 90 mM, acide maléique 50 mM ; pH 6,65). L'ensemble est incubé à 30°C pendant 30 min.. La suite des opérations s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment.

b) Recherche de souches lysogènes et de souches indicatrices

Toutes les souches de R. meliloti de notre collection (Tableau 1) ont été traitées par les UV, la MC et la NTG. Chaque souche est traitée au début comme souche lysogène et indicatrice.

Les bactériophages produits sont détectés selon la technique du "spot". Elle consiste à déposer une goutte de surnageant de chaque souche traitée sur divers tapis bactériens de souches présumées indicatrices. Après une incubation à 28°C pendant environ 15 heures, les boîtes sont examinées. La présence de phages dans un surnageant donné, va se traduire par l'apparition d'une zone de lyse

claire sur le tapis bactérien sensible.

Le phage tempéré, ainsi détecté, est multiplié puis dosé sur sa souche indicatrice.

Ainsi, par cette technique, on met simultanément en évidence la souche lysogène et les souches sensibles.

IX. MISE EN EVIDENCE DE L'EFFET INHIBITEUR DES IMMUN-SERUMS SUR LES PHAGES

En 1921, BORDET et CIUCA (9) ont montré que l'injection de suspensions phagiques à un lapin entraîne la production d'anticorps sériques chez ce dernier. Ces derniers sont capables de neutraliser non seulement le phage qui leur a donné naissance mais aussi des phages apparentés.

Les immun-serums ont été obtenus par WERQUIN et coll. lors de travaux antérieurs (65).

La suspension phagique à étudier est diluée de façon à avoir environ 10^7 ufp/ml. A 0,9 ml d'une dilution connue de l'immun-serum choisi, on ajoute 0,1 ml de la suspension phagique diluée. Après 30 min. à 37°C, la réaction est arrêtée par dilution dans du milieu RC fructosé maintenu à + 4°C. Le nombre de particules phagiques infectieuses non inhibées est déterminé par la méthode de la double couche d'ADAMS (1).

A partir de cette expérience, nous pouvons calculer le pourcentage d'inhibition, ainsi que la constante d'inhibition (K) de l'immun-serum (1)..

Après intégration de l'équation

$$- \frac{dp}{dt} = \frac{kp}{D} \quad \text{on obtient} \quad K = 2,3 \frac{D}{t} \text{ Log } \frac{P_0}{P} .$$

où

Po = nombre de phages initiaux

P = nombre de phages au temps t (min.)

D = dilution utilisée de l'immun-serum

t = durée de la réaction phage-immun-serum.

Il faut cependant noter que cette formule n'est valable que pour une inhibition supérieure à 90 p. 100.

X. DETERMINATION DU POURCENTAGE DE PHAGES ADSORBES

La culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ainsi que la suspension phagique, sont diluées de façon à avoir respectivement 10^8 bactéries/ml et 10^7 ufp/ml. L'infection étant réalisée à raison d'une particule infectieuse pour 10 bactéries, la multiplicité d'infection est ici égale à 0,1. Des concentrations finales de 0,4 mM et 0,5 mM respectivement en Ca^{++} et Mg^{++} sont nécessaires pour une bonne adsorption des phages sur les bactéries (7).

Après 30 min. à la température du laboratoire, on centrifuge pendant 15 min. à 12000 g pour éliminer les bactéries et donc les phages adsorbés. Le surnageant est ensuite filtré sur une membrane Millipore de porosité 0,22 μ m. Les particules phagiques infectieuses libres (non adsorbées) sont dénombrées comme précédemment. Connaissant le nombre de phages introduits au départ, on peut calculer le pourcentage d'adsorption des phages.

XI. DETERMINATION DE LA PERIODE DE LATENCE ET DU RENDEMENT
INDIVIDUEL MOYEN DES BACTERIES.

La méthode que nous avons adoptée dans notre travail est celle de la multiplication phagique en une seule étape ou "single step growth experiment" (18). En effet, cette méthode nous permet de déterminer simultanément la période de latence et le nombre moyen de phages libérés par bactérie (rendement individuel moyen) ou encore "burst size".

Nous l'avons adaptée à notre matériel et appliquée d'une part après infection et d'autre part, après induction du développement d'un prophage par les rayons ultraviolets.

a) Après infection

Nous avons utilisé une culture sensible de R. meliloti en phase exponentielle de croissance de D.O. 0,11, soit environ 10^8 bactéries/ml. La suspension phagique est diluée pour obtenir 10^8 ufp/ml. La dilution de l'immun-sérum est choisie de telle sorte qu'elle soit capable d'inhiber le phage à un taux supérieur à 90 p. 100 en 5 min. La suite du protocole expérimental est rapportée dans le tableau suivant:

Tube n°	Temps (min.)	Manipulations
1 : Adsorption ⁽¹⁾	0	0,1 ml phage + 0,9 ml bactérie
2 : immun serum ⁽²⁾	10	0,1 ml tube 1 + 0,9 ml serum
3 : PTC ⁽³⁾ : dilution	15	0,1 ml tube 2 + 9,9 ml TY à 0°C ⁽⁴⁾
4 : STC ⁽⁵⁾ : dilution	16	0,1 ml tube 3 + 0,9 ml TY
5 : TTC ⁽⁶⁾ : dilution	17	0,1 ml tube 4 + 0,9 ml TY

(1) dans nos conditions expérimentales, 10 min. suffisent pour l'adsorption d'au moins 90 p.100 des phages introduits.

(2) la dilution choisie de l'immun serum est capable d'inhiber les phages à un taux supérieur à 90 p.100 en 5 min.

(3) PTC : premier tube de croissance

(4) la dilution se fait dans du milieu TY à 0°C pour arrêter la réaction phage-immun-serum.

(5) STC : second tube de croissance

(6) TTC : troisième tube de croissance.

Les tubes 3, 4 et 5 sont incubés à 30°C.

A des intervalles de temps réguliers, des échantillons de 0,1 ml des tubes précités sont mélangés avec 0,3 ml de la souche bactérienne sensible et 3 ml de gélose pour bactériophage. Le tout est ensuite coulé sur milieu RCG fructosé à 1 p.100. Après 15 h d'incubation à 28°C, les plages de lyse sont comptées .

Dans les premières boîtes (correspondant aux premiers prélèvements), les plages de lyse observées sont uniquement dues aux bactéries infectées qui ont été lysées dans la boîte. Leur nombre (N) reste constant pendant toute la période de latence après quoi les bactéries vont commencer à libérer des phages (dans le tube). Ceci se traduit sur les boîtes, par un accroissement brusque du nombre de plages de lyse, lequel va augmenter continuellement pendant un certain temps, puis devenir constant à la fin de la lyse des bactéries infectées. Le nombre de plages de lyse (N') après stabilisation, correspond au nombre de phages libérés par l'ensemble des bactéries infectées (N). Ainsi, le rapport $\frac{N'}{N}$ corrigé par les facteurs de dilution, nous donne la valeur du nombre moyen de particules phagiques libérées par bactérie (rendement individuel moyen).

b) Après induction par les UV

Une culture de la souche lysogène choisie est lavée 3 fois avec du milieu TY puis diluée pour obtenir une DO de 0,21 correspondant à environ $2 \cdot 10^8$ bactéries/ml. A 0,5 ml de cette dilution, on ajoute 4,5 ml de l'immun-serum dilué. Après 5 min. à 37°C, on centrifuge à 4000 g pendant 15 min. à 0°C pour arrêter la réaction. Le culot est repris dans 10 ml de TY puis centrifugé dans des conditions identiques aux précédentes. Le culot est ensuite remis en suspension dans un volume de TY permettant d'avoir une D.O. finale de 0,11, soit environ 10^8 bactéries/ml. Un échantillon est filtré et le nombre de phages libres est déterminé. La culture est ensuite exposée pendant six secondes à une dose de rayons ultraviolets de 80 ergs/mm².s, mesurée à l'aide d'un dosimètre (L.A.P.-Paris). Après une série de dilutions, les tubes contenant les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} sont incubés à 30°C.

A des intervalles de temps réguliers, on prélève 0,1 ml de chaque tube qu'on mélange avec 0,3 ml de la souche sensible (au prophage choisi) ; après addition de 3 ml de gélose pour bactériophage, l'ensemble est coulé à la surface de milieu RCG fructosé à 1 p.100 puis incubé à 28°C pendant 15 h.

Les rayons ultraviolets vont induire le développement du prophage à l'intérieur de la bactérie lysogène. On pourra alors, déterminer la période de latence (temps s'écoulant entre le décrochement du prophage du chromosome bactérien et la libération de nouvelles particules phagiques par la bactérie) qui correspond dans notre expérience, à l'intervalle de temps qui sépare l'irradiation et l'augmentation soudaine du nombre de plages de lyse. Le nombre moyen de plages de lyse observées pendant cette période correspond aux bactéries induites. Le rendement individuel moyen après induction se calcule de la même façon qu'après infection (voir paragraphe précédent).

XII. TRANSDUCTION

a) Préparation de lysats

La souche donatrice de R. meliloti sensible est infectée en milieu liquide par le phage tempéré choisi.

Après la lyse de la culture bactérienne, on ajoute 0,5 ml de chloroforme et on laisse à + 4°C pendant une nuit. Le lendemain, le lysat est débarassé des débris bactériens et des bactéries survivantes par centrifugation à 12000 g pendant 15 min.. Les acides nucléiques bactériens libres sont éliminés par action simultanée de la DNase et de la RNase à 10 µg/ml pendant une heure à 37°C. La suspension phagique est ensuite filtrée sur membrane Millipore de porosité 0,22 µm puis concentrée 100 fois grâce à deux centrifugations successives à 78000 g pendant 90 min.. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans du tampon phosphate et son titre phagique déterminé par la méthode d'ADAMS (1).

b) Technique de transduction

La souche réceptrice de R. meliloti est cultivée dans du milieu TY jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0,2. La culture est ensuite lavée trois fois avec du milieu R puis concentrée pour avoir environ 5 à 10 . 10⁸ u.f.c./ml (u.f.c. : unité formant colonie).

L'infection de la culture réceptrice se fait par une dilution de lysat de manière à avoir une multiplicité d'infection (m.o.i.) comprise entre 1 et 5 (u.f.p/u.f.c). Ceci s'effectue en présence de 1 mM de Ca⁺⁺.

Après 20 min. à la température du laboratoire, on ajoute de l'immun-serum et l'ensemble est incubé à 30°C pendant 2 h. On procède alors aux dilutions, puis des quantités aliquotes de 0,1 ml sont coulées sur milieu sélectif.

L'incubation se fait à 30°C pendant une semaine. Notons, enfin, que parallèlement à cette expérience, nous réalisons des témoins avec la souche réceptrice seule pour déterminer la fréquence de mutation spontanée ou de réversion.

c) Préparation de particules phagiques alourdis à la 5-bromouracile

La méthode que nous avons adoptée, s'inspire de travaux antérieurs de SIK et coll. (53).

La souche donatrice est cultivée pendant 15 h dans du milieu TY additionné de 20 µg/ml de 5-bromouracile. La culture est alors diluée 10 fois dans le même milieu puis incubée à nouveau 2 heures à 30°C. Après addition de thymidine pour obtenir une concentration finale de 100 µg/ml, on infecte la culture bactérienne en respectant une multiplicité d'infection de 1 à 5. Le tout est laissé à la température du laboratoire pendant 20 min.

L'incubation est ensuite poursuivie à 30°C jusqu'à l'obtention de la lyse des bactéries sensibles ; le phénomène se traduit par la baisse de la turbidité de la culture.

Le lysat est ensuite purifié comme précédemment.

d) Centrifugation en gradient de chlorure de césium

Un millilitre de la suspension phagique purifiée et concentrée (10^{11} u.f.p./ml), est déposé au sommet de 4 ml d'une solution de chlorure de césium ayant un indice de réfraction de 1,379 mesuré à 25°C.

On procède alors à une centrifugation à 100 000 g pendant 48 h (33 000 tours/min. Rotor Spinco SW 50.1).

Le tube est ponctionné par le fond, et des fractions de deux gouttes sont collectées.

La pente du gradient de densité est déterminée par lecture des indices de réfraction et calcul des densités relatives de fractions choisies à partir de la formule suivante :

$$\rho^{25^{\circ}\text{C}} = (10,8601 \times \text{IR}) - 13,4974$$

où

- $\rho^{25^{\circ}\text{C}}$ est la densité relative à 25°C (g/cm³)
- IR est l'indice de réfraction à 25°C

Les fractions sont alors diluées convenablement dans du tampon phosphate pour bactériophages, puis examinées pour la présence de particules phagiques infectieuses (u.f.p.) et d'éventuelle activité transductrice.

**RESULTATS
ET
COMMENTAIRES**

CHAPITRE I

RECHERCHE DE SOUCHES LYSOGENES ET DE SOUCHES INDICATRICESa) Choix de l'agent inducteur1) Mitomycine C (MC)

Parmi les souches de R. meliloti traitées par la MC, la M₂₆S, la L₅ (L₅), la M₅N₁ et la M₂₀S se sont révélées porteuses d'un prophage.

Le Tableau 4 ainsi que la figure 6 montrent l'évolution de la turbidité d'une culture de la M₅N₁, en présence de différentes concentrations de MC. Nous remarquons que la lyse de la culture bactérienne est provoquée pour une dose supérieure ou égale à 1 µg/ml.

Nous constatons que des concentrations en MC de 5 ou 10 µg/ml provoquent une lyse importante de la culture bactérienne. Mais après dénombrement des particules phagiques contenues dans les surnageants des différents lysats, il s'avère que la lyse n'est pas due uniquement à l'induction de prophages mais surtout, à l'action létale de la MC sur les bactéries, sans production de phages.

