

N° d'ordre : 1060

50376

1983

141

50376  
1983  
141

# 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

Larbi SAHIM

**APPROCHE GENETIQUE DE LA RELATION  
PHAGE - BACTERIE CHEZ *Rhizobium meliloti***



030 017314 8

Soutenue le 11 Juillet 1983 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury : MM.

J. GUILLAUME  
J.C. DERIEUX  
J. KREMBEL  
G. MARTIN  
R. TAILLIEZ

Président  
Rapporteur

Examineurs

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de microbiologie de l'université des sciences et techniques de Lille I.

Je tiens à exprimer ici mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME à qui je dois de nombreux conseils pour l'orientation de cette recherche et de fructueuses discussions au cours des expérimentations. Son enseignement riche et précis, ses qualités et sa longue expérience de chercheur, ont éveillé en moi le goût de la recherche fondamentale. Je lui exprime toute ma gratitude.

Je suis vivement reconnaissant à Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX qui a bien voulu être le rapporteur de cette thèse.

Je remercie Messieurs les Professeurs J. KREMBEL, R. TAILLIEZ et G. MARTIN qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir accepter de constituer le jury de soutenance de thèse.

Monsieur C. DEFIVES a toujours suivi mon travail avec une patience sans limite, qu'il trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance pour l'intérêt qu'il m'a manifesté tout au long de mes trois années de recherches.

Je voudrais encore exprimer ici mes remerciements à tous ceux ou celles qui ont concouru à la réalisation de ce travail par leur soutien technique, scientifique ou amical.

Le moment est venu de remercier H. OMAR et B. MOHAMMED pour leur aide matérielle et psychologique au cours de ce travail. Je les assure de mon amitié.

Enfin et surtout, je tiens à remercier mes parents de leurs encouragements et des sacrifices consentis pour mes études. Que cette thèse leur soit un témoignage de ma profonde gratitude.

# **TABLE DES MATIERES**

## AVANT-PROPOS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
I - Découverte des bactériophages	
II - Cycle lytique des phages T	12
A - Reconnaissance de l'hôte	13
B - Adsorption	14
C - Replication de l'ADN phagique	16
D - Expression des gènes phagiques	19
E - Assemblage et libération des phages	21
III - Moyens de défense de la bactérie contre l'infection phagique	23
A - Résistance	23
B - Lysogénie	25
IV - La restriction - modification	27
A - Les enzymes	29
B - Mécanisme de la réaction	32
C - Un système particulier	38
V - Aspect génétique	39

L'auteur vous prie d'excuser les nombreuses  
fautes d'orthographe dues à l'impression.

## MATERIEL ET METHODES

I - Souches bactériennes	
II - Bactériophages	46
III - Milieu de cultures et solutions	46
A - Tampon R	
B - Milieu riche (RC)	48
C - Milieu riche (TY)	49
D - Milieu de Luria	50
E - Gélose pour bactériophage	50
F - Tampon pour bactériophages	51
G - Antibiotiques	51
IV - Titrage des suspensions de phages	52
V - Calcul du coefficient d'efficacité d'étalement (e.o.p)	53
VI - Adsorption des phages sur les bactéries	53
VII - Croisement bactériens sur filtre	56
A - Application à la transposition	57
B - Application à la transmission du plasmide RP <sub>4</sub>	57
VIII - Mutagénèse chimique	58
- N - méthyl - N' - N - Nitrosoguanidine (NTG)	
- Ethyl méthyl Sulfossate (E.M.S.)	
- Mutagénèse successives (E.M.S., N.T.G., E.M.S.)	
IX - Techniques d'analyses des mutants	59
1 - Replication sur velours	60
2 - Stries croisées	60
3 - Microcupules	60
X - Lysogéinisation	61
XI - Mise en évidence électrophorétique des plasmides	61
Production de suspensions de phages à titre élevé	63
- Préparation et ensemencement	
- Paramètres de la culture	
- Lyse des bactéries	
- Concentration des bactériophages	
XIII - Technique particulière mise au point	67

## CHAPITRE I - MUTAGENÈSE

I - Mise en évidence de la restriction chez R. Meliloti	68
II - Mutagénèse par transposition	71
- Croisement E. Coli S659 × R. Meliloti M <sub>11</sub> S	
- Croisement E. Coli S659 × R. Meliloti M <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	
- Croisement E. Coli S659 × R. Meliloti M <sub>28</sub> S	
- Croisement E. Coli S659 × R. Meliloti M <sub>19</sub> S	
III - Mutagénèse chimique	77
A - NTG	77
B - EMS	80
C - Mutations successives	81
IV - Interprétation des résultats et discussion	81

## CHAPITRE II

### Influence de l'ADN extrachromosomique sur la relation phage-bactéries

I - Interactions des plasmides	84
A - Action du plasmide RP <sub>4</sub>	
B - Influence des plasmides indigènes	
II - Lysogéinisation	89
III - Interprétation des résultats et discussion	90
IV - Discussion générale et conclusion	92

## I - ABREVIATIONS :

mM : millimolaire

min : minute :

qsp : quantité suffisante pour

glc : glucose

Tris : Tris (hydroxy - méthyl - aminométhane)

Na<sub>2</sub> EDTA : acide éthylène diamine - tétra - acétique sel disodique

444::Tn<sub>5</sub> : signifie insertion du Tn<sub>5</sub> dans le chromosome bactérien

R.M. : restriction - modification

## II - NOTES

1 paire de bases  $\simeq$  660 daltons

1 dalton (masse d'un atome d'hydrogène :  $1,67 \cdot 10^{-24}g$ ) =  $10^{-6}$  Mégadalton

# AVANT PROPOS



Bien avant que nos ancêtres aient découvert l'existence des microbes, ils les utilisaient déjà, inconsciemment pour assurer par fermentation, gratuitement et sans consommation d'énergie, la production et la conservation d'aliments et de boissons.

Le monde microbien est vaste et varié, il englobe des organismes microscopiques, de formes et de tailles différentes, possédant des activités métaboliques distinctes. On les répartit dans les groupes suivants : virus, bactéries, levures, algues, champignons et protozoaires. D'assez importantes quantités d'informations décrivent les relations interspécifiques entre différents organismes d'une communauté naturelle. Les micro-organismes sont impliqués dans de telles relations. Les associations entre organismes ont des définitions différentes :

- si un avantage mutuel résulte de l'association entre les organismes engagés il est appelé symbiose ;
- si l'avantage profite à l'un des deux sans désavantage pour l'autre, il est dit commensalisme ;
- quand parfois l'un des partenaires subit des actions pathologiques, on parle de parasitisme.

L'avantage de l'association est défini généralement en terme de protection et de caractéristiques de reconnaissance. Dans plusieurs cas, il est clair qu'il y a un degré élevé de spécificité comme c'est le cas pour les bactéries du genre *Rhizobium* et certaines légumineuses.

L'homme a utilisé depuis des siècles le pouvoir de dégradation de la matière organique par les microbes. Un certain nombre de cycles biogéochimiques, permettent le retour au sol des éléments minéraux et des nutriments indispensables à la croissance des plantes.

Les cultures vivrières requièrent de grandes quantités d'azote. Celui-ci entre 79% dans la composition de l'atmosphère de notre planète. Il doit au préalable être transformé en particulier en ammoniac soit chimiquement, soit par voie biologique. Si comme l'affirment la plupart des experts, il est à prévoir que la situation alimentaire mondiale sera comparable dans les années 2.000 à la situation énergétique des années 1970, il y a toutes chances pour que la production bactérienne d'ammoniac prenne encore plus d'importance qu'elle n'en a aujourd'hui.

En effet, certaines bactéries du sol jouent un rôle capital en fixant l'azote atmosphérique, élément disponible en abondance et non soumis à des impératifs de frontières. En agriculture, l'emploi de ces micro-organismes est justifié par le faible coût des inoculats constitués par les bactéries symbiotiques (*rhizobium*).

Ceux-ci sont donc à la portée des paysans des nations en développement auxquels font défaut les moyens d'acquérir des engrais azotés artificiels fabriqués par des procédés chimiques qui ont l'inconvénient d'être onéreux et de polluer l'environnement, même si leur efficacité est par ailleurs reconnue. Tous les ans quelques 175 millions de tonnes d'azote sont ainsi transformées en engrais par des micro-organismes, ce qui représente 70% de l'apport d'azote total. Quant à la production mondiale d'azote chimique, elle a été estimée, pour 1980 à environ 54 millions de tonnes, alors que la consommation prévue était de 51 millions de tonnes.

D'après A. AYANABA, [ 6 ] la fixation biologique de l'azote peut s'opérer de 5 manières différentes (Tableau I) : dans 3 cas, on parle de fixation symbiotique, les micro-organismes fixateurs étant intimement associés aux végétaux, tandis que dans 2 autres cas (fixation asymbiotique) ; les micro-organismes qui produisent l'ammoniac, se trouvent à l'état libre dans le sol.

<i>Systèmes</i>	<i>Micro-organismes</i>	<i>Hôtes</i>	<i>Fourchettes des des quantités d'azote fixées (kg/ha/an)</i>
<b>Symbiotique</b> Rhizobium/ (Légumineuse)	Rhizobium (bactérie)	une centaine d'espèces végétales sur les 1.300 espèces connues de légumineuses.	40-400
Frankia/ non légumineuse)	Frankia (Actinomycètes)	Nombreux arbres et arbustes non légumineux, tels que Alnus, Myrica	9-362
Anabaena- Azollae	Anabaena Azollae (algue)	Fougère aquatique de l'espèce azolla	100-150
<b>Asymbiotique</b> algues bleues-vert	Plusieurs genres d'algues, par exemple : Anabaena, Aulosira, Gléotricha, Cyllindro, Spermium, Nostoc	Néant	3-100
Bactéries libres	Clostridium, Klebsiella, Azotobacter, Beijerinckia, Azospirillum, Rhodospirillum	Néant	1-100

Tableau I - Systèmes de fixation d'azote faisant intervenir des micro-organismes et quantités d'azote qu'ils fixent (6).



L'association *Rhizobium*/légumineuse est le type de symbiose le plus connu qui offre sur le plan technique et agricole, les plus grandes possibilités d'exploitation. Les bactéries, du genre *Rhizobium*, colonisent les racines de certaines légumineuses pour former des excroissances semblables à des tumeurs, appelées nodules. Ceux-ci fonctionnent, comme des usines de fabrication d'ammoniac. Le combustible nécessaire est fourni par la plante, et les bactéries transforment l'azote en ammoniac dans des conditions ambiantes de température et de pression. Ce processus coûte à la plante de 10 à 30% de ses produits photosynthétiques. En comparaison, la production d'engrais chimiques azotés exige des températures et des pressions élevées, et surtout consomme plus de 1,5 m<sup>3</sup> de gaz naturel par kilogramme d'azote produit.

En fait, c'est grâce à *Rhizobium* que les 6 principales légumineuses du monde -soja, arachide, pois chiche, haricot vert, dolique, cagan- dont le taux de protéines est très élevé, peuvent être produit avec un apport presque nul d'engrais azotés.

Traditionnellement, pour améliorer la fixation biologique de l'azote, on recherche dans la population naturelle des bactéries qui ont la plus forte capacité fixatrice. Toutes les innovations ayant pour objet d'accroître l'activité des bactéries concernées sont reçues avec un grand intérêt.

Les méthodes envisagées sont du domaine de la génétique et du génie biologique. Les méthodes envisagées sont :

- 1) l'infection des non légumineuses par des bactéries fixatrices d'azote, telles que des *Rhizobium*.
- 2) Le transfert des gènes de la fixation d'azote (gènes Nif) au sein des bactéries qui en sont dépourvues et qui peuvent normalement infecter des non légumineuses : ces bactéries doivent ensuite servir de véhicules pour transporter les gènes Nif dans les végétaux. L'étape -qui est la plus délicate- consiste à obtenir la fixation d'azote sur la plante infectée.
- 3) Le transfert direct des gènes Nif des bactéries fixatrices dans les cellules des plantes non légumineuses qui les rendraient ainsi aptes à fixer l'azote, à condition que l'expression des gènes Nif puisse s'y faire. L'intérêt de la recherche dans ce domaine, s'est manifesté sous diverses formes dans le milieu scientifique. Les conséquences pratiques des recherches sur *Rhizobium* sont déjà multiples, et un certain nombre de problèmes dans ce domaine sont en passe d'être résolus. Mais à mesure que se concrétisent les applications de nos connaissances, apparaissent de nouveaux problèmes plus complexes encore.

Les bactéries du genre *Rhizobium*, sont comme nous l'avons déjà dit des germes du sol. A ce titre elles dépendent d'une écologie spécifique, où les problèmes de compétitivité prennent une importance fondamentale. Les bactériophages capables d'infecter les *Rhizobium* jouent probablement un rôle important dans la nature, même si les recherches actuelles [ 59 ] ne donnent pas des résultats absolument significatifs.

La relation *Rhizobium*, Rhizobactériophages ne se limite pas à cet aspect purement sélectif. Elle a été utilisée pour tenter l'identification de souches de *Rhizobium* dans la rhizosphère. Le typage phagique a été suggéré en 1945 par CONN et COLL [ 18 ] et plus tard par STANIEWSKI 1970 [ 54 ].

Les rhizobiophages sont capables de distinguer *R. meliloti* de *R. léguminosarum* ; de *R. phaseoli* ou *R. trifolii*. Certains auteurs arrivent à subdiviser 71 souches de *R. meliloti* en 10 groupes par l'utilisation de 7 phages [ 40 ].

# INTRODUCTION



Les rhizobiophages peuvent modifier profondément les propriétés des cellules qu'ils infectent, sans les détruire, ils peuvent s'y installer jusqu'à parvenir à intégrer leur matériel génétique à celui de leur hôte, avec lequel il est apparemment compatible. Ces développements touchent aux mécanismes intimes des systèmes les plus fondamentaux du fonctionnement génétique au niveau moléculaire de la cellule vivante. Au laboratoire, les phages peuvent servir de vecteurs de clonage de fragments d'ADN moléculaire contenant le gène Nif.

L'ensemble de ces phénomènes nous a amené à aborder l'étude de la relation entre *R. meliloti* et ses bactériophages : et en particulier les moyens de défense de la bactérie vis à vis de son agresseur.

Le virus peut se heurter d'abord à une résistance bactérienne naturelle. Si non l'acide nucléique phagique pénètre dans la cellule, et s'il s'agit d'ADN, l'information génétique peut encore être mise en sommeil lorsqu'il y a lysogéinisation. Enfin, l'ADN doit échapper aux enzymes de restriction qui reconnaissent et détruisent un génome étranger à la bactérie.