2) N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoquanimidine (NTG)

Contrairement à son pouvoir inducteur mis en évidence chez les bactéries glutamiques (52), la NTG est inefficace vis à vis des souches de R. meliloti. Son action inductrice est nulle, même sur des souches s'étant révélées lysogènes par traitement aux UV ou à la MC.

3) Les rayons ultraviolets (UV)

Après plusieurs essais préalables, nous avons choisi de réaliser nos inductions en utilisant les rayons UV. En effet, cet agent présente plusieurs avantages. Outre son coût faible, son utilisation constitue une méthode rapide, par comparaison avec la MC. Par ailleurs, plusieurs souches non

CONCENTRATION EN MC µg/ml	T E M P S E N H E U R E S						
	0	1	2	3	4	5	6
0	0,23	0,29	0,33	0,45	0,53	0,65	
0,1	0,23	0,3	0,33	0,42	0,5	0,57	
0,5	0,23	0,27	0,31	0,43	0,49	0,48	
1	0,23	0,27	0,32	0,4	0,23	0,18	
5	0,23	0,27	0,31	0,34	0,25	0,23	
10	0,23	0,25	0,29	0,27	0,28	0,25	

TABLEAU 4 : Evolution de la densité d'une culture de la souche lysogène M₅N₁ en fonction du temps en présence de différentes concentrations en mitomycine C.



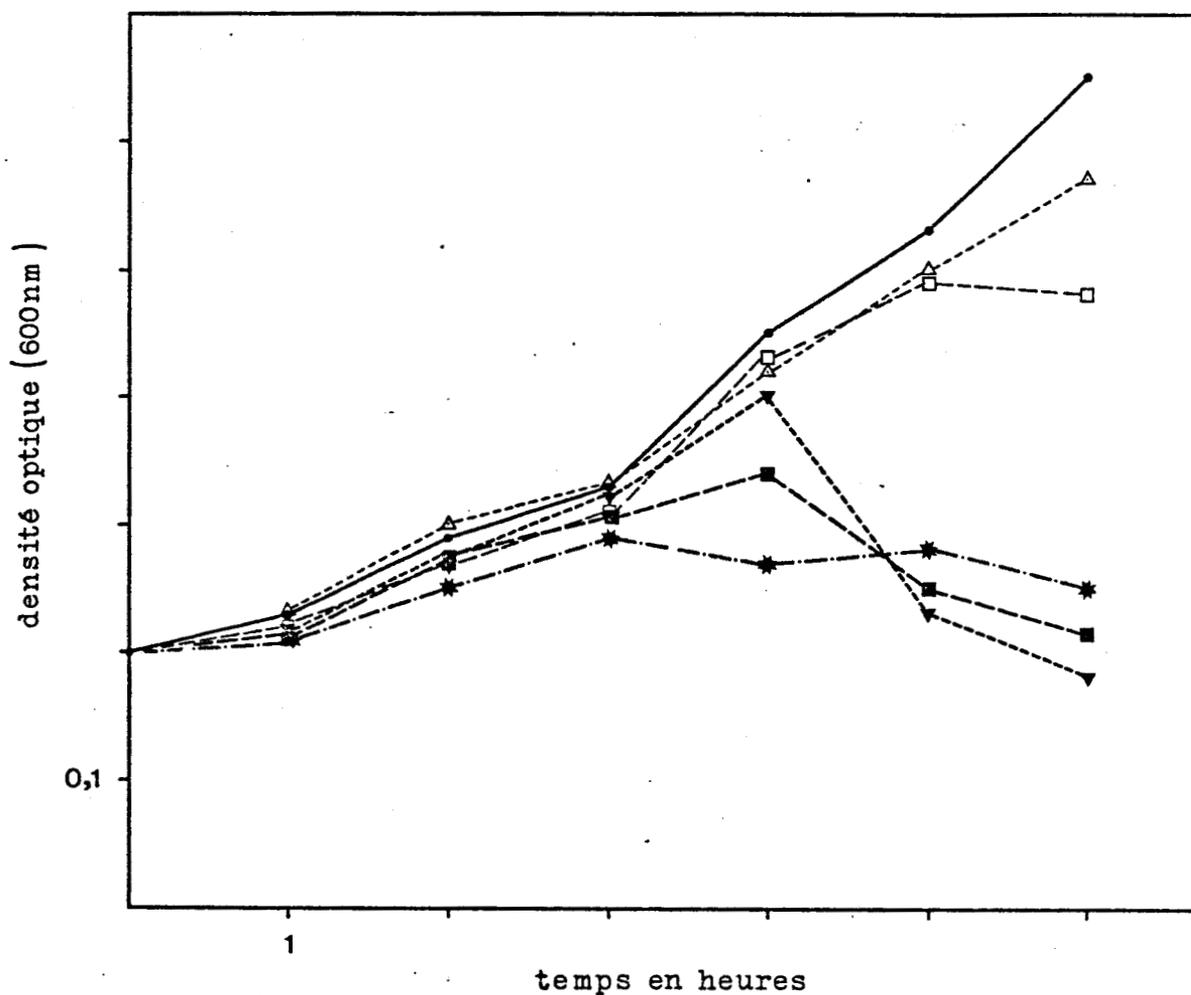


Figure 6 : Evolution de la densité optique (600 nm) d'une culture de la souche M_5N_1 en fonction du temps, en présence de différentes concentrations en MC :

- culture témoin sans MC
- △- - -△ 0,1 µg/ml
- - -□ 0,5 µg/ml
- ▼- - -▼ 1 µg/ml
- - -■ 5 µg/ml
- *- - -* 10 µg/ml



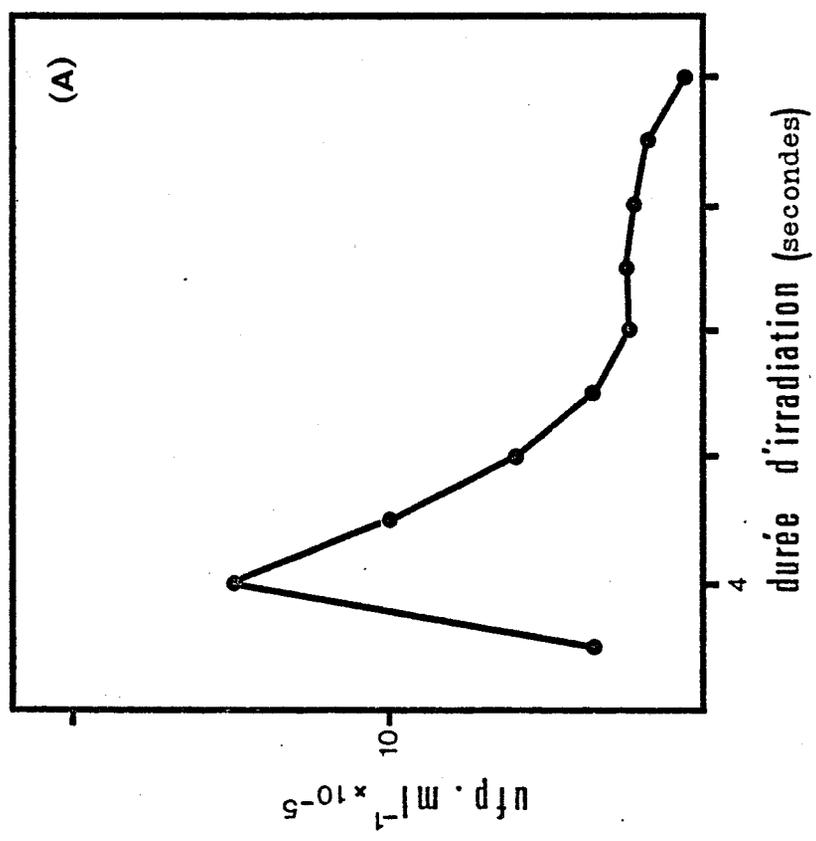
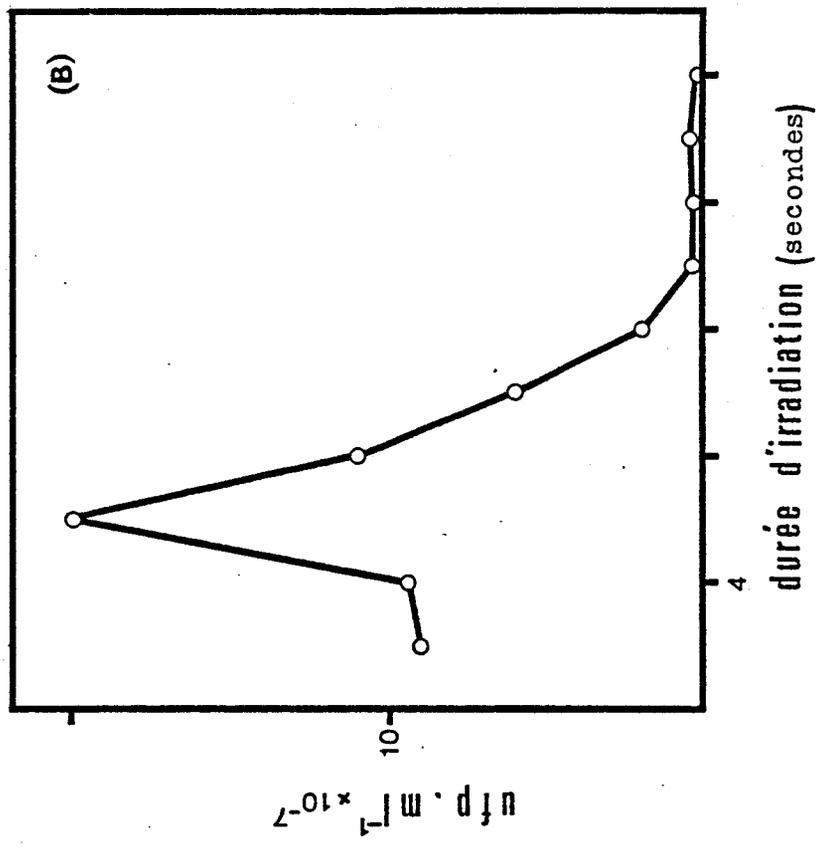


Figure 7 : Influence de la durée d'irradiation sur le nombre de particules phagiques infectieuses produites par les souches lysogènes M₅N₁ (A) et Ls5B (B)



inductibles par la MC, le sont par action des rayons UV.

Les conditions d'induction sont consignées dans le paragraphe suivant.

b) Mise au point des conditions optimales d'induction

Après le choix de l'agent inducteur, il nous a fallu déterminer les conditions optimales de son utilisation. Pour ce faire, nous avons étudié tout particulièrement la dose UV et le milieu de culture.

1) Dose UV

Nous avons soumis les souches lysogènes M_5N_1 et Ls 5 B à une dose de 80 ergs/mm².s, pendant des périodes différentes de 2, 4,, 20 s. Après une incubation d'environ 15 heures à 30°C, les phages contenus dans les surnageants des cultures sont dénombrés.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 7 , le nombre de phages libérés par la culture varie considérablement en fonction du temps d'exposition et présente un optimum à 4 s pour la M_5N_1 et 6 s pour la Ls 5 B. Au delà de ces valeurs, on note une baisse du nombre de phages produits.

Nous avons donc choisi, pour nos expériences, de soumettre les souches bactériennes à une dose d'UV de 80 ergs/mm².s pendant 6 s.

2) Milieu de culture

Les cultures des souches lysogènes M_{20}^S et M_5N_1 sont réalisées dans trois milieux différents : 2 milieux complexes, TY et RC fructosé à 1 p.100 et le milieu minimum R complété avec du fructose (1 p.100), la vitamine H (0,5 µg/ml) et la vitamine B₁ (10 µg/ml). Après irradiation et incubation des cultures, le rendement de l'induction est évalué par dénombre-

ment des particules phagiques produites dans chaque milieu.

Les résultats consignés dans le tableau suivant montrent que le nombre de phages obtenus est maximum lorsque la culture et l'induction sont réalisées dans le milieu TY.

		milieux de culture		
		TY	RC Fru.	R. Fru. H B ₁
Nbre d'ufp produites/ml de culture	M ₂₀ S	9. 10 ⁹	7,6.10 ⁹	0,8.10 ⁹
	M ₅ N ₁	24. 10 ⁵	20 .10 ⁵	2,5.10 ⁵

Tableau 5 : Influence du milieu de culture sur le nombre de particules phagiques produites par les souches lysogènes M₂₀S et M₅N₁.

c) Mise en évidence de phages tempérés

Les conditions optimales d'induction étant déterminées, nous avons exposé toutes les souches de R. meliloti de la collection du laboratoire aux rayons UV, et avons recherché les phages dans les surnageants. Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le tableau 6 .

1) Nomenclature des phages tempérés

Les phages tempérés que nous avons isolés, sont désignés selon la méthode modifiée de JARVIS (30) .