Ces 3 phénomènes conditionnent la relation phage-bactérie et sont sous le contrôle génétique bactérien. Pour les étudier nous avons tenté de les faire varier au moyen de techniques de mutation traditionnelles ou plus modernes, telles que l'utilisation d'éléments d'ADN transposables.

## I - Découverte des bactériophages

L'isolement de l'agent responsable d'une lyse spécifique a été rapportée pour la première fois par TWORT en 1915. [ 58 ]

FELIX HUBERT D'HERELLE invente le terme de "bactériophagum" et de bactériophage un peu plus tard, quand il a appris que l'agent était un parasite de bactérie [ 23 ].

La découverte en 1940 que les bactériophages pouvaient aider à élucider les bases moléculaires de l'hérédité, a inauguré le succès de ce développement.

Les bactériophages et les virus en général sont des systèmes relativement simples et beaucoup plus faciles à analyser que les cellules des eucaryotes. L'étude des bactériophages a beaucoup contribué aux connaissances en virologie, puisque la plupart des phénomènes originaux observés chez les phages furent découverts plus tard chez les virus animaux. Les scientifiques de ces dernières années ont rendu possible, l'exploration des cellules eucaryotes au niveau moléculaire : on a ainsi les équivalences et les différences de la génétique des procaryotes et des eucaryotes. L'accessibilité de la recherche en biologie moléculaire des systèmes eucaryotes n'a pas empêché de continuer les travaux sur les bactériophages. Ces derniers restent un modèle important pour l'interaction cellules-virus. Les recherches actuelles sur les bactériophages ont pour but de sonder les mécanismes cellulaires d'*Escherichia coli* et spécialement les mécanismes sous-jacents de l'hérédité et de l'expression des gènes.

Il y avait bien sûr d'autres motivations, notamment l'utilisation des bactériophages comme modèle expérimental pour les virus les moins accessibles. L'emploi des méthodes biochimique et biophysique ont permis les découvertes de base notamment :

- Les mécanismes d'infection.
- L'importance de l'ADN et des protéines.
- Le concept des ARNm et des enzymes induites par des virus.
- L'intégration et l'excision des gènes viraux sur le génome de l'hôte.
- La restriction modification de l'ADN de l'hôte.

De plus l'utilisation des bactériophages a obtenu la confiance des scientifiques et des industriels pour le transfert des gènes à divers groupes bactériens tels que :

*Shigella, Salmonella, Proteus, Aerobacter, Vibrio, Streptococci, Corynebacteria* et les actinomycètes. [ 1 ]

Les recherches les plus intensives ont porté surtout sur certains groupes de phages et particulièrement sur les phages T de *E. coli* [ 1 ]. Et c'est à leur apparente simplicité que les bactériophages doivent d'avoir été si souvent étudiés par la génétique. La taille relativement réduite de leur gènes et leur isolement facile, fait d'eux le matériel idéal pour des études génétiques et biochimiques combinées.

L'image biologique la plus importante qu'ont relevé ces micro-organismes, est leur remarquable diversité. Ainsi les ''plus petits virus'' à ARN, permettant l'analyse de la sythèse protéique. Quant au virus à ADN, ils constituent le meilleur outil pour l'étude de la réplication, de l'activation et de la répression des gènes.

Les bactériophages constituent un groupe très hétérogènes où l'on trouve rassemblés des virus qui ont une structure et par conséquent des propriétés très différentes. A cette hétérogénéité structurale, ils allient une très forte unité écologique. Ils sont en effet tous transmis par un mécanisme commun.

Nous avons choisi de présenter le cycle lytique du phage T d'*E. coli*, car le cycle virulent des rhizobactériophages n'est pas encore parfaitement connu. Comme il a été démontré des identités structurales et morphologiques [ 59 ] entre les phages de *R. mélioti* et les phages T, on peut penser que les modes de reproduction pourraient être sinon identiques tout au moins très proches.

## II - Cycle lytique des phages T

Les phages ont été découvert il y a 35 ans [ 39 ]. Le T<sub>4</sub> et le T<sub>7</sub> sont parmi les mieux étudiés. Ce sont des bactériophages virulents qui perturbent les fonctions de la bactérie juste après l'infection. L'hôte le plus étudié est *E. coli*, mais leur activité peut s'étendre à d'autres entérobactéries.

Tous les phages T contiennent un ADN bicaténaire et ont quelques caractéristiques morphologiques communes : en particulier ils ont une tête polyédrique et possèdent une queue. Les T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> et T<sub>6</sub> sont très semblables morphologiquement, et immunologiquement ; ils subissent des complémentations et des recombinaisons génétiques [ 49 ].

L'hétérogénéité la plus frappante apparaît dans la région des gènes 37 et 38 qui codent pour des composantes des fibres de la queue déterminant ainsi la spécificité d'hôte de chacun [ 49 ]. La majorité des gènes identifiés chez les phages T sont des gènes essentiels dont la plupart sont désignés par des nombres que par des lettres [ 49 ]. Le système qui conditionne les mutations létales (donc bloque la croissance des phages) a été identifié dans ces mêmes gènes [ 49 ]. Les gènes "non essentiels" (généralement désignés par des lettres) sont identiques à ceux de l'hôte. Cependant, il est à remarquer que les gènes phagiques non essentiels peuvent devenir indispensables à la croissance du phage sous certaines conditions de culture ou dans des hôtes particuliers [ 49 ].

L'assemblage de ces bactériophages dont la structure est compliquée, est un processus plus élaboré que la simple réaction d'agrégation mise en oeuvre par un virus simple. Chez le T<sub>4</sub>, les produits d'une quarantaine de gènes différents et spécifiques interagissent pour la réalisation de la particule virale.

Beaucoup de ces gènes sont responsables de la synthèse des différentes protéines structurelles. Au cours du processus d'assemblage, les différentes composantes ne s'associent pas les unes aux autres au hasard pendant le cycle lytique. Bien au contraire, l'assemblage se fait selon une séquence bien définie et des mécanismes encore mal compris évitent qu'une étape spécifique, ne se produise avant que l'étape précédente ne soit terminée.

#### A. Reconnaissance de l'hôte

L'infection d'une bactérie commence par la reconnaissance des sites récepteurs dont nous parlerons ultérieurement.

Ce processus hautement spécifique est l'un des mécanismes naturels de reconnaissance de l'hôte. La phage T<sub>4</sub> qui lyse seulement *E. coli* et *Shigella*, peut aussi infecter des sphéroplastes de *Salmonella*, *Aerobacter*, *Proteus* et *Serratia* quand des sites récepteurs spécifiques sont éliminés [ 41 ].

Durant les 10 dernières années, la paroi cellulaire des bactéries gram négatif et gram positif a été étudiée intensivement du point de vue chimique, structural et fonctionnel. Quand les récepteurs phagiques commencèrent à être étudié en 1950, le choix s'est porté sur ceux des coliphages T [ 41 ].

## B. Adsorption

Pour les phages possédant une queue et notamment les phages T, l'adsorption se fait sur la surface cellulaire ; elle est suivie par la pénétration de l'ADN à travers la paroi puis la membrane plasmique. Les phages ne pénètrent pas dans la bactérie par une force brutale, mais par l'emploi des mécanismes de transport de la cellule [ 49 ].

Une simple collision n'est pas suffisante pour l'adsorption. A basse température par exemple, elle est plus faible. De même l'adsorption n'est pas proportionnelle aux nombres de cellules bactériennes et phagiques en présence, indiquant par là qu'il y a d'autres facteurs limitants que la simple collision. En effet, l'adsorption dépend fortement de la force ionique, du milieu, du pH, ainsi que de la présence dans le milieu de culture de sucres qui peuvent affecter soit la structure soit l'accessibilité aux récepteurs [ 49 ].

A partir du moment où les phages s'adsorbent irréversiblement sur la cellule, des changements très importants affectent la perméabilité membranaire qui est altérée. Des modifications de structures des plaques basales du phage et des réactions enzymatiques accompagnent probablement cette étape.

BAYER [ 8 ] suggère que l'attachement des plaques basales se fait au niveau d'une zone de fusion où la membrane externe et interne de la bactérie adhèrent l'une à l'autre. Cette zone de fusion semble être généralement importante pour le transport des macromolécules à travers l'enveloppe cellulaire des bactéries gram négatif. L'avantage de tels sites pour les phages est l'absence d'espace périplasmique qui contient généralement des composés toxiques. L'attachement irréversible est généralement suivi par une contraction de la queue dont la pointe du tube pénètre la membrane externe et les péptidoglyanes.

La libération du DNA semble exiger un signal de la cellule [ 49 ] puisqu'une supérintection par des phages peut se produire mais sans injection nécessaire de leur ADN [ 49 ]. Ceci montre bien que les phages n'agissent pas seulement comme une "seringue" lors de l'injection de leur ADN.

De plus quand on bloque la synthèse d'ATP au niveau de la membrane, la pénétration de l'ADN n'a pas lieu [ 49 ]. Ainsi lorsqu'une cellule est surinfectée par des phages, leur ADN au lieu de pénétrer la membrane, s'étale dans le périplasme où il est dégradé par les enconucléases I [ 3 ] qui empêche ainsi sa réplication.

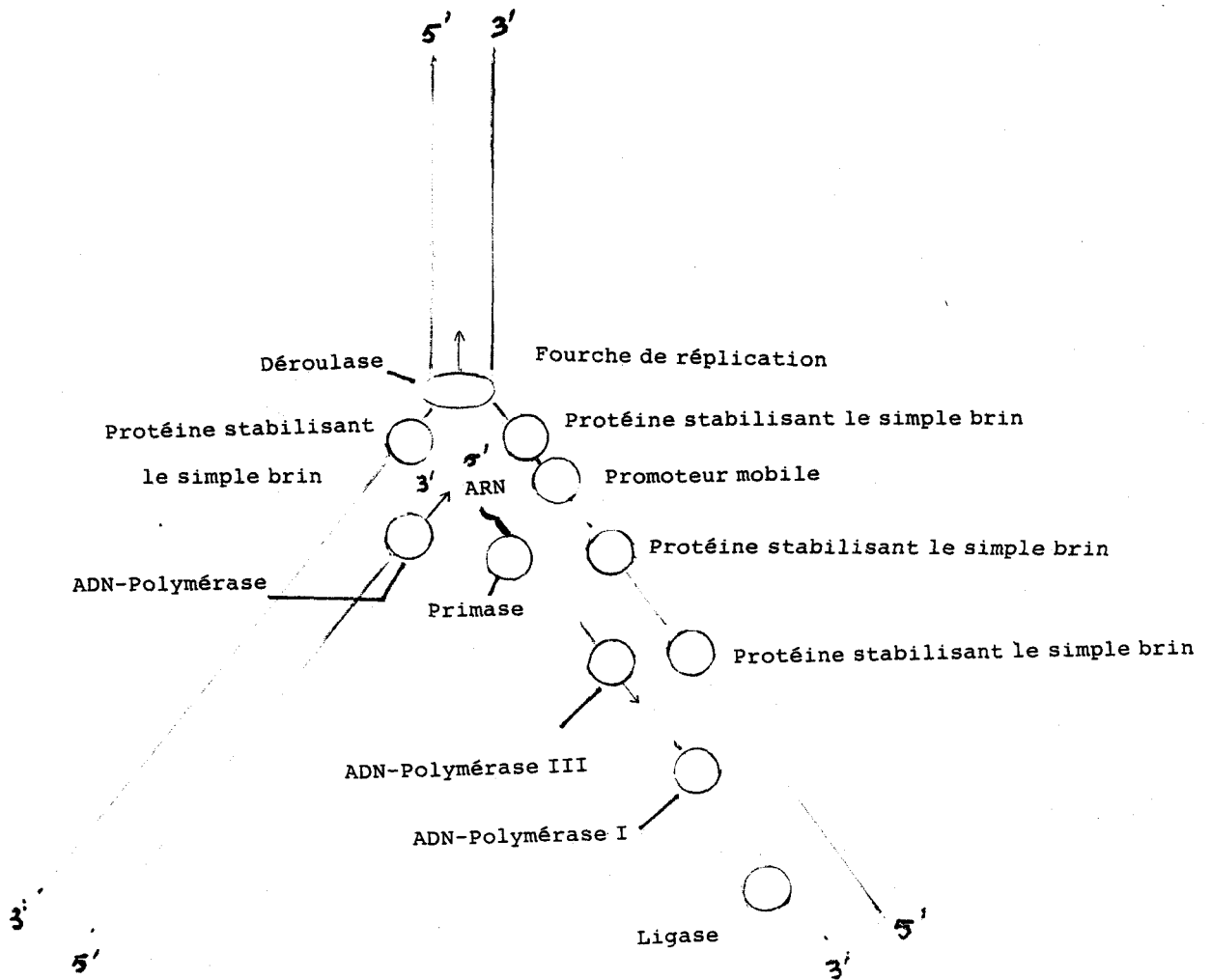


### C. Réplication de l'ADN phagique

Les phénomènes de la réplication et de la synthèse des bactériophages ont depuis longtemps attiré l'attention des microbiologistes et des biochimistes en particulier chez les phages T. La réplication commence par une étape hautement spécifique [ 33 ] à partir d'un site d'origine. Dans quelques cas, il s'agit d'une simple incision de l'une des chaînes de l'ADN parental, dans d'autres cas, il s'agit de la synthèse d'un premier acide nucléique nommé ('oriRNA'). La réplication est catalysée par un complexe enzymatique qu'on appelle réplisome [ 49 ]. Selon la taille et la structure de l'ADN, différents types de protéines sont nécessaires pour la séparation des chaînes [ 49 ]. Les mécanismes enzymatiques mis en jeu lors de la progression des fourches de réplication et de la synthèse de DNA qui l'accompagne sont très complexes. On distingue 3 types de protéines impliquées dans la progression des fourches. Fig. 1

- 1) Des DNA hélicases « DNA unwinding enzymes » qui utilisent l'énergie procurée par l'hydrolyse d'ATP ou (dATP) pour dérouler la double hélice du DNA parental en rompant les ponts d'hydrogène interchaînes.

Ce sont des enzymes ATPases dépendants.



- Schéma des étapes de la réplication de l'ADN double brin -

La chaîne de l'ADN "en avance" ("leading strand") croît de manière essentiellement continu dans le sens 5' → 3'. Cependant que la chaîne en "retard" ("lagging strand"), croît de façon discontinue par la coalescence de petits fragments de DNA ("fragments d'OKASAKI"). Ce système de synthèse est couplé à un système enzymatique qui assure la progression de la fourche de réplication par déroulement progressif de la double hélice parentale.

D'après KRUGER, D.H. et coll (1981).