Exemple : le phage tempéré issu de la souche lysogène M₂₀S, est désigné par la lettre \emptyset , suivie du numéro de la souche, soit :

\emptyset M₂₀

	M2S	M3S	M5S	M5N1	M9S	M10S	M11S	M12S	M13S	M14S	M15S	M18S	M19S	M20S	M22S	M23S	M26S	M27S	M28S	L5(L5)	LB1	Ls2A	Ls1P
M2S																							
M3S																							
M5S																							
M5N1	-	+	-	-	qp	-	-	-	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
M9S																							
M11S	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	-	+	-	+	-	-	T	-	-	-	-	-
M12S																							
M13S																							
M14S	-	+	-	-	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M15S																							
M18S																							
M19S																							
M20S	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M22S																							
M23S	-	-	-	-	qp	-	-	-	+	-	-	-	qp	-	qp	-	-	+	-	-	-	-	-
M26S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M27S	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M28S																							
L5(L5)	-	-	-	-	qp	-	-	-	+	-	-	-	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB1																							
Ls2A	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-
Ls18																							
Ls5B	-	T	+	-	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	qp	-	-	-	-
Ls51B	-	-	T	-	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	qp	-	-	-	-
M2011																							
44																							
2001	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2003																							
2004																							
2009																							
444																							
445																							
FM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	T	-
Ve26																							
U45																							
Su47																							
M1-5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A145																							
A161	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar16																							
M31																							
Tu20																							
Wu498																							
Wu499																							
M10S																							

TABLEAU 6 : SPECTRE LYTIQUE DES PHAGES TEMPERES



45 souches ont été traitées aux rayons ultra-violet. 15 d'entre elles se sont révélées lysogènes ; pour les autres souches, aucun phage n'a été décelé dans nos conditions expérimentales.

(+) lyse nette, (T) lyse trouble, (qp) quelques phages de lyse, (-) pas de lyse.

SOUCHES INDICATRICES

	L558	L551B	M2011	44	2001	2003	2004	2009	444	445	F11	Ve26	U45	Su47	M1-5	A145	A161	Ar-16	M31	Tu20	Wu498	Wu499	Wu499
M2S	-	-	-	-	-	-	-	-	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M5S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M5H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M9S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M11S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13S	-	-	-	-	-	-	-	-	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M14S	-	-	-	-	-	-	-	-	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M15S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M18S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M19S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M20S	-	-	-	-	-	-	-	-	qp	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M22S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M23S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M26S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M27S	-	-	-	-	-	-	-	-	T	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M28S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5(L5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LBI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L52A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ls18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ls58	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ls51B	-	-	-	-	-	-	-	-	qp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
444	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
445	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ve26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Su47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A145	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A161	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tu20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wu498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wu499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M10S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SURNAGEANTS DES SOUCHEES TRAITEES

TABLEAU 6 (suite)



2) Libération spontanée de phages par les souches lysogènes

Les souches lysogènes peuvent libérer les phages tempérés qu'elles portent, non seulement après traitement par un agent inducteur, mais aussi spontanément.

Nous avons comparé le nombre de phages libérés spontanément par des souches lysogènes, et le nombre de phages produits après induction par les UV. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau suivant :

souches lysogènes	phages tempérés	souches indicatrices (1)	NOMBRE DE PHAGES LIBERES (ufp/ml)		facteur de multiplication (2)
			spontanément	après traitement aux UV	
M ₅ N ₁	Ø M ₅ N ₁	M ₃ S	5.10 ⁴	5.10 ⁵	10
M ₁₁ S	Ø M ₁₁	M ₁₉ S	10 ⁴	3.10 ⁶	300
M ₁₄ S	Ø M ₁₄	M ₃ S	1,5.10 ²	3.10 ³	20
M ₂₀ S	Ø M ₂₀	M ₉ S	5.10 ⁶	10 ¹⁰	2000
M ₂₃ S	Ø M ₂₃	444	4,5.10	1,6.10 ⁴	350
M ₂₇ S	Ø M ₂₇	M ₁₃ S	2.10 ⁴	2.10 ⁶	100
L ₅ (L ₅)	Ø L ₅	444	7,8.10 ⁶	4,6.10 ⁹	590
Ls5B	Ø 5B	M ₅ S	4.10 ⁵	2.10 ⁸	500
Ls51B	Ø 51B	M ₅ S	3,9.10 ⁵	1,7.10 ⁸	430

TABLEAU 7 : Comparaison entre le nombre de phages libérés spontanément et après induction par les UV.

- (1) Les souches indicatrices utilisées sont les plus sensibles aux phages tempérés choisis.
- (2) Facteur de multiplication correspondant au rapport :

$$\frac{\text{Nombre d'ufp/ml libérées après induction par les UV}}{\text{Nombre d'ufp/ml produites spontanément}}$$

Les titres des phages libérés spontanément varient considérablement en fonction des souches lysogènes étudiées ; 45 ufp/ml pour le phage $\emptyset M_{23}$ et $7,8 \cdot 10^6$ ufp/ml pour $\emptyset L_5$.

Après induction par les rayons UV, les titres sont multipliés par un facteur qui varie de 10 à 2000 selon le phage considéré. Le titre le plus important est obtenu dans le cas du phage $\emptyset M_{20}$ (libéré par la souche $M_{20}S$).

3) Spectre lytique des phages tempérés (spécificité d'hôte)

Nous avons tenté de classer les phages tempérés d'après leurs spécificités d'hôte, en trois catégories :

- les phages ayant un spectre lytique étroit: Il s'agit des phages : $\emptyset 2A$, $\emptyset M_{26}$, $\emptyset FM_1$, $\emptyset M_{1-5}$, $\emptyset A161$, $\emptyset M_{14}$ et $\emptyset 2001$.

- les phages peu spécifiques : $\emptyset M_{23}$ et $\emptyset M_{11}$

- les phages ayant une spécificité d'hôte intermédiaire. Ce sont les phages : $\emptyset M_{5N_1}$, $\emptyset M_{20}$, $\emptyset M_{27}$, $\emptyset 5B$ et $\emptyset 51B$ et $\emptyset L_5$

4) Commentaires sur le tableau 6

Comme nous pouvons le constater sur le tableau 6 15 des 45 souches traitées aux UV (soit 33 % d'entre elles) sont lysogènes et ont libéré des particules phagiques. Par ailleurs, 27 % des souches étudiées (soit 12 souches), se sont révélées sensibles à l'un ou l'autre des phages tempérés.

Notons qu'une souche lysogène donnée est insensible à son propre phage. Autrement dit, elle est immune vis-à-vis de lui.

Des souches bactériennes, telles que la $M_{14}S$, $M_{27}S$, $Ls2A$ et FM_1 sont lysogènes et sont également sensibles à des phages tempérés. La souche $M_{27}S$ par exemple, est sensible aux phages $\emptyset M_{11}$, $\emptyset M_{23}$, $\emptyset M_{26}$ et $\emptyset 2 A$. On peut donc en déduire qu'il n'y a pas de parenté entre ces phages et le phage $\emptyset M_{27}$.

D'autres souches lysogènes, sont par contre résistantes à des phages tempérés : c'est le cas de la souche M_5N_1 qui est insensible, entre autres, aux phages $\emptyset 5B$ et $\emptyset 51B$.

Nous possédons parmi les souches de notre collection, un mutant auxotrophe de la M_5N_1 nommé la $M_5N_1m_4$ ($Ilv^- Try^- Arg^-$). Ce mutant est sensible aux phages $\emptyset M_5N_1$, $\emptyset 5B$ et $\emptyset 51B$ (Tableau 8). Lorsque l'on irradie ce mutant, aucun phage n'est décelé dans la culture ; nous pouvons donc conclure qu'il est "guéri" de son prophage. Ceci explique sa sensibilité au phage $\emptyset M_5N_1$.

		SOUCHES BACTERIENNES	
		M_5N_1 (sauvage)	$M_5N_1m_4$ ($Ilv^- Try^- Arg^-$)
Phages tempérés	$\emptyset M_5N_1$	-	+
	$\emptyset 5 B$	-	+
	$\emptyset 51B$	-	+

TABLEAU 8 : Sensibilité des souches M_5N_1 et $M_5N_1m_4$ aux phages tempérés $\emptyset M_5N_1$, $\emptyset 5B$ et $\emptyset 51B$

+ : lyse au niveau du spot

- : pas de lyse

La résistance de la souche bactérienne M_5N_1 aux phages \emptyset 5B et \emptyset 51B peut être expliquée par :

- * L'absence naturelle, sur sa paroi, de sites récepteurs spécifiques pour l'adsorption de ces phages. Si cette hypothèse est valable, la souche $M_5N_1m_4$, qui n'est autre qu'un mutant auxotrophe de la M_5N_1 , doit être résistante, elle aussi, à ces phages. Or, l'expérience montre que le phage \emptyset 5B s'adsorbe sur la M_5N_1 .
- * La conversion lysogénique (6) : les récepteurs pariétaux de la M_5N_1 seraient modifiés à cause de la lysogénie. Dans ce cas, les phages ne s'adsorbent plus et la bactérie est résistante. Cette hypothèse a été écartée pour les mêmes raisons que précédemment.
- * La restriction de l'ADN phagique par des endonucléases de la souche M_5N_1 . La souche $M_5N_1m_4$ devrait alors posséder le même système de restriction, or, elle est lysée par les phages \emptyset 5B et \emptyset 51B ; donc, la résistance de la M_5N_1 n'est pas due à la restriction. Toutefois, la M_5N_1 aurait pu être mutée sur le système de restriction. Dans ce cas, la $M_5N_1m_4$ lysogénisée de nouveau par le phage \emptyset M_5N_1 devrait rester sensible aux phages \emptyset 5B et \emptyset 51B. Cependant, cette lysogénisation lui confère de nouveau la résistance ; on ne peut donc pas parler d'une mutation au niveau du système de restriction. L'éventualité d'une mutation réverse est vite abandonnée, quand on sait que la fréquence de réversion (10^{-7}) est négligeable devant la fréquence de lysogénisation (0,1).

Notons qu'outre des enzymes codées par des gènes bactériens, il existe des endonucléases de restriction produites par des gènes plasmidiques (29), ou par un prophage tel que P_1 (24). Les données actuelles ne nous permettent pas de conclure ; nous n'avons donc pu ni confirmer ni infirmer cette dernière hypothèse.

PHAGE	SOUCHES INDICATRICES	TITRE ufp/ml	COEFFICIENT D'EFFICACITE D'ETALEMENT
Ø M ₂₀ multiplié sur la souche M ₉ S	M ₉ S	2,7 . 10 ⁸	1
	M ₁₃ S	8 . 10 ⁶	2,9 . 10 ⁻²
	F M 1	2 . 10 ⁵	7,4 . 10 ⁻⁴
	444	3 . 10 ⁴	1,1 . 10 ⁻⁴
	M ₅ S	0	< 2,7.10 ⁻⁸

TABLEAU 9 : Coefficients d'efficacité d'étalement du phage tempéré Ø M₂₀ sur quelques souches de R. meliloti

P H A G E	SOUCHES INDICATRICES	POURCENTAGE D'ADSORPTION (*) (%)
Ø M ₂₀ multiplié sur la souche M ₉ S	M ₉ S	99,4
	M ₁₃ S	99,4
	F M 1	2
	444	0,01
	M ₅ S	0

TABLEAU 10 : Pourcentages de phages adsorbés (Ø M₂₀), sur les souches de R. meliloti : M₉S, M₁₃S, FM1, 444 et M₅S, après 30 min. de contact.

(*) Pour le calcul du pourcentage d'adsorption voir " MATERIEL ET METHODES "



* "L'immunité" de la souche M_5N_1 vis-à-vis des phages ϕ 5B et ϕ 51B, qui est la conséquence de la parenté existant entre les phages ϕM_5N_1 , ϕ 5B et ϕ 51B. Le fait que la lyso-générisation de la $M_5N_1m_4$ par ϕM_5N_1 lui confère de nouveau la résistance aux trois phages, rend cette dernière hypothèse la plus vraisemblable.

5) Influence de la souche indicatrice sur l'efficacité d'étalement

Rappelons que le coefficient d'efficacité d'étalement d'un phage est égal au rapport entre le titre d'une suspension phagique obtenu avec une souche indicatrice donnée et le titre obtenu sur la souche qui a servi à la multiplication du phage.

Comme nous pouvons le constater sur le Tableau 9 le titre des phages dépend étroitement de la souche bactérienne sur laquelle il a été dénombré.

Le cas du phage ϕ M20 multiplié sur la souche M_9S et dénombré sur les souches M_9S , $M_{13}S$, FM_1 , 444 et M_5S , constitue un bon exemple pour illustrer ce phénomène.

L'absence, sur la paroi de la M_5S , de sites récepteurs spécifiques pour l'adsorption du phage ϕ M₂₀ (Tableau 10), explique la résistance totale de cette souche au phage précité.

Quant aux souches $M_{13}S$, FM_1 et 444, nous avons tout d'abord pensé que les titres faibles étaient dus à un taux d'adsorption faible de ϕ M₂₀ sur ces souches. Cette première hypothèse semble exacte dans le cas des souches 444 et FM_1 , puisque seulement 2 % des phages s'adsorbent sur la FM_1 et 0,01 % sur la 444 (Tableau 10). Seuls les phages adsorbés peuvent donner des plages de lyse ; ce qui explique, en partie, les faibles coefficients d'efficacité d'étalement du phage ϕ M20 sur ces souches.

En ce qui concerne la souche $M_{13} S$, l'analyse des pourcentages d'adsorption ne nous apporte aucun renseignement supplémentaire sur la résistance partielle de cette souche vis-à-vis du phage ϕM_{20} . En effet, ce phage s'adsorbe d'une façon aussi importante sur la souche $M_{13} S$ que sur la souche $M_9 S$; le pourcentage d'adsorption est de 99,4 % dans les deux cas. Autrement dit, l'infection a été effectuée à 99,4 % ; l'ADN phagique est introduit dans la bactérie ; mais la majorité des phages n'ont pas pu lyser la bactérie. L'ADN du phage ϕM_{20} a pu emprunter l'une des deux voies suivantes :

- étant tempéré, ce phage possède un système grâce auquel il peut intégrer son génome dans le chromosome bactérien. Il rend alors la bactérie lysogène.

- être dégradé par des enzymes de restriction de la souche hôte.

Pour vérifier ces hypothèses, nous avons procédé à la lysogénisation des souches $M_9 S$ et $M_{13} S$ (voir technique plus loin) par le phage ϕM_{20} .

PHAGE	SOUCHES INDICATRICES	POURCENTAGE DE LYSOGENISATION (*) (%)
ϕM_{20}	$M_9 S$	30
	$M_{13} S$	11

TABLEAU 11 : Pourcentages de lysogénisation des souches de R. meliloti $M_9 S$ et $M_{13} S$ par le phage tempéré ϕM_{20}

(*) après la détermination du pourcentage d'adsorption, les cultures sont incubées pendant 5 jours à 30°C. Les colonies apparues sont alors examinées et le pourcentage de lysogénisation est déterminé (voir § LYSOGENISATION EXPERIMENTALE).

P H A G E S	SOUCHES INDICATRICES	COEFFICIENT D'EFFICACITE D'ETALEMENT
$\emptyset M_{14}/M_3S$ (*)	M_3S	1
	444	$8,6 \cdot 10^{-4}$
$\emptyset M_{5N_1}/M_3S$	M_3S	1
	444	$2,9 \cdot 10^{-4}$
$\emptyset M_{27}/M_{13}S$	$M_{13}S$	1
	444	$2 \cdot 10^{-4}$
$\emptyset 5 B/M_5S$	M_5S	1
	$M_{13}S$	$5 \cdot 10^{-4}$
	444	$5 \cdot 10^{-2}$
	$M_{27}S$	10^{-4}
$\emptyset 51 B/M_5S$	M_5S	1
	$M_{13}S$	$4,5 \cdot 10^{-3}$
	444	$6 \cdot 10^{-3}$
	$M_{27}S$	$2 \cdot 10^{-4}$

TABLEAU 12 : Coefficient d'efficacité d'étalement de quelques phages tempérés sur des souches de R. meliloti

(*) $\emptyset M_{14}/M_3S$ (par exemple) indique que le phage $\emptyset M_{14}$ a été multiplié sur la souche M_3S .



Dans le Tableau ci-dessus, nous voyons que le pourcentage de lysogénisation de la souche M_9S par le phage $\emptyset M_{20}$ est supérieur à celui obtenu pour la souche $M_{13}S$. Le faible coefficient d'efficacité d'étalement observé chez la souche $M_{13}S$ n'est donc pas dû seulement à la lysogénisation.

Il est donc très probable, que nous sommes en présence d'un phénomène de restriction de la croissance du phage $\emptyset M_{20}$ par la souche $M_{13}S$. Dans ce cas, l'ADN du phage $\emptyset M_{20}$ serait coupé par des endonucléases de restriction de la $M_{13}S$. Toutefois des phages échappent à cette dégradation ; ce qui explique l'apparition de plages de lyse.

Si on infecte de nouveau la souche $M_{13}S$ par le phage $\emptyset M_{20}$ prélevé au niveau d'une plage (due à la lyse de la $M_{13}S$ par $\emptyset M_{20}$), le phage va s'adsorber sur la bactérie puis la lyser. On ne verra donc pas sa croissance restreinte par la souche $M_{13}S$. L'ADN du phage issu du premier cycle lytique a été "modifié" par la souche $M_{13}S$. En effet, cette souche, comme d'autres souches de R. meliloti (45, 50), possède au moins un système de restriction-modification. Ce système est dû en général (4, 20, 43) à deux activités enzymatiques : une endonucléase qui coupe l'ADN en des sites spécifiques et une méthylase dite de modification capable de méthyler certains sites de l'ADN et d'empêcher ainsi l'action de l'endonucléase.

Des études génétiques et biochimiques de la restriction-modification sont en cours dans notre laboratoire ; ce qui nous permettra de mieux comprendre ce phénomène encore très peu connu chez R. meliloti.

A partir des résultats du Tableau 12, nous pouvons également supposer l'existence de systèmes de restriction-modification chez d'autres souches de R. meliloti de notre collection. C'est le cas, par exemple, de la souche 444.

CHAPITRE II

LYSOGENISATION EXPERIMENTALE

L'influence de la lysogénie sur les souches bactériennes peut être étudiée de deux façons :

ou bien on compare une souche lysogène à la même souche guérie de son prophage ; ou encore on procède inversement en lysogénisant expérimentalement une souche non lysogène par un phage tempéré, les deux souches pouvant être ensuite comparées.

a) Recherche de clones ayant perdu leur prophage

Nous avons utilisé une culture en phase exponentielle de croissance de la souche lysogène M₂₀S. Après irradiation de cette culture, des quantités aliquotes des dilutions choisies sont coulées sur milieu RCG fructosé puis incubées 3 à 5 jours à 30°C. Les boîtes sont ensuite exposées à une dose d'UV de 80 ergs/mm².s pendant 6 secondes. Un millier de clones sont repiqués sur milieu RCGensemencé par la souche sensible M₉S puis placés à l'étuve à 28°C pendant environ 15 heures.

Les 1000 clones étudiés sont restés lysogènes et libèrent des phages qui provoquent la lyse de la souche M₉S.

La probabilité d'isoler une bactérie guérie de son prophage est donc très faible. Dans le cas étudié, cette probabilité est inférieure à 10⁻³.

Le même phénomène a été reporté par IMANAKA et coll. (28), qui ont travaillé sur des souches lysogènes de Bacillus licheniformis. Cependant, SIQUEIRA et AZEVEDO (55), d'une part, EXPERT et TOURNEUR (22) d'autre part, ont obtenu des souches guéries de leurs prophages à partir de souches lysogènes de Staphylococcus aureus pour les premiers et Agrobacterium tumefaciens pour les seconds.

MISE EN EVIDENCE DES CLONES RENDUS LYSOGENES

Les clones lysogénisés sont ceux qui sont
entourés d'un halo de lyse.

b) Technique de lysogénisation

La souche sensible de R. meliloti à rendre lysogène, est infectée en milieu liquide par le phage tempéré choisi. Après 20 minutes, temps nécessaire à l'adsorption de la majorité des phages, le mélange est dilué puis coulé à la surface de milieu gélosé. Les boîtes sont incubées à 28°C jusqu'à ce que les colonies apparues atteignent environ 1 mm de diamètre (3 à 5 jours d'incubation).

La technique de détection des clones lysogénisés est la même que celle décrite précédemment. En effet, les clones lysogénisés vont libérer des phages qui vont lyser la souche sensible. On pourra donc facilement repérer les clones rendus lysogènes par l'apparition d'une zone de lyse autour d'eux (photographie page 58).

Connaissant le nombre (N) de clones rendus lysogènes, le nombre de clones examinés (No) et le pourcentage de survivants (S), on peut calculer le pourcentage de lysogénisation :

$$= \frac{N \times 100}{No} \times \frac{S}{100}$$

$$= \frac{N.S}{No}$$

Les clones dont le caractère paraît stable après plusieurs repiquages successifs, sont examinés pour la libération de phages en milieu liquide et pour leur immunité vis-à-vis du phage qu'ils hébergent.

c) Facteurs influençant la lysogénisation

Pour ce faire, nous avons essentiellement examiné l'influence du milieu de culture, de la température et de la multiplicité d'infection (m.o.i) sur le pourcentage de lysogénisation de la souche M₉S par le phage tempéré Ø M₂₀.

1) Milieu de culture

L'infection d'une culture en phase exponentielle de croissance de la souche M_9S , par le phage ϕM_{20} est réalisée à 28°C dans 4 milieux différents :

- ① milieu complexe TY
- ② milieu complexe RC fructosé à 1 p.100 (RC Fru)
- ③ milieu minimum R fructosé à 1 p.100 et additionné de vitamine H (0,5 µg/ml) et de vitamine B₁ (10 µg/ml) (R Fru. HB1).
- ④ milieu minimum R Fru.HB1 additionné de Ca⁺⁺ (0,4 mM) (RFru HB1 Ca⁺⁺)

Le pourcentage de lysogénéisation est alors calculé .

Les résultats obtenus sont consignés dans le

Tableau 13 .

M I L I E U D E C U L T U R E				
	T Y	RC Fru	RFru HB ₁	RFru HB ₁ Ca ⁺⁺
Pourcentage de lysogénéisation (*)	13	11	0,2	10

TABLEAU 13 : Variations du pourcentage de lysogénéisation de la souche M_9S par le phage ϕM_{20} , en fonction de la nature du milieu de culture.

La température d'incubation est de 28°C et la multiplicité d'infection m.o.i = 3

(*) Ces valeurs sont le résultat de l'analyse de 400 colonies.

Nous constatons que le pourcentage de lysogénisation est sensiblement le même pour les milieux (1), (2) et (4).

Par contre, quand l'infection et l'incubation sont réalisées dans du milieu RFru.HB1, on enregistre un faible taux de lysogénisation (0,2 %). Ceci s'explique facilement si l'on compare les milieux (3) et (4). Le milieu (3) diffère du milieu (4) uniquement par l'absence d'ions Ca^{++} . On peut donc attribuer la faible fréquence de lysogénisation obtenue dans le milieu (3) au manque de calcium.

En effet, il a été montré antérieurement (7) que les ions Ca^{++} sont nécessaires à l'adsorption des phages sur les bactéries.

2) Température

Nous avons soumis une culture en phase exponentielle de croissance de la souche M_9S , réalisée dans du milieu TY, au phage ϕM_{20} . L'infection est effectuée à raison de 10 ufp par ufc (m.o.i = 10), à trois températures différentes 25°C, 30°C, et 37°C.

	TEMPERATURE D'INCUBATION		
	25°C	30°C	37°C
(*) % lysogénisation	38	38	32

TABLEAU 14 : Influence de la température sur le pourcentage de lysogénisation de la souche M_9S par le phage ϕM_{20}

(*) Les pourcentages sont déterminés à partir de l'analyse de 300 colonies

Les résultats rapportés dans le Tableau 14 montrent que les pourcentages de lysogénéisation sont identiques quand l'incubation est réalisée à 25°C ou à 30°C. A 37°C, on remarque une légère baisse de ce pourcentage. Cette différence n'est pas assez significative pour que l'on puisse conclure que la température a une grande influence sur la lysogénéisation, du moins dans la gamme de température choisie.

Cependant, il a été rapporté (54) que la lysogénéisation d'une souche d'E. coli par le phage P1 dépend considérablement de la température d'incubation. La fréquence de lysogénéisation est de 0,8 ou 0,2 selon que l'incubation est réalisée à 20°C ou à 37°C.

3) Multiplicité d'infection (m.o.i.)

L'infection de la souche M₉S par le phage \emptyset M₂₀ est réalisée à 28°C dans du milieu T Y, à différentes multiplicités d'infection.

	MULTIPLICITE D'INFECTION (ufp/ufc)			
	0,03	0,3	3	30
% lysogénéisation (*)	2	6,5	9	64

TABLEAU 15 : Influence de la m.o.i. sur le pourcentage de lysogénéisation de la souche M₉S par le phage tempéré \emptyset M₂₀

(*) ces valeurs sont calculées à partir de l'analyse de 300 colonies.

Les résultats mentionnés ci-dessus, laissent suggérer que le taux de lysogénéisation de la souche M_9S par le phage $\emptyset M_{20}$ dépend considérablement du rapport entre le nombre de phages et le nombre de bactéries mis en contact. Le pourcentage de lysogénéisation croit quand la multiplicité d'infection augmente.

d) Influence de la lysogénie sur la sensibilité aux phages de souches de *R. meliloti*

Au cours de cette étude, nous avons examiné plusieurs souches de *R. meliloti*. Vu le nombre considérable de cas, nous ne nous sommes limités qu'à quelques uns d'entre eux ; ce sont ceux que nous avons jugés comme étant les mieux représentatifs des différents cas observés.

D'une part, nous avons comparé la sensibilité d'une souche lysogène avec celle de la même souche qui a été guérie de son prophage (Tableau 16)

D'autre part, nous avons procédé à une étude comparative entre une souche bactérienne et la même souche que nous avons lysogénisée auparavant (Tableaux 18 et 19)

1) Sensibilité aux phages de la souche M_5N_1 et de ses mutants auxotrophes m_2 , m_3 et m_4

Comme nous l'avons montré précédemment, la souche M_5N_1 porte un prophage nommé $\emptyset M_5N_1$. Cette souche est résistante à ce phage et ceci est dû à son immunité vis-à-vis de lui.

Par ailleurs, nous possédons parmi les souches de notre collection, 3 mutants de la M_5N_1 nommés : $M_5N_1 m_2$ ou (m_2), $M_5N_1 m_3$ (ou m_3) et $M_5N_1 m_4$ (ou m_4). Ces trois souches sont devenues sensibles au phage $\emptyset M_5N_1$

		S O U C H E S B A C T E R I E N N E S			
		M_5N_1	$M_5N_1m_2$ (1)	$M_5N_1m_3$ (1)	$M_5N_1m_4$ (1)
Phages isolés du sol (2)	Ø1	-	-	-	-
	Ø4	-	-	-	-
	Ø5t	-	-	-	-
	Ø6	-	-	-	-
	Ø7	+	+	+	+
	ØL9	-	-	-	-
	Ø40	+	+	+	+
	Ø11	-	-	-	-
	Ø12	+	+	+	+
	Ø13	+	+	+	+
	Ø14	qp	qp	qp	qp
	Ø20	+	+	+	+
	Ø21	+	+	+	+
Phages tempérés (3)	Ø2001	-	T	T	T
	Ø M_5N_1	-	+	+	+
	Ø M_{14}	-	T	T	T
	Ø5B	-	+	+	+
	Ø FM_1	-	-	-	-
	Ø M_{1-5}	-	+	+	+
	ØA161	-	T	T	T
	Ø51B	-	T	T	T

TABLEAU 16 : Sensibilité de la souche M_5N_1 et de ces trois mutants auxotrophes à des phages de notre collection.