2) DBP « DNA binding protéins » ou protéines de destabilisation ou « unwinding protéin » qui s'attachent fortement aux acides nucléiques monocaténares, destabilisant le DNA bicaténaire et se fixent aux régions à simple chaîne ainsi produites. La protéine dite « unwinding protéin » qui est un produit du gène 32 (pg 32) du phage T<sub>4</sub> est l'une des plus connue. Cette protéine n'a pas d'activité enzymatique, elle agit de façon stoechiométrique.

3) Des topoisomérases ou déroulases qui déroulent les spires hélicoïdales des DNA. Ces enzymes ont une activité endonucléasique qui introduit des coupures sur l'une des chaînes dans les DNA superhélicoïdaux. Parallèlement une activité restaure la continuité du DNA dès que la superhélice a été déroulée localement. L'élongation proprement dite de la chaîne d'ADN est assurée par l'ADN polymérase, codée par le génome phagique dans le cas des phages T.

Toutes les DNA polymérases connues (y compris les transcriptases réverses) assurent uniquement la polymérisation des nucléotides dans le sens 5' — 3'. La naissance d'une chaîne fille procède par bonds successifs et la chaîne finale est formée par coalescence de petits fragments que l'on appelle « fragments d'OKASAKI » [ 42 ].

L'élongation des 2 chaînes filles ne requièrent pas les mêmes systèmes enzymatiques de part et d'autre de la fourche de réplication. Du côté de la chaîne qui croît dans le sens 5' → 3' « leading strand » il suffit d'une DNA polymérase aidée éventuellement de facteurs d'élongation. Du côté de la chaîne qui croît dans le sens 3' → 5' « lagging strand » un promoteur mobile fournit un site de reconnaissance à une primase qui met en place de courtes amorces d'ARN « RNA primer », celles-ci seront plus tard remplacées par l'ADN. La polymérase III vient alors allonger le brin en enchaînant des nucléotides d'ADN à la suite de l'amorce ; la polymérase I passe par derrière, « relit » la séquence, excise les nucléotides incorrects et corrige les fautes. Finalement, la ligase relie entre eux les différents fragments du brin récemment synthétisé.

#### **D. Expression des gènes phagiques**

Il existe chez tous les bactériophages à ADN, 2 grands types de gènes que l'on peut distinguer d'après l'instant de leur expression au cours du cycle biologique :

- Les gènes précoces sont les seuls à s'exprimer au début de l'infection.
- Les gènes tardifs ne s'expriment que tard dans le cycle après le début de la réplication du génome phagique.

Chez les phages de haute complexité génétique comme le phage T<sub>4</sub>, on peut même identifier jusqu'à 4 groupes de gènes qui diffèrent par la chronologie de leur activation dans le cycle de multiplication.

- gènes précoces immédiats « immediats early »,
- gènes précoces retardés « delayed early »,
- gènes quasi tardifs ou intermédiaires « midlle »,
- gènes tardifs « late ».

Seuls les gènes précoces immédiats qui permettent la multiplication de l'ADN phagique, peuvent s'exprimer si l'infection est réalisée en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique. Ceci s'explique par le fait que leur transcription est assurée par la RNA polymérase cellulaire.

L'expression des gènes intermédiaires nécessite l'intervention de protéines phagiques précoces et continue tout au long de la phase tardive.

Les gènes tardifs s'expriment seulement après le démarrage de la répllication du DNA phagique et nécessitent souvent en outre l'intervention des produits d'un ou de plusieurs gènes précoces. Ces gènes tardifs codent essentiellement pour des protéines structurales ou non structurales éventuellement nécessaires à l'assemblage des phages.

On peut schématiquement distinguer 4 étapes dans l'expression d'un gène, à chaque étape correspond un niveau de régulation. D'abord la transcription du gène (synthèse du RNAm), les modifications post-transcriptionnelles de son messager, la traduction de celui-ci en protéines et les éventuelles modifications post-traductionnelles de la protéine synthétisée.

#### E. Assemblage et libération des phages

Les connaissances que l'on a de l'assemblage des bactériophages résultent le plus souvent d'observations faites en microscopie électronique et d'expériences réalisées *in vitro*. Leurs morphogénèse a été étudiée par plusieurs groupes de chercheurs et avec différents bactériophages (KELLENBERGER 1976 [ 32 bis ] HONN et COLL 1977 [ 29 ] ). Le phage T4 possède une tête de 80 nm de diamètre dont les sous unités protéiques sont arrangées selon une symétrie icosaédrale, et contient un ADN bicatenaire. A l'un des sommets de cette tête, est attachée une queue de 110 nm de long.

La tête du bactériophage est formée à partir des protéines pg8 ; pg9 ; pg10 ; pg13 ; pg14 ; pg15 ; pg16 qui s'assemblent dans un premier temps pour constituer une prétête. En présence de pg18 ; pg19 et l'ADN, la prétête subit une série de transformations qui aboutissent à sa forme définitive et à l'encapsidation du DNA.

Les événements permettant cette maturation mettent en jeu de nombreuses protéases phagiques qui dégradent les protéines internes de la tête de manière à y permettre la pénétration du DNA [ 23 ].

La queue du phage, dont la synthèse et la morphogénèse se sont effectuées parallèlement vient ensuite se fixer à la tête à l'aide de structures préparées à cet effet par l'action des protéines pgl1 et pgl2. Les étapes finales de la maturation du DNA sont synchrones avec l'achèvement de la capsid.

Le DNA de T<sub>4</sub>, nouvellement synthétisé, s'accumule dans la cellule, sous forme de longs concatémères. Sa maturation en molécules génomiques implique un découpage, lequel apparaît couplé à l'encapsidation. Ce processus requiert l'intervention de plusieurs protéines qui assurent l'aspiration du DNA au sein des têtes et sa supercompaction.

Le DNA s'enroule dans la tête du phage sous la forme d'une bobine dont l'axe est perpendiculaire à celui de la queue de la particule. Ce phénomène spectaculaire s'accompagne du découpage des molécules concatémères, de façon telle que chaque tête de phage englobe environ 102 p. 100 de la longueur d'un génome. On pense que le découpage du DNA serait le fait d'une endonucléase spécifique produite par le gène 49 du phage.

La quantité de DNA encapsidé par virion semble dépendre uniquement du volume des têtes [ 23 ].

La libération des nouvelles particules phagiques résulte de la lyse de la paroi bactérienne par le lysozyme, protéines pg3.5 du phage [ 24 ].

### III - Moyens de défense de la bactérie contre l'infection phagique

Les phénomènes décrits concernent les phages virulents. Mais même dans le cas de bactéries et de virus ayant une spécificité d'hôte *a priori* compatible, des événements peuvent empêcher ou différer le cycle lytique.

Ainsi des modifications génétiques chez la bactérie peuvent entraîner une résistance aux phages. On peut également parfois constater la lysogéinisation. Ces deux cas sont connus depuis fort longtemps chez de nombreuses espèces bactériennes et nous les étudierons succinctement.

Par contre nous insisterons sur le phénomène de la restriction, modification dont le développement des études est plus récent et présente un intérêt particulier en raison même de sa nature.

#### A. Résistance

La sensibilité d'une bactérie à l'infection par un bactériophage dépend d'abord du fait qu'elle possède ou non des sites récepteurs et des possibilités d'accès permises aux phages afin que ceux-ci puissent s'adsorber à la surface de la bactérie.

Leur reconnaissance est un processus hautement spécifique. Lorsqu'une bactérie ne permet plus l'adsorption de bactériophages on dit qu'elle est résistante.