(+) lyse nette ; (T) lyse trouble ; (qp) quelques plages de lyse ; (-) pas de lyse.

(1) voir Tableau 1

(2) voir Tableau 2

(3) voir Tableau 6



par suite de la perte de leur prophage. Ceci est confirmé par l'absence de particules phagiques dans les cultures de ces mutants irradiées aux rayons ultraviolets.

Comme nous pouvons le constater sur le tableau 16 , les 3 mutants sont lysés, non seulement par le phage $\emptyset M_5N_1$ mais aussi par les phages $\emptyset 2001$, $\emptyset M_{14}$, $\emptyset 5B$, $\emptyset M_{1-5}$, $\emptyset A 161$ et $\emptyset 51 B$.

Ceci laisse supposer l'existence d'une parenté entre ces phages. Autrement dit, l'ADN de ces phages, une fois injecté dans la souche M_5N_1 , est réprimé par le répresseur du prophage $\emptyset M_5N_1$, et ne provoque donc pas la lyse de la bactérie.

La sensibilité des trois mutants étant due à l'absence du prophage, les phages précités vont donc se développer à l'intérieur de la bactérie et entraîner sa lyse.

Notons aussi que ces mutants n'ont pas changé de sensibilité vis-à-vis des phages isolés du sol.

Pour apporter une preuve supplémentaire, nous avons lysogénisé la souche M_3S par le phage $\emptyset M_5N_1$ et nous avons recherché si cela entraînait un changement dans sa sensibilité aux phages.

		PHAGES TEMPERES			
		ϕM_5N_1	ϕM_{14}	ϕM_{1-5}	$\phi 5 B$
souches bacté- riennes	M_3S	+	+	+	+
	$M_3(M_5N_1)$ (*)	-	-	-	-

TABLEAU 17 : Influence de la lysogénisation sur la sensibilité aux phages de la souche M_3S

(+) lyse nette ; (T) lyse trouble ; (-) pas de lyse

(*) c'est la souche M_3S lysogénisée par le phage ϕM_5N_1

Comme le montre le Tableau ci-dessus, la lysogénisation de la souche M_3S par le phage ϕM_5N_1 , la rend résistante aux phages ϕM_5N_1 , ϕM_{14} , ϕM_{1-5} et $\phi 5B$. Le développement des phages est donc inhibé par la présence du represser du prophage ϕM_5N_1 dans la souche $M_3 (M_5N_1)$.

2) Conséquences de la lysogénisation des souches M_9S et $M_{13}S$ par le phage ϕM_{20}

Au cours de nos travaux, nous avons constaté que les souches M_9S et $M_{13}S$ sont sensibles à plusieurs phages de notre collection (Tableaux 18 et 19). Dans nos conditions expérimentales, 78 % des phages sont capables de lyser ces deux souches. Nous avons donc jugé intéressant de savoir si leur lysogénisation par le phage ϕM_{20} allait entraîner des changements dans leur sensibilité aux phages.

D'après les résultats rapportés dans les Tableaux 18 et 19, nous constatons qu'effectivement, les souches $M_9 (M_{20})$ et $M_{13} (M_{20})$ ne sont plus lysées par certains phages et en particulier par les phages

		S O U C H E S B A C T E R I E N N E S			
		M ₉ S	M ₉ (M ₂₀) (*)	M ₁₃ S	M ₁₃ (M ₂₀) (*)
BACTERIOPHAGES ISOLÉS DU SOL	Ø1	+	-	+	-
	Ø2	+	+	+	+
	Ø3	+	-	+	-
	Ø4	-	-	-	-
	Ø5t	+	+	+	+
	Ø6	-	-	+	+
	Ø7	T	T	+	+
	Ø9	+	+	+	+
	ØL9	+	-	+	-
	Ø10	+	+	+	+
	Ø11	+	+	+	+
	Ø12	+	+	+	+
	Ø13	+	+	+	+
	Ø14	qp	qp	+	+
	Ø16	T	T	qp	qp
	Ø19	T	T	+	+
	Ø20	+	+	+	+
	Ø21	+	+	+	+

TABLEAU 18 : Sensibilité de souches de R. meliloti à des bactériophages isolés à partir du sol.

(+) lyse nette ; (T) lyse trouble ; (qp) quelques plages de lyse
 (-) pas de lyse.

* M₉(M₂₀) est la souche M₉S lysogénisée par le phage tempéré ØM₂₀

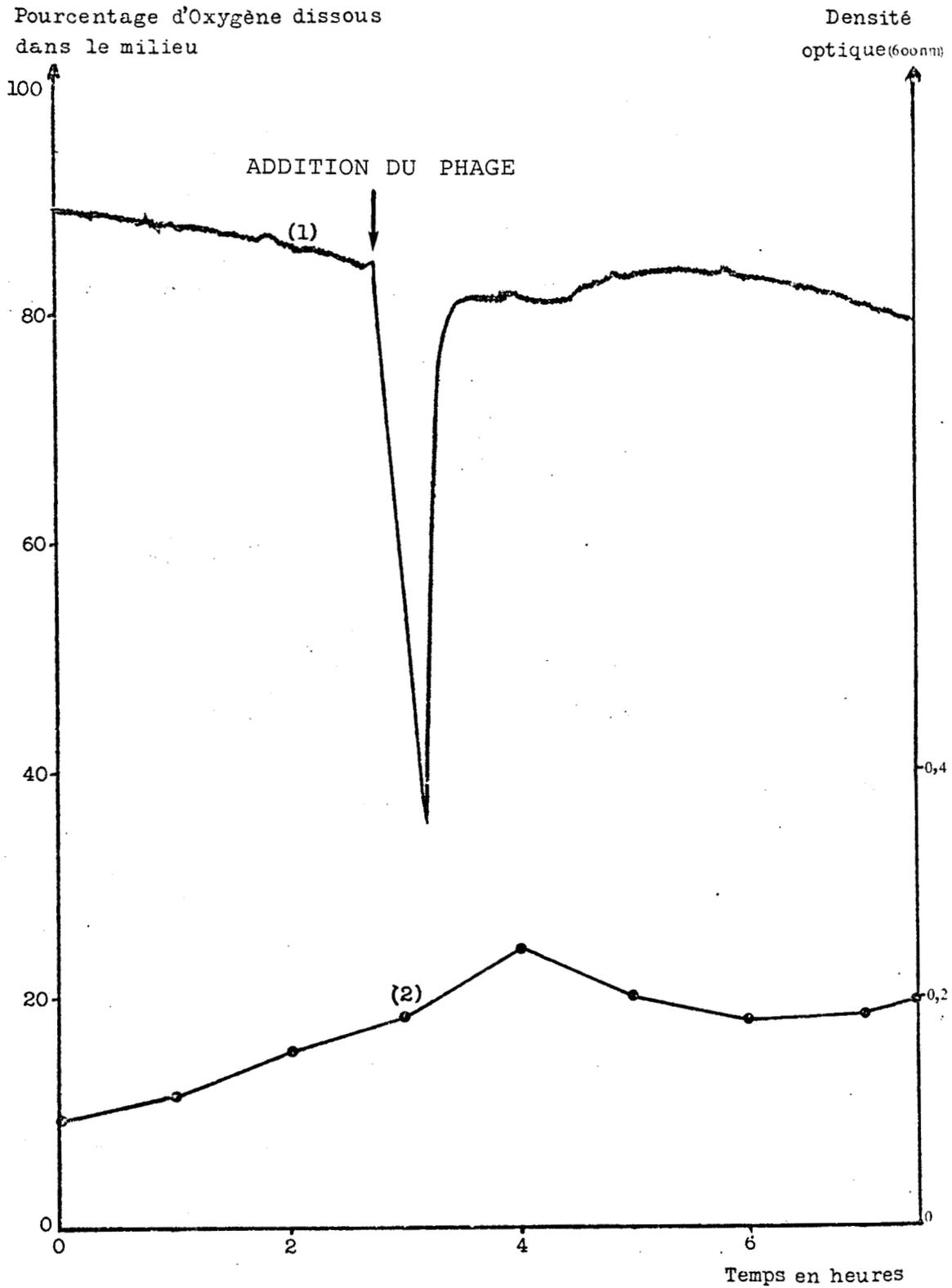


		SOUCHES BACTERIENNES			
		M ₉ S	M ₉ (M ₂₀)*	M ₁₃ S	M ₁₃ (M ₂₀)*
BACTERIOPHAGES TEMPERES	ØM _{5N} ₁	qp	qp	qp	qp
	ØM ₁₄	qp	-	-	-
	Ø5B	T	T	T	T
	Ø51B	T	T	T	T
	ØM ₂₇	+	+	+	+
	ØM ₁₁	T	T	T	T
	ØM ²⁰	+	-	+	-
	ØM ₂₃	qp	-	+	T
	ØM ₂₆	-	-	-	-
	ØL5	qp	-	+	T
	Ø2001	-	-	-	-
	ØM ₁₋₅	-	-	-	-
	ØFM1	-	-	-	-
	ØA161	-	-	-	-

TABLEAU 19 : Sensibilité de souches de R. meliloti à des bactériophages isolés à partir de souches lysogènes

(+) lyse nette ; (T) lyse trouble ; (qp) quelques phages de lyse
 (-) pas de lyse.





BUS
LILLE

FIGURE 8 : Production en masse du phage ϕ_1 par lyse de la souche M₉S de *R. meliloti* :

(1) Evolution du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu en fonction du temps.

(2) Evolution de la densité optique de la culture en fonction du temps.

$\emptyset 1$, $\emptyset 3$ et $\emptyset L_9$ isolés du sol. Ces phages sont donc inhibés par le represseur du phage $\emptyset M_{20}$, ce qui laisse supposer l'existence d'une parenté entre eux.

Des recherches plus approfondies de cette parenté sont exposées dans le paragraphe suivant.

e) Etude comparative des phages $\emptyset 1$, $\emptyset 2$, $\emptyset 3$, $\emptyset L_9$ et $\emptyset M_{20}$

1) Lyse en fermenteur

Lors de l'étude de la lyse en fermenteur des phages $\emptyset 1$, $\emptyset 2$, $\emptyset 3$ et $\emptyset L_9$ nous avons relevé des analogies importantes entre ces 4 phages. En effet, tous les graphiques enregistrés présentent la même allure que celle de la figure 8. Cette figure montre une différence faible du taux d'oxygène dissous entre la croissance maximale de la culture bactérienne et la fin de la fermentation. Ceci pouvant être expliqué par la présence d'un nombre important de bactéries résistantes aux phages. En d'autres termes, parmi les bactéries présentes dans le fermenteur, certaines sont devenues lysogènes et continuent donc à se développer. Elles entraînent ainsi une augmentation de la densité optique à la fin de la fermentation, et une baisse simultanée du taux d'oxygène dissous dans le milieu.

Ces observations laissent supposer que les phages $\emptyset 1$, $\emptyset 2$, $\emptyset 3$ et $\emptyset L_9$ sont tempérés. Pour prouver cela, nous avons essayé de lysogéniser la souche M_9S par ces phages.

B A C T E R I O P H A G E S				
	Ø 1	Ø 2	Ø 3	Ø L 9
Pourcentage de lysogénisation	42	1	32	57

TABLEAU 20 : Pourcentage de lysogénisation de la souche M_9S par les phages Ø 1, Ø 2, Ø 3 et Ø L 9

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que ces phages sont bien des phages tempérés puisqu'ils sont capables de lysogéniser la souche M_9S .

Et pour plus de précision sur la parenté de ces phages avec le phage Ø M_{20} , nous avons examiné la sensibilité de la souche M_9S après l'avoir rendue lysogène par les phages précités.

Comme nous pouvons le constater sur le Tableau 21 la souche M_9S lysogénisée par l'un ou l'autre des phages Ø 1, Ø 2, Ø 3, Ø L 9 ou Ø M_{20} devient immune vis-à-vis de ces phages à l'exception du phage Ø 2. Ces phages possèdent donc des répresseurs étroitement apparentés. Cette constatation nous conduit à émettre l'hypothèse suivante :

le phage Ø 2 serait un phage tempéré dont les sites spécifiques au répresseur ont été modifiés par suite d'une mutation. Ceci explique le faible pourcentage de lysogénisation obtenu avec ce phage (Tableau 20). Cette faible fréquence est due à des phages dont l'ADN possède des sites reconnaissables par le répresseur.

La même observation a été faite par LEVINE (37) qui a remarqué qu'une mutation du phage P22 entraîne une diminution de son pouvoir de lysogénisation.

En effet, nous avons irradié la souche $M_9(2)$ et nous avons isolé des particules phagiques à partir

		S O U C H E S B A C T E R I E N N E S					
		M ₉ S	M ₉ (1) ^(*)	M ₉ (2) ^(*)	M ₉ (3) ^(*)	M ₉ (L9) ^(*)	M ₉ (M ₂₀) ^(*)
B A C T E R I O P H A G E	Ø 1	+	-	-	-	-	-
	Ø 2	+	+	+	+	+	+
	Ø 3	+	-	-	-	-	-
	Ø L 9	+	-	-	-	-	-
	Ø M ₂₀	+	-	-	-	-	-
	(**) Ø M ₉ (2)	+	-	-	-	-	-

TABLEAU 21: Sensibilité de la souche M₉S et de quelques souches lysogènes à des phages tempérés.

(+) lyse nette

(-) pas de lyse

(*) il s'agit de la souche M₉S lysogénisée respectivement par les phages : Ø 1, Ø 2, Ø 3, Ø L 9 et Ø M₂₀

(**) Ø M₉(2) est le phage isolé à partir de la souche M₉(2).



de cette souche. Quand on infecte les souches lysogénisées avec ce phage, les résultats obtenus sont négatifs (Tableau 21); ceci constitue un argument en faveur de notre hypothèse.

2) Action de l'immun-serum anti ϕ L 9 sur les phages ϕ 1, ϕ 2, ϕ 3, ϕ L 9 et ϕ M20.

Il a été montré antérieurement, que les phages ϕ 1, ϕ 2, ϕ 3 et ϕ L 9 sont fortement inhibés par l'immun-serum obtenu après injection du phage ϕ L 9 à des lapins (65).

Nous avons confirmé cela, et avons montré que le phage ϕ M 20 est aussi inhibé par cet immun-serum. En effet, une dilution au 1/1000 de l'immun-serum anti ϕ L 9, est capable en 10 min. d'inhiber plus de 99 % du phage ϕ M 20.

Toutes ces constatations ne font que renforcer l'idée de l'existence d'une parenté étroite entre ces phages.

3) Etude de la multiplication du phage ϕ M₂₀ en une seule étape

Par cette méthode, nous avons pu déterminer la période de latence du phage ϕ M₂₀ sur la souche M₉S, ainsi que le nombre moyen de phages libérés par bactérie (rendement individuel) (voir MATERIEL ET METHODES).

Les figures 9 et 10 représentent la multiplication du phage ϕ M₂₀ après infection de la souche M₉S et après induction de la souche rendue lysogène M₉(M₂₀). A partir de ces graphiques nous avons calculé la période de latence et le rendement individuel moyen de chaque bactérie (Tableau 22).

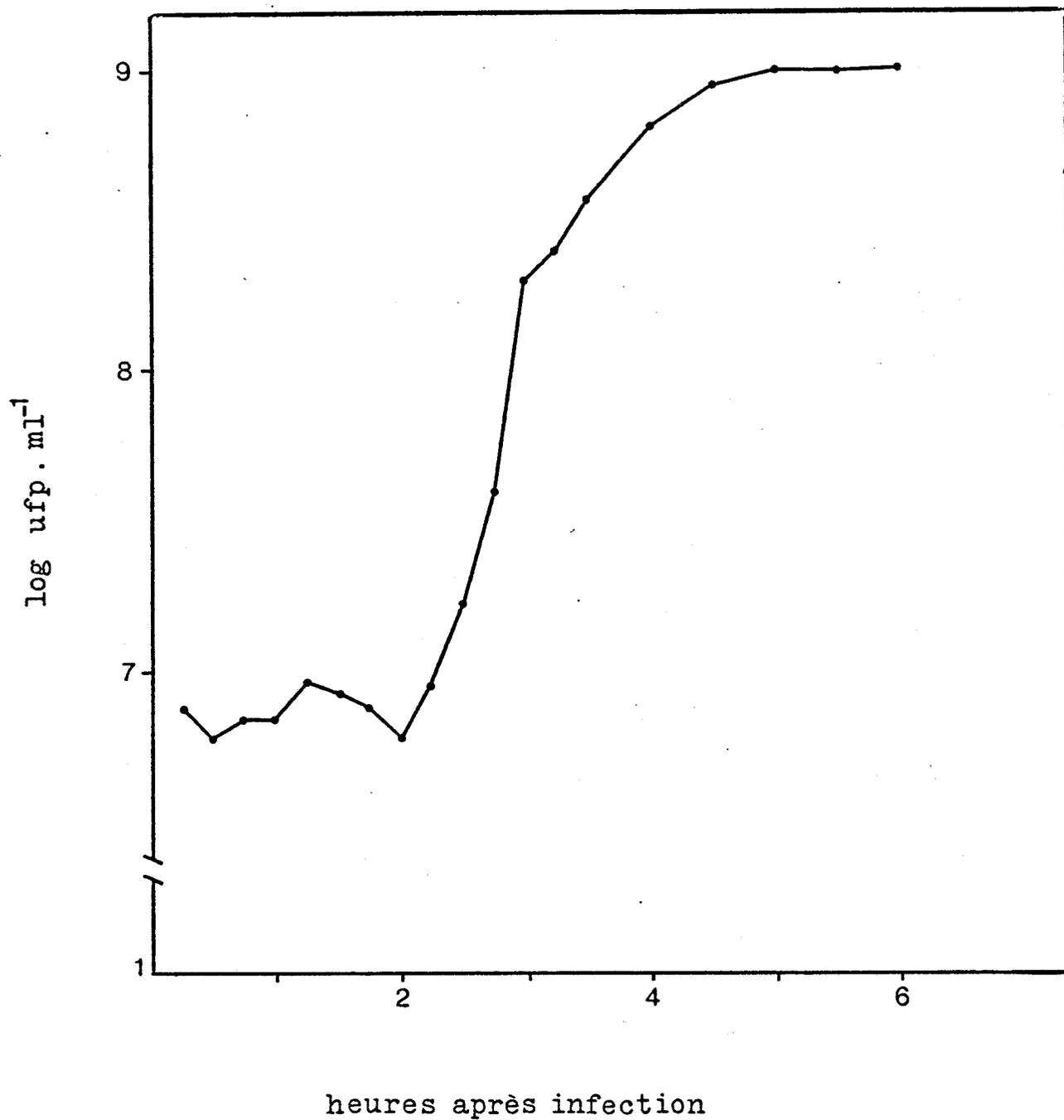


Figure 9 : Multiplication en une seule étape du phage ϕM_{20} après infection de la souche M_9S .



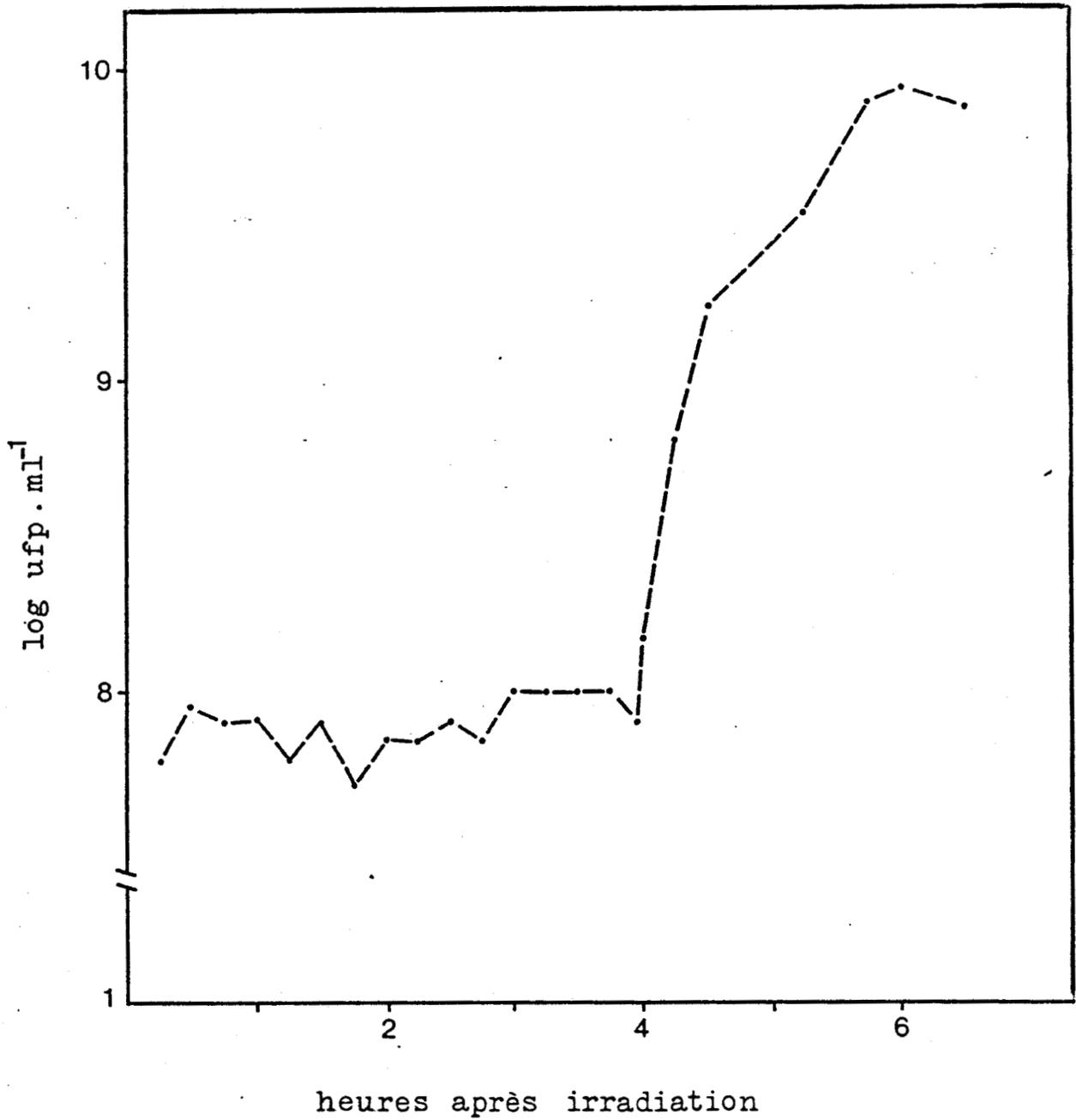


Figure 10 : Multiplication en une seule étape du phage ϕM_{20} après irradiation de la souche lysogène $M_9(M_{20})$.



	APRES INFECTION	APRES INDUCTION
Période de latence	entre 2 h 15 min. et 2 h 30 min.	3 h 55 min.
Rendement individuel moyen (*)	130	120

TABLEAU 22 : Détermination de la période de latence et du rendement individuel moyen après infection de la souche M_9S par le phage ϕM_{20} et après irradiation de la souche $M_9(M_{20})$ aux rayons UV

(*) c'est le nombre de phages libérés par bactérie.

Nous constatons que le rendement individuel moyen obtenu après infection est proche de celui déterminé après induction. Par contre, la période de latence après irradiation de la souche $M_9(M_{20})$ est plus longue que celle obtenue après infection de la souche M_9S par le phage ϕM_{20} . Autrement dit, le phage ϕM_{20} met plus de temps à se multiplier après induction qu'après infection. En effet, il a été montré que la prolongation de la période de latence est due à l'action des rayons UV (40).

Notons enfin que la période de latence obtenue en infectant la souche M_9S par les phages $\phi 1$, $\phi 2$, $\phi 3$ ou $\phi L9$ est comprise entre 2 h et 2 h 30 min. (3). Par contre, leur rendement individuel est d'environ 20 phages/bactérie (3).

Les observations relevées jusqu'à présent sont favorables à l'existence d'une parenté étroite entre les phages $\phi 1$, $\phi 2$, $\phi 3$, $\phi L9$ et ϕM_{20} . Cette parenté est confirmée grâce à l'analyse électrophorétique de l'ADN de ces phages soumis à l'action de l'endonucléase de restriction Eco R I (ANDRIANTSIMIAVONA, communication personnelle).

CHAPITRE III

ASPECTS DE LA TRANSDUCTION CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI

Au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence, le transfert du transposon Tn5, codant pour la résistance à la kanamycine (Km) (8), grâce au phage tempéré $\emptyset M_{26}$. Ce même phage est capable de véhiculer le gène "met⁺" d'une souche sauvage vers une souche auxotrophe.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de la multiplicité d'infection (m.o.i.) sur la transduction.

Enfin, nous avons recherché l'origine de l'ADN des particules phagiques transductrices.

a) Transfert du transposon Tn5

Le phage tempéré $\emptyset M_{26}$ est multiplié sur la souche donatrice 444 :: Tn5.40. Il s'agit d'un mutant auxotrophe (Leu⁻), résistant à la kanamycine (Km^R) qui a été obtenu par insertion du Tn5 dans le gène "leucine" (2). La souche réceptrice 444 quant à elle, est prototrophe et sensible à la kanamycine (Km^S). Le milieu de sélection est le milieu RCG fructosé à 1 p.100 et additionné de Km (200 µg/ml).

D'après le Tableau 23, nous constatons que le phage $\emptyset M_{26}$ est capable de transduire le Tn5 à une fréquence de $1,8 \cdot 10^{-7}$ (transductants/ufc réceptrice).