Les récepteurs se situent à la surface des bactéries le plus souvent au niveau de la paroi. La membrane externe des bactéries gram négatif est composée d'un complexe lipopolysaccharidique (LPS), de protéines et de phospholipides [ 8,41 ]. Les LPS sont certainement les entités les plus exposées à la surface cellulaire [ 41 ] et donc les plus accessibles aux phages. La fonction des lipides est de stabiliser la configuration des sites d'attachement pour permettre une bonne adsorption. Les phages T3, T4 et T7 s'adsorbent sur les LPS. Par contre T2 et T6 s'attachent sur les composés lipoprotéiques [ 32 ]. La membrane externe isolée inhibe ces phages *in vitro*.

Des mutants bactériens résistant à T3, T4 et T7 ont été isolés d'*E. coli* et l'étude est accompagnée par une perte d'hexoses et d'héptoses au niveau des LPS [ 41 ].

L'adsorption implique une interaction stréospécifique des fibres distales de la queue et une modification des LPS [ 49 ]. Puisque ce sont les fibres de la queue qui interagissent avec les récepteurs, il est important qu'elles soient gardées dans une position qui leur permet la fusion. L'attachement irréversible des fibres de la queue d'un phage avec les récepteurs, explique la nécessité de ce complexe macromoléculaire.

La résistance à un phage peut être provoquée soit par un changement de conformation qui cause une distorsion des fibres de la queue, soit par dissimulation physique des points d'attache par d'autres composés de la membrane externe ou par les 2 phénomènes à la fois. [ 41 ]

Dans certains cas les récepteurs de phages sont répartis sur des appendices de la bactérie, comme les flagelles ou les pili. Les cas les plus marquants sont ceux des phages filamenteux à ADN ( $F_1$ ,  $M_{13}$ ,  $Fd$ ) dont les récepteurs sont localisés à la seule extrémité des pili sexuels (pili F) des souches mâles d'*E. coli*, et des phages à ARN ( $F_2$ ,  $MS_2$ ,  $R_{17}$ ,  $Q\beta$ , etc...) dont les récepteurs sont répartis sur toute la longueur des même pili F. [ 41 ] Les bactéries femelles n'ayant pas de pili F sont insensibles à ces deux types de phages.

### B. Lysogénie

L'interaction entre un bactériophage et son hôte conduit parfois à l'association intime de tout ou partie du génome phagique avec celui de la cellule : le bactériophage devient alors un prophage et la bactérie est dite lysogène. Les exemples les plus connus et les mieux étudiés d'interactions de ce type sont ceux des phages tempérés, ( $\lambda$ ,  $P_2$ ,  $P_{22}$ ,  $Mu-1$ , etc) avec leurs hôte. [ 20 ] Les bactéries lysogènes, manifestent plusieurs propriétés antigéniques et physiologiques nouvelles qui traduisent la persistance du prophage en leur sein, et sont notamment résistant à toute surinfection par un phage homologue.

Mais il arrive que le prophage soit réactivé, on parle alors d'induction. Elle peut être spontannée, ou provoquée par des agents physicochimiques.

L'intégration de l'ADN du prophage dans le chromosome bactérien est rendu possible par deux systèmes : un système de répression, qui empêche le déroulement du cycle lytique normal du phage et un système d'intégration, qui permet l'insertion de son ADN dans celui de l'hôte. Au moment de l'infection, le phage parental se trouve placé devant deux possibilités : lysogénie ou cycle lytique.

Le choix final entre son intégration ou sa multiplication dépend de plusieurs facteurs de régulation qui tiennent à la cellule hôte, au phage lui-même et aux conditions de culture.

Tous les phages tempérés n'obéissent pas exactement au même schéma de régulation moléculaire. Alors que le phage  $\lambda$  s'intègre toujours en un point précis sur le chromosome d'*E. coli* [ 20 ] le phage Mu-1 s'intègre au hasard dans n'importe quel endroit de l'ADN.

Quant au phage P<sub>1</sub>, il demeure à l'état d'élément extrachromosomique aussi bien à l'état de prophage que lors du cycle lytique [ 20 ].

Les modifications qu'entraînent la présence du prophage dans la bactérie lysogène constituent la conversion lysogénique. Les exemples les plus cités sont ceux de la modification des antigènes de paroi chez les *Salmonella* et la sécrétion de toxine diphtérique chez *Corynebacterium diphteriae*. On voit que le phénomène de conversion lysogénique traduit l'expression persistante d'une partie au moins des gènes du prophage dans la bactérie hôte.

#### IV - LA RESTRICTION - MODIFICATION

Si un bactériophage X multiplié dans une souche bactérienne A, est utilisé pour infecter une autre souche B on constate que, malgré une bonne adsorption, le phage ne se multiplie qu'à une faible fréquence. Par contre, les phages issus de telles multiplications exceptionnelles, ont une efficacité maximale sur le nouvel hôte B : ils ont été modifiés au cours de leur croissance sur ce deuxième hôte. Cette modification est de nouveau perdue si l'on retourne sur la souche d'origine A. Il ne s'agit donc pas d'une sélection de mutants génétiques du phage. Ce phénomène est connu sous le nom de ''modification de phages contrôlés par la souche hôte''. Beaucoup d'auteurs ont décrit de telles modifications : ARBER 1974, 1975, BOYER 1964, MESELSON 1968. Dans la grande majorité des cas, la modification résulte d'une méthylation de certaines bases constitutives de l'ADN : elle aboutit à la fonction de 2 résidus 5 méthyl cytosine (5 M-C) ou 6 méthyl aminopurine (6MAP) par site et suivant les systèmes.

Si le phage est accepté par le nouvel hôte, il s'y multiplie et acquiert la spécificité conférée par ce nouvel hôte. Sur d'autres hôtes le phage n'est pas accepté, sa croissance est restreinte car son ADN est reconnu comme ''indésirable'' par la cellule qui s'en débarrasse en le dégradant : c'est la restriction. Cette restriction s'opère par coupure de l'ADN réalisée par des endonucléases en des endroits précis appelés sites d'action ou sites de spécificités.

La reconnaissance spécifique de certaines séquences nucléotidiques par des protéines particulières est un problème central pour beaucoup de processus biologiques fondamentaux. Un exemple de ce processus de reconnaissance est présenté par les endonucléases de restriction-modification.

Les systèmes de restriction-modification constituent un excellent exemple de ces processus de reconnaissance. Ils ne s'adressent pas seulement à l'ADN phagique dont ils tendent à protéger leur propre cellule mais ils sont en général actifs lors de toute tentative naturelle ou expérimentale de pénétration d'ADN étranger. La plupart des connaissances sur la restriction-modification en terme moléculaire viennent d'études faites sur *E. coli*.

Le système de restriction-modification est unique dans son genre puisque les 2 enzymes ayant des activités catalytiques très différentes, reconnaissent avec une haute fidélité les mêmes séquences du DNA. Les déterminants de leur activité peuvent résider soit sur le chromosome bactérien (12, 5, 13, 11, 14, 60) soit sur des éléments épisomiques (16, 30, 31).

## A. Les enzymes

Depuis l'isolement de l'endonucléase de restriction d'*E. coli* K par MESELSON et YUAN (46), un nombre très important d'enzymes ont été purifiés à partir de diverses souches bactériennes. Il était donc nécessaire de trouver une nomenclature générale pour chacune d'elles.