L'analyse des transductants a révélé que ces clones sont tous devenus exigeants en leucine, comme la souche donatrice. Ceci montre que le gène "Leu⁻" et le Tn5 sont transduits simultanément (cotransduits). Ceci confirme le fait que la mutation est bien due à l'insertion du Tn5 sur le gène "Leu" (2).

b) Transduction du caractère "met⁺"

Nous avons utilisé la 444 comme souche donatrice et la souche 444 :: Tn5.17 (met⁻Km^R) comme souche réceptrice. Le phage transducteur est le phage $\emptyset M_{26}$, le milieu RFru.HB₁ comme milieu de sélection

Phage	Souche donatrice	Souche réceptrice	m.o.i.	Caractère transduit	Fréquence de mutation spontanée	Fréquence de transduction transductant/ufc réceptrice
Ø M ₂₆	444::Tn5.40	444	5	Km	< 10 ⁻⁹	1,8.10 ⁻⁷
Ø M ₂₆	444	444::Tn5.17	5	Met ⁺	< 2.10 ⁻⁹	4.10 ⁻⁷

TABLEAU 23 : TRANSDUCTION DES CARACTERES "Km" et "Met⁺" PAR LE PHAGE Ø M₂₆



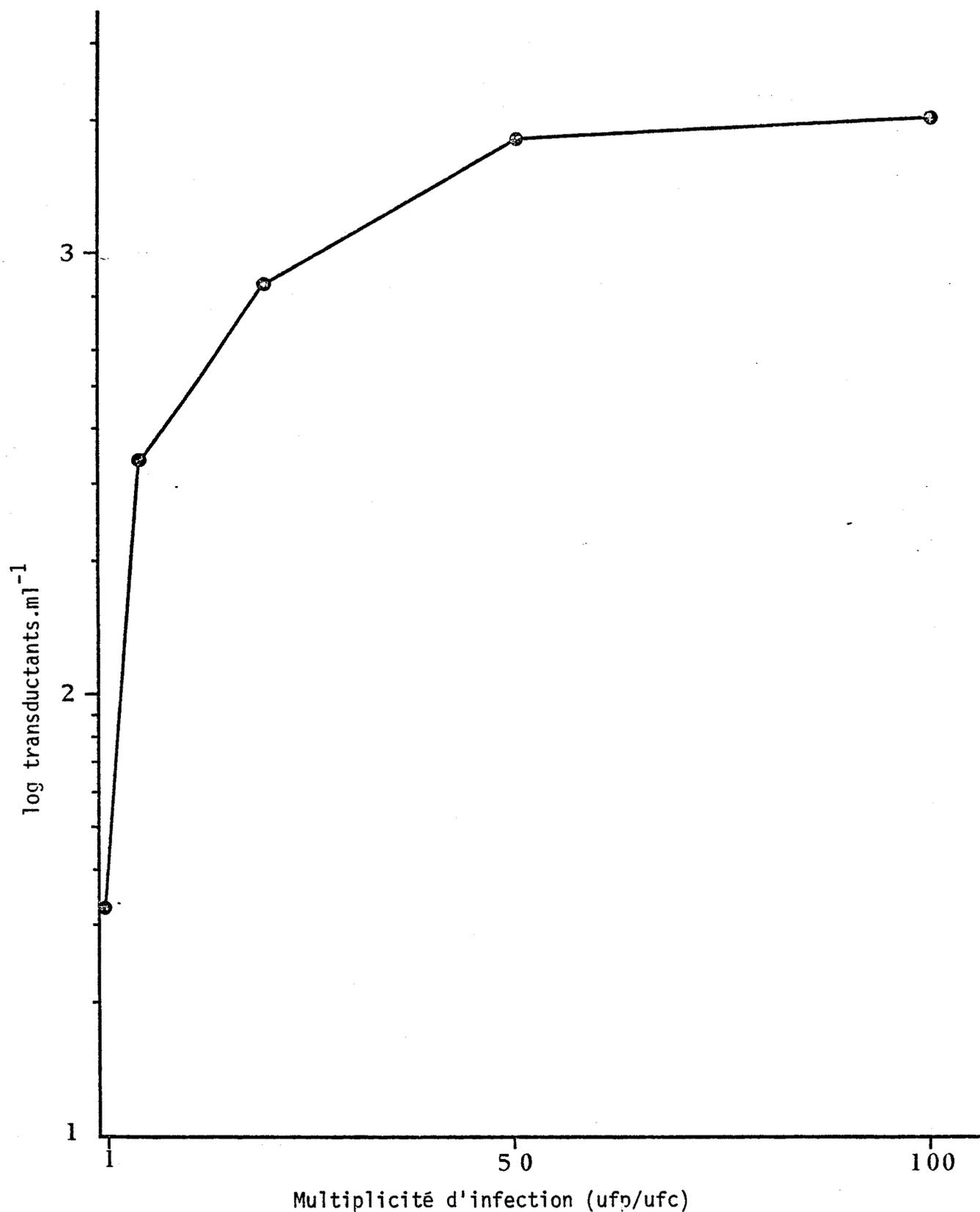


FIGURE 11: VARIATION DE LA FREQUENCE DE TRANSDUCTION DU CARACTERE "Met⁺" EN FONCTION DE LA MULTIPLICITE D'INFECTION.

Le phage ϕ M26 est multiplié sur la souche 444 ; la souche réceptrice est la 444::Tn5.17.



Les résultats consignés dans le tableau 23, montrent que le caractère "met⁺" est transféré de la souche 444 à la souche 444 :: Tn5.17 par l'intermédiaire du phage $\emptyset M_{26}$. Les transductants sont prototrophes et ont tous perdu le caractère de résistance à la Km. Ces résultats confirment ceux obtenus à l'issue de l'expérience précédente et concordent parfaitement avec ceux rapportés par BUCHANAN-WOLLASTON qui a travaillé sur des souches de R. leguminosarum (11).

c) Influence de la multiplicité d'infection (m.o.i) sur la transduction

D'après la figure 11, nous constatons que la fréquence de transduction dépend considérablement de la multiplicité d'infection. Quand on augmente la m.o.i, le nombre de particules par bactérie est plus élevé ; ce qui entraîne une augmentation de la fréquence de transduction. Le même phénomène a été décrit chez Salmonella typhimurium (16).

d) Origine de l'ADN des particules transductrices

Nous avons multiplié le phage $\emptyset M_{26}$ sur la souche 444 :: Tn5.40, dont l'ADN a été préalablement alourdi par la bromouracile (BU). Nous avons ensuite soumis le lysat purifié et concentré à une ultra centrifugation en gradient de chlorure de césium (ClCs) (voir "MATÉRIEL et MÉTHODES").

Comme nous pouvons le constater sur la figure 12 le pic représentant le maximum d'activité transductrice a une densité relative par rapport au ClCs, qui est plus élevée que celle correspondant aux particules phagiques infectieuses (u.f.p.).

Ces résultats montrent d'une part que les particules phagiques transductrices contiennent de l'ADN bactérien alourdi par la bromouracile, et d'autre part que les particules phagiques infectieuses contiennent de l'ADN synthétisé après l'infection.

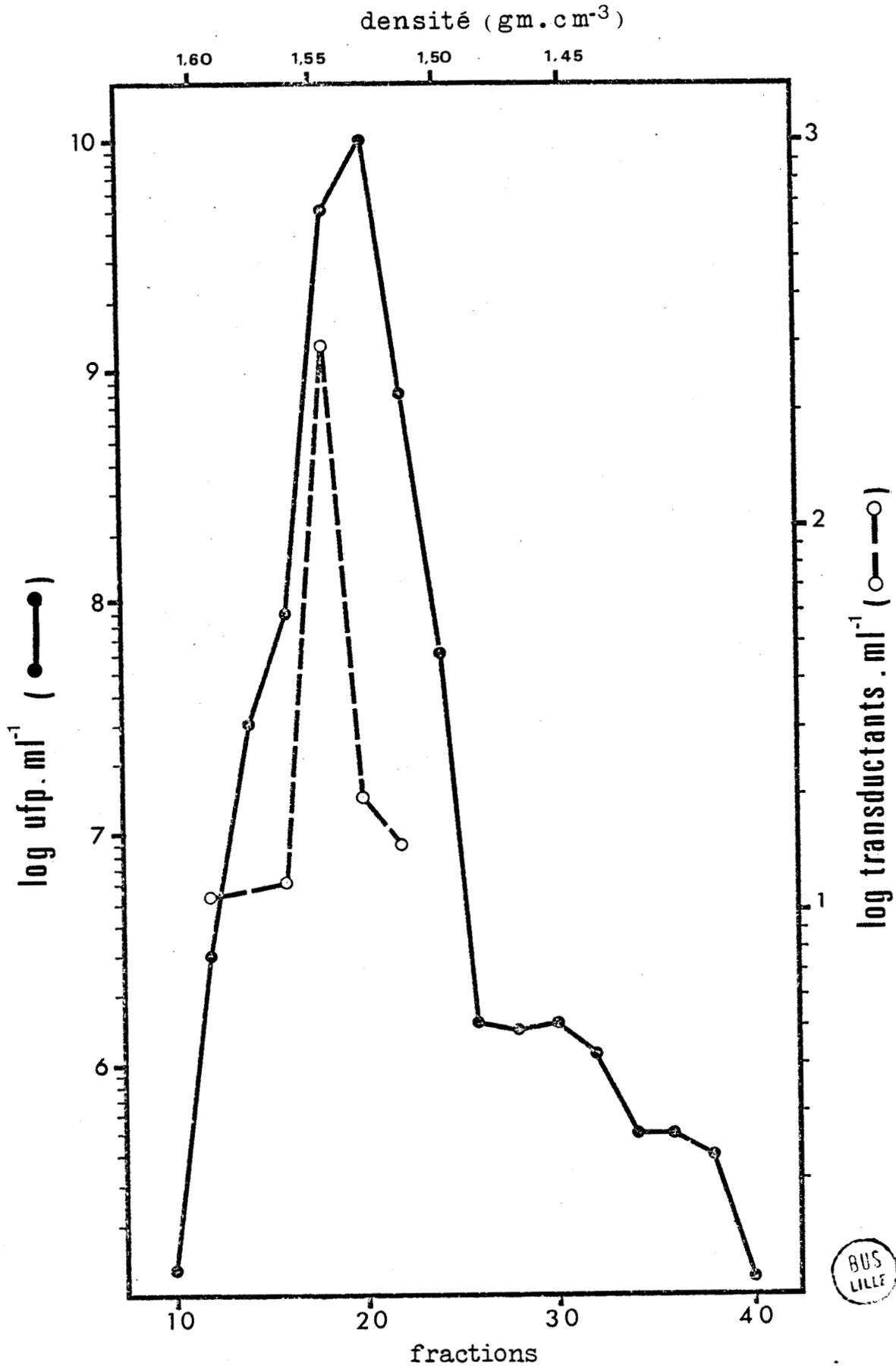


Figure 12 : Séparation des particules infectieuses (ufp) et des particules transductrices en gradient de densité de ClCs.

Des travaux similaires réalisés par IKEDA et TOMIZAWA (27) sur Escherichia coli ont conduit à la même conclusion. En effet, ces auteurs ont remarqué que lorsque le phage P1 est multiplié sur une souche bactérienne en présence de ^{32}P , aucune radioactivité n'est décelée dans les particules transductrices. En d'autres termes, ces particules contiennent de l'ADN synthétisé avant l'infection.

Par ailleurs, EBEL-TSIPSIS et coll. (16) ont montré que les particules transductrices issues de la multiplication du phage P22 sur une souche de Salmonella typhimurium, contiennent une association d'ADN bactérien et d'ADN phagique (représentant de 12 à 15 % de l'ADN total). Ils ont conclu que des fragments d'ADN phagique synthétisés après infection s'intègrent par recombinaison dans des segments d'ADN bactérien. Ces mêmes auteurs ont montré que ni le système de recombinaison de la bactérie (rec), ni celui du phage P22 (erf), ne sont nécessaires pour la transduction (17).

Enfin, nos résultats concordent parfaitement avec ceux obtenus par SIK et coll. (53) qui ont montré que la transduction chez R. meliloti réalisée par le phage 11, est également due à des particules phagiques qui encapsident de l'ADN bactérien synthétisé avant l'infection.

CONCLUSION

GENERALE

Ce travail a consisté en l'étude de la lysogénie et de la transduction chez Rhizobium meliloti.

Nous avons donc été amené dans un premier temps, à rechercher des souches lysogènes parmi les souches de notre collection. Pour ce faire, l'irradiation aux rayons ultraviolets s'est avérée tout-à-fait appropriée à cette étude, et parfaitement adaptée à notre matériel.

Parmi les 45 souches étudiées de R. meliloti, 15 d'entre elles se sont révélées porteuses d'un prophage qu'elles peuvent libérer spontanément. Cette libération est augmentée par l'irradiation aux UV.

Ensuite, en nous basant sur la sensibilité des souches bactériennes aux phages tempérés isolés, nous avons déterminé le spectre de spécificité d'hôte de ces phages.

Par ailleurs, nous avons montré que l'efficacité d'étalement d'un phage varie d'une souche à l'autre, ce qui laisse soupçonner l'existence de systèmes de restriction-modification chez ces souches. Des travaux en cours vont nous permettre de mieux comprendre ce phénomène encore très peu connu chez Rhizobium.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons étudié l'influence de la lysogénie sur la sensibilité des souches bactériennes à différents phages de notre collection. Ceci nous a permis de mettre en évidence des parentés entre différents phages tempérés.

En effet, certains phages se sont avérés "homo-immuns", autrement dit, ils sont incapables de se développer sur une souche portant un phage tempéré. C'est le cas de la souche M_5N_1 qui est résistante aux phages $\emptyset M_{14}$, $\emptyset M_{1-5}$, $\emptyset A 161$, $\emptyset 5B$ et $\emptyset 51B$. Ceci est la conséquence de la répression de leur ADN par le represseur du prophage $\emptyset M_5N_1$.

Nous avons particulièrement détaillé, l'étude des phages $\emptyset 1$, $\emptyset 2$, $\emptyset 3$, $\emptyset L9$ et $\emptyset M_{20}$, ces phages s'étant révélées étroitement apparentés. La souche M_9S lysogénisée par l'un ou l'autre de ces phages, devient résistante aux autres phages à l'exception de $\emptyset 2$. Ce dernier serait un phage tempéré dont les sites spécifiques pour l'attachement du presseur ont été modifiés par suite d'une mutation.

Enfin, nous avons mis en évidence la transduction du transposon Tn5 grâce au phage $\emptyset M_{26}$. Les transductants deviennent exigeants en leucine, ce qui confirme l'insertion du Tn5 dans le gène "Leu" chez la souche 444 :: Tn5.40. (2).

Par ailleurs, le phage $\emptyset M_{26}$ est aussi capable de transférer le gène "met⁺" d'une souche prototrophe : la 444, à une souche auxotrophe : 444 :: Tn5.17.

Ces résultats concordent parfaitement avec ceux rapportés chez R. leguminosarum (11).

Nous avons également montré que la fréquence de transduction dépend considérablement de la multiplicité d'infection.

Nous avons ensuite recherché l'origine de l'ADN des particules transductrices ; il s'est avéré qu'elles contiennent de l'ADN bactérien synthétisé avant l'infection. Par contre, les particules phagiques infectieuses encapsident de l'ADN phagique synthétisé après l'infection. Ces résultats confirment les travaux antérieurs de IKEDA et TOMIZAWA (27), EBEL-TSIPSIS et coll. (16) et SIK et coll. (53).

L'application de ces techniques de transduction à l'ensemble de la collection des phages du laboratoire, constitue une voie très intéressante pour l'analyse génétique de R. meliloti. Son association avec d'autres techniques telles que l'hybridation de molécules d'ADN et le clonage nous permet-

tra de mieux comprendre le comportement génétique de R. meliloti et son rôle dans la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ADAMS M.H. (1959)
The bacteriophages.
Interscience publishers, N.Y. - London.
- 2 - ALI H. (1982)
Obtention de mutants chez *Rhizobium meliloti* par l'insertion du transposon Tn5 et étude de leurs révertants.
Doctorat de Troisième Cycle n°963. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 3 - ANDRIANTSIMIAVONA R.M. (1981)
Etude de la multiplication phagique chez *Rhizobium meliloti* à l'aide de procédés sérologiques.
Diplôme d'Etudes Approfondies. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 4 - ARBER W. and S. LINN (1969)
DNA modification and restriction.
Ann. Rev. Biochem., 38 : 467-500.
- 5 - BALASSA G. (1963)
Genetic transformation of *Rhizobium*.
Bacteriol. Rev., 27 : 228-241.
- 6 - BARNET Y.M. and J.M. VINCENT (1970)
Lysogenic conversion of *Rhizobium trifolii*.
J. Gen. Microbiol., 61 : 319-325.
- 7 - BEN BRAHIM M.T. (1980)
Contribution à l'étude des bactériophages de *Rhizobium meliloti*.
Doctorat d'Université n°104. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 8 - BERG D.E., J. DAVIES, B. ALLET and J.D. ROCHAIX (1975)
Transposition of R-factor genes to bacteriophage λ .
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 72 : 3628-3632.
- 9 - BORDET J. et M. CIUCA (1921)
Remarques sur l'histoire des recherches concernant la lyse transmissible.
C. R. Soc. Biol. (Paris), 84 : 745-747.

- 10 - BRADLEY D.E. and D. KEY (1960)
The fine structure of bacteriophages.
J. Gen. Microbiol., 23 : 553-563.
- 11 - BUCHANAN-WOLLASTON V. (1979)
Generalized transduction in *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 112 : 135-142.
- 12 - DAVIES R.J. Jr. (1958)
A temperate bacteriophage associated with a strain of root nodule
bacteria.
Bacteriol. Proc., 1958, 10.
- 13 - DELATTRE J.M. (1971)
Introduction à une étude génétique du genre *Rhizobium*.
Thèse de Docteur-Ingénieur n°121. Université des Sciences et
Techniques de Lille.
- 14 - DELBRÜCK M. (1940)
The growth of bacteriophage and lysis of the host.
J. Gen. Physiol., 23 : 643-660.
- 15 - DUCKWORTH D.H. (1976)
In "Who discovered bacteriophage ?".
Bacteriol. Rev., 40 : 793-802.
- 16 - EBEL-TSIPSIS J., D. BOTSTEIN and M.S. FOX (1972)
Generalized transduction by bacteriophage P22 in *Salmonella*
typhimurium. I. Molecular origin of transducing DNA.
J. Mol. Biol., 71 : 433-448.
- 17 - EBEL-TSIPSIS J., M.S. FOX and D. BOTSTEIN (1972)
Generalized transduction by bacteriophage P22 in *Salmonella*
typhimurium. II. Mechanism of integration of transducing DNA.
J. Mol. Biol., 71 : 449-469.
- 18 - ELLIS G.L. and M. DELBRÜCK (1939)
The growth of bacteriophage.
J. Gen. Physiol., 22 : 365-381.

- 19 - ELLIS N.J., G.G. KALZ and J.J. DONCASTER (1962)
Transformation in *Rhizobium meliloti*.
Canad. J. Microbiol., 8 : 835-840.
- 20 - ESKIN B. and S. LINN (1972)
The deoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes
of *Escherichia coli* B.
J. Biol. Chem., 247 : 6183-6191.
- 21 - EVANS J., Y.M. BARNET and J.M. VINCENT (1979)
Effect of a bacteriophage on the colonization and nodulation of
clover roots by a strain of *Rhizobium trifolii*.
Canad. J. Microbiol., 25 : 968-973.
- 22 - EXPERT D. and J. TOURNEUR (1982)
 Ψ , a temperate phage of *Agrobacterium tumefaciens*, is mutagenic.
J. Virol., 42 : 283-291.
- 23 - GABOR M. (1965)
Transformation of streptomycin markers in rough strains of
Rhizobium lupini.
Symp. Biol. Hung., 6 : 75.
- 24 - GLOVER S.W., J. SCHELL, N. SYMONDS and K.A. STACEY (1963)
The control of host induced modification by phage P1.
Genet. Res., 4 : 480-482.
- 25 - d'HERELLE F. (1917)
Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 165 : 373-375.
- 26 - HERSHEY A.D. and M. CHASE (1952)
Independant functions of viral protein and nucleic acid in the
growth of bacteriophage.
J. Gen. Physiol., 36 : 39-56.
- 27 - IKEDA H. and J.I. TOMIZAWA (1965)
Transducing fragments in generalized transduction by phage P1.
J. Mol. Biol., 14 : 85-109.

- 28 - IMANAKA T., K. UCHIDA and S. AIBA (1982)
Phenotypic variation in re-lysogenization of *Bacillus licheniformis* with temperate phage.
Arch. Microbiol., 132 : 75-78.
- 29 - JACOBY G.A. and L. SUTTON (1982)
Restriction-modification systems determined by *Pseudomonas* plasmids.
Plasmid, 8 : 141-147.
- 30 - JARVIS A.W. (1978)
Serological studies of a host range mutant of lactic streptococcal bacteriophage.
Appl. Environ. Microbiol., 36 : 785-789.
- 31 - KORNBERG A., S.B. ZIMMERMAN, S.R. KORNBERG and J. JOSSE (1959)
Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic. VI. Influence of bacteriophage T2 on the synthetic pathway in host cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 45 : 772-785.
- 32 - KRSMANOVIC-SIMIC D. et M. WERQUIN (1973)
Etude des bactériophages de *Rhizobium meliloti*.
C. R. Acad. Sci. (Paris), série D, 276 : 2745-2748.
- 33 - KOWALSKI M. (1966)
Lysogeny of *Rhizobium meliloti*.
Acta Microbiol. Polon., 15 : 119-128.
- 34 - KOWALSKI M. (1967)
Transduction in *Rhizobium meliloti*.
Acta Microbiol. Polon., 16 : 7-12.
- 35 - KOWALSKI M. et J. DENARIE (1972)
Transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation de l'azote chez *Rhizobium meliloti*.
C. R. Acad. Sci. (Paris), série D, 275 : 141-144.
- 36 - LESLEY S.M. (1982)
A bacteriophage typing system for *Rhizobium meliloti*.
Canad. J. Microbiol., 28 : 180-189.

- 37 - LEVINE M. (1957)
Mutation in the temperate phage P22 and lysogeny in *Salmonella*.
Virology, 3 : 22-41.
- 38 - LINDBERG A.A. (1973)
Bacteriophage receptors.
Ann. Rev. Microbiol., 27 : 205-241.
- 39 - LURIA S.E. and T.F. ANDERSON (1942)
The identification and characterization of bacteriophages with
the electron microscope.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 28 : 127-130.
- 40 - LWOFF A. (1953)
Lysogeny.
Bacteriol. Rev., 17 : 269-337.
- 41 - MANNASSE R.J., R.C. STAPLES, R.R. GRANADOS and E.G. BARNES (1972)
Morphological, biological and physical properties of *Agrobacterium tumefaciens* bacteriophages.
Virology, 47 : 375-384.
- 42 - MARSHALL K.C. (1956)
A lysogenic strain of *Rhizobium trifolii*.
Nature, 177 , 92.
- 43 - MESELSON M., R. YUAN and J. HEYWOOD (1972)
Restriction and modification of DNA.
Ann. Rev. Biochem., 41 : 447-466.
- 44 - OTSUJI N., M. SEKIGUCHI, T. IJIMA and Y. TAKAGI (1959)
Induction of phage formation in the lysogenic *Escherichia coli*
K12 by mitomycin C.
Nature, 184 : 1079-1080.
- 45 - OUAHAL M. (1982)
Recherche d'une activité endonucléasique de restriction chez
Rhizobium meliloti.
*Diplôme d'Etudes Approfondies. Université des Sciences et
Techniques de Lille.*

- 46 - PARDEE A.B. and R.E. KUNKEE (1952)
Enzymatic activity and bacteriophage infection. II. Activities before and after infection.
J. Biol. Chem., 199 : 9-24.
- 47 - PASTRANA R. (1982)
Autoregulation of repressor synthesis in bacteriophage λ imm 434.
Biosci. Reports, 2 : 123-134.
- 48 - PATEL J.J. (1976)
Morphology and host range of virulent phages of *Lotus rhizobia*.
Canad. J. Microbiol., 22 : 204-212.
- 49 - PTASHNE M. (1967)
Specific binding of the phage repressor to λ DNA.
Nature, 214 , 232.
- 50 - SAHIM L. (1981)
Aspects de la restriction-modification chez *Rhizobium meliloti*.
Diplôme d'Etudes Approfondies. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 51 - SCHWINGHAMER E.A. (1965)
Host-controlled modification of *Rhizobium* bacteriophages.
Aust. J. Biol. Sci., 18 : 333-343.
- 52 - SHAPIRO J.A. (1976)
Observations on lysogeny in glutamic acid bacteria.
Appl. Environ. Microbiol., 32 : 179-182.
- 53 - SIK T., J. HORVATH and S. CHATTERJEE (1980)
Generalized transduction in *Rhizobium meliloti*.
Molec. Gen. Genet., 178 : 511-516.
- 54 - SINSHEIMER R.L. (1960)
In "The nucleic acids of the bacterial viruses". IV. Nucleic acids of temperate bacteriophages.
Ed. E. CHARGAFF and J.N. DAVIDSON. Acad. Press, INC, N.Y. and London, vol. III : 235-242.

- 55 - SIQUEIRA Jr. J.P. and J.L. AZEVEDO (1982)
Cure of prophage by 8-methoxypsoralen plus near UV light in
Staphylococcus aureus.
Rev. Brasil. Genet., 3 : 619-623.
- 56 - STANIEWSKI R. (1968)
Typing of *Rhizobium* by phages.
Canad. J. Microbiol., 16 : 1003-1009.
- 57 - STANIEWSKI R. and W. KOWALSKA (1974)
Typing of *Rhizobium meliloti* by means of phages.
Acta Microbiol. Polon., 2 : 183-186.
- 58 - SVAB Z., A. KONDOROSI and L. OROSZ (1978)
Specialized transduction of acysteinmarker by *Rhizobium*
meliloti phage 16-3.
J. Gen. Microbiol., 106 : 321-327.
- 59 - SZENDE K. and F. ÖRDÖGH (1960)
Die lysogenie von *Rhizobium meliloti*.
Naturwissenschaften, 17 : 404-405.
- 60 - TAKAHASHI I. and C. QUADLING (1961)
Lysogeny in *Rhizobium trifolii*.
Canad. J. Microbiol., 7 : 455-465.
- 61 - TWORT S.W. (1915)
An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses.
Lancet, 2 : 1241-1243.
- 62 - WARD D.F. and M.E. GOTTESMAN (1982)
Suppression of transcription termination by phage Lambda.
Science, 216 : 946-951.
- 63 - WATSON J.D. (1976)
Molecular biology of the gene.
3d Ed. W.A. BENJAMIN, INC Menlo Park (California).
- 64 - WEBER K. and M. OSBORN (1969)
The reliability of molecular weight determination by dodecyl
sulfate-polyacrylamide electrophoresis.
J. Biol. Chem., 244 : 4406-4412.

- 65 - WERQUIN M. et M.T. BEN BRAHIM (1977)
Etude des bactériophages de *Rhizobium meliloti*.
C. R. Acad. Sci. (Paris), série D, 284 : 1851-1854.
- 66 - WOLLMAN E. et E. WOLLMAN (1933)
Bactériophage et lyse secondaire.
C. R. Soc. Biol., 112 : 164-165.
- 67 - YAMAMOTO K. and B. ALBERTS (1970)
Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of
polyethylenglycol and its application to large scale virus
purification.
Virology, 40 : 734-744.
- 68 - ZELAZNA I. (1963)
Transformation of *Rhizobium*.
Acta Microbiol. Polon., 12 : 166-170.
- 69 - ZELAZNA I. (1964)
Transformation in *Rhizobium trifolii*. II. Development of competence.
Acta Microbiol. Polon., 13 : 283-289.