En 1973, SMITH et , NATHANS ont proposé la nomenclature suivante :

- 1) Le nom du genre et de l'espèce où l'organisme hôte est identifié par la première lettre du genre et les deux premières lettres de l'espèce pour former 3 lettres :  
● Exemple : *E. coli*, *E co* et *H. influenzae*, Hin.
- 2) Le type de souche suit l'abréviation du nom de genre et de l'espèce, cad E COK ou E COB. Dans le cas où le système de restriction-modification est codé par un élément extrachromosomique, son symbole suit celui de l'hôte : E CORI ou E COP<sub>1</sub>. (où R désigne plasmide, P<sub>1</sub> : prophage).
- 3) Dans le cas particulier où une souche possède plusieurs systèmes de restriction-modification, ils sont identifiés par des chiffres romains : Hind I, Hind II, Hind III.

Les enzymes de restriction-modification sont classées en 3 types sur les bases de leur structure des exigences de leur activité catalytique et de leur mode d'action.

Les propriétés des 3 types d'enzymes sont résumées sur le tableau I suivant :

Tableau n° I - Caractéristiques des enzymes de restriction-modification

	Type I	Type II	Type III
Protéine(s)	Complexe multifonctionnel	endonucléase et méthylase séparées	complexe multifonctionnel
Exigences pour la restriction	SAM, ATP, Mg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	ATP, Mg <sup>++</sup> (SAM)
Séquences d'ADN reconnues (exemples)	SB : T-G-A-N <sub>8</sub> -T-G-C-T SK : A-A-C-N <sub>6</sub> -G-T-G-C	Symétrie par rapport à un axe	SP <sub>1</sub> : A-G-A-C-C sl5 : C-A-G-C-A-G
Sites de coupures sur l'ADN	Probablement au hasard, à moins de 1.000 paires de base du site de spécificité	généralement sur le site de spécificité	24 à 27 paires de bases à partir du côté 3' du site de spécificité



SB ; SK : sites de spécificité pour endonucléases d' *E. coli* B et K

SP<sub>1</sub> ; et sl5 : sites de spécificité pour les endonucléases du prophage P<sub>1</sub> et du plasmide P<sub>15</sub>.

Les enzymes de type I, telles que celles d'*E. coli* K et B, et les enzymes de type III, telles que celles codées par le prophage P<sub>1</sub> ou le plasmide P<sub>15</sub> sont des protéines multifonctionnelles capables de couper et de méthyliser un ADN non modifié. Elles sont composées soit de 3 sous unités différentes (type I) soit de 2 sous unités (type III) et exigent toutes les deux de l'ATP et du SAM pour leurs activités endonucléolitiques. Cependant le SAM est nécessaire pour les enzymes de type I, alors qu'il stimule seulement la réaction des types III.

Les enzymes type II codées par exemple par le plasmide RI, sont complètement différentes. Elles ont une structure protéique simple (ECORI est composée de 2 sous unités identiques) et exigent seulement du Mg<sup>++</sup> pour leur activité.

La susceptibilité d'un ADN particulier à un système de restriction-modification dépend de la présence de séquences nucléotidiques spécifiques qu'on appelle sites de spécificités. En général les séquences reconnues par les enzymes de type II sont constituées par 4 à 6 bases symétriques par rapport à un axe. Au contraire, les séquences d'ADN reconnues par les types I et III sont asymétriques. Pour le système III, les séquences sont constituées de 5 à 6 bases, alors que pour le type I les séquences sont partagées en 2 domaines constants de 3 à 4 bases séparées par un espace de 6 à 8 bases non spécifiques.



## B. Mécanisme de la réaction.

Le mécanisme moléculaire de la restriction-modification le mieux connu est celui de l'enzyme de type I d'*E. Coli* K (ECOK). Les séquences nucléotidiques spécifiques (sites SK) qui sont un substrat pour l'endonucléase de restriction ECOK peuvent se présenter sous 3 degrés de méthylation différents et donc avoir des destinées différentes

- 1) Les 2 chaînes de l'ADN sont méthylées sélectivement sur les bases concernées.
- 2) Une seule chaîne est méthylée donnant un ADN hétéroduplex.
- 3) Il n'y a pas de méthylation.

Seul dans ce dernier cas l'endonucléase ECOK pourra agir. Par conséquent c'est l'interaction entre l'enzyme et les sites SK qui déterminent l'activité. En d'autres termes, les sites SK se comportent comme un effecteur allostérique. Les 3 différentes réactions catalysées par ECOK (méthylation, clivage endonucléotique, hydrolyse d'ATP associé avec la restriction) ont été étudiées en détail. Le mécanisme de la réaction d'ECOK est mentionné sur la figure 1.

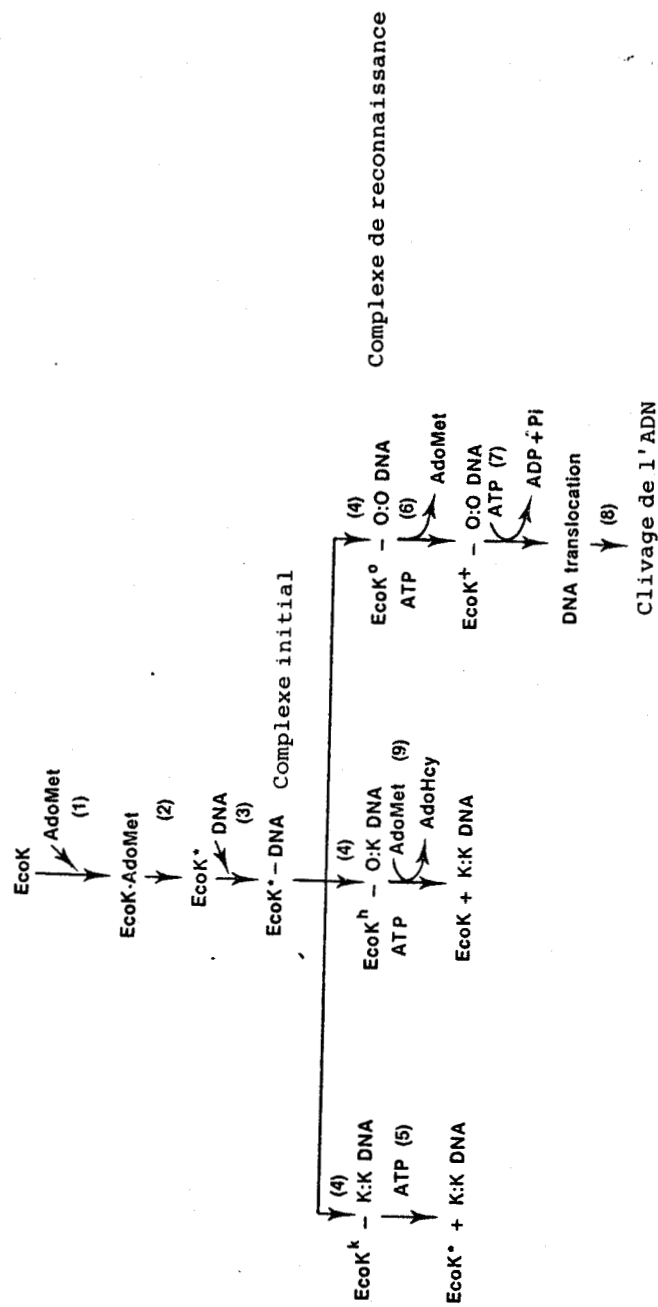


FIGURE 1. Schéma des mécanismes de la réaction, de l'enzyme multifonctionnel EcoK.  
Ici LE SAM est noté Adomet.

a) Liaison du SAM :

Le SAM se lie à ECOK par au moins 3 liaisons non covalentes. [ 63 ] Elle agit comme un effecteur allostérique dans les deux réactions de restriction et de modification, mais l'enzyme n'est pas transférée sur l'ADN dans le cas de l'activité de modification. La mutation d'une des sous unités de l'enzyme de modification résulte en une perte de la liaison avec SAM. Puisque c'est la première étape pour les 2 réactions, les 2 activités sont donc bloquées.

b) Activation de l'enzyme :

Le complexe ECOK - SAM subit alors une faible transition sous une forme activée, ECOK\*. Il s'agit d'une réaction chimique de premier ordre, ECOK\* ayant une durée de demi vie de 57 secondes. L'activation de l'enzyme est nécessaire aussi bien pour la restriction que pour la modification. Elle constitue un facteur limitant pour l'activité globale [ 63 ].

c) Formation du complexe initial :

Le complexe ECOK\* activé réagit en premier lieu avec n'importe quel ADN même en absence de sites SK pour former le complexe initial. Ceci a été vérifié par la stabilité d'ECOK\* avec l'ADN portant une mutation sur les sites SK, et plus directement par l'observation de la liaison d'ECOK\* sur des fragments d'ADN qui ont perdu les sites SK. Dans un tel complexe initial, les molécules enzymatiques sont situées au hasard sur l'ADN. Cependant ce complexe est instable et peut directement être dissocié par exposition à l'héparine ou à des polyanions [ 63 ].

d) Formation des complexes de reconnaissance :

Sur l'ADN, ECOK\* se lie spécifiquement aux sites SK sans souci de leur état de méthylation. Ces complexes de reconnaissance peuvent être isolés par filtration sur gel et observés au microscope électronique.

C'est probablement cette interaction spécifique entre l'enzyme et la séquence SK qui va déterminer si ECOK\* subira une transition pour une activité de restriction ou de modification.

e) Evolution des complexes de reconnaissance

Si les sites SK sont modifiés, donc déjà méthylés, l'enzyme activée ECOK<sup>k</sup> est libérée et l'ADN n'est pas clivé. L'ATP agirait ici comme un effecteur allostérique et n'est pas hydrolysé.

Dans le cas d'un ADN hétéroduplex modifié sur une seule chaîne, l'ATP agit de nouveau comme un effecteur allostérique et stimule le taux de transfert des groupes méthyl par ECOK<sup>h</sup> sur les adénines non méthylées des sites SK. Quand la méthylation est terminée, l'enzyme est libérée de l'ADN maintenant complètement modifié sur les 2 chaînes de la restriction.

Lorsque l'ADN n'est pas modifié, l'enzyme activée ECOK<sup>o</sup> va avoir une activité endonucléasique. Ici encore l'ATP agit d'abord en tant qu'effecteur allostérique et induit un changement de conformation d'ECOK<sup>o</sup>. La nouvelle forme enzymatique ECOK<sup>\*</sup> est capable de se lier à l'ADN et d'utiliser l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour cliver l'ADN. Cette réaction est couplée avec une translation d'ECOK<sup>\*</sup> sur l'ADN jusqu'à ce qu'elle vienne au contact des régions de clivage.

les endonucléases de type II sont plus spécifiques, c'est-à-dire que la cible de l'endonucléase et de la méthylase se trouve sur la même séquence.

ROBERTS et COLL (50) ont déterminé la séquence des bases du site de clivage pour une enzyme de restriction de type II isolé d'*H. influenzae*

↓

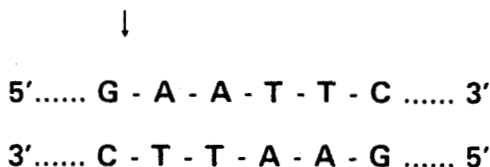
5'..... G - T - Py - Pu - A - C ..... 3'

3'..... C - A - Pu - Py - T - G ..... 5'

↑

La caractéristique de la séquence est la symétrie observée lorsqu'on lit à partir des extrémités 5', la séquence de bases est identique. Le clivage se fait sur les 2 brins de l'ADN en des points équivalents.

En fait les séquences nucléotidiques d'autres endonucléases de type II sont communes et possèdent le même type de symétrie. Ainsi l'endonucléase RI de *E. coli* codée par le plasmide RTF.



La coupure par des endonucléases de type II forme des ''bouts collants'' (cohésives ends). Les extrémités monocaténaïres des fragments de l'ADN ont des séquences de bases complémentaires et pourront se réassocier sous certaines conditions. Ils peuvent être liés par la DNA ligase.

Pour les enzymes type III, 3 membres seulement sont connus, ce sont EcoP<sub>1</sub>, EcoP<sub>15</sub> et Hind III. Ces enzymes ont des propriétés intermédiaires entre celle du type I et II. Chaque enzyme est formée de 2 sous unités de poids moléculaire 106.000 et 73 à 75.000. ( 26 ).

### C. Un système particulier

Les phages T pairs, ( $T_2$ ,  $T_4$ ...) présentent un système de modification différent qui résulte d'une glycosylation de leur ADN. Ces phages sont virulents pour *E. coli* et *Shigella dysenteriae*.

Leur multiplication en une forme  $T^*$  « T étoile » incapables de s'exprimer sur la souche sauvage *E. coli*, alors que ces phages  $T^*$  sont toujours capables de se multiplier sur *S. dysenteriae*. Cette restriction tient au fait que les mutants d'*E. coli* sont altérés dans leur sythèse d'uridine disphosphoglucose (UDPG) : le DNA du phage  $T^*$  n'est donc par glycosylé et à ce titre, il est reconnu comme étranger par le système de restriction d'*E. coli* et dégradé.

Cependant *S. dysenteriae* ne restreint pas les phages  $T^*$  mais possède l'UDPG. Au cours du cycle lytique dans cette bactérie, l'ADN des  $T^*$  est glycosylé et devient semblable à celui du phage T d'origine. Il suffit par conséquent d'un passage sur *S. dysenteriae* pour que les phages  $T^*$  recouvrent la capacité de se multiplier sur *E. coli*. Les mutants  $UDPG^-$  de *S. dysenteriae* ne sont évidemment pas capables de provoquer cette reversion.

## V - ASPECTS GENETIQUES

L'endonucléase de restriction de type I de *E. coli* K est une protéine multifonctionnelle complexe possédant 3 activités. La filtration sur gel et la sédimentation dans un gradient de glycerol ont montré que cette enzyme a un poids moléculaire d'approximativement 400.000 [ 63 ]. Trois sous unités différentes avec un poids moléculaire de 135.000, 62.000 et 55.000 ont été identifiées par électrophorèse en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).

La structure de l'enzyme est compatible avec les données génétiques [ 63 ] qui stipule que l'existence d'un locus *hsd* pour la spécificité d'hôte est composée de 3 gènes : *hsdr*, responsable de la restriction, *hsdm* responsable de la modification et *hsds* indispensable pour la reconnaissance du site de spécificité.

Une mutation du gène *hsds* affecte la reconnaissance du site de spécificité d'hôte et produit un phénotype  $r^- m^-$  qui a ses deux fonctions enzymatiques bloquées. [ 63 ].

Une mutation sur le locus *hsd* empêche aussi l'expression des 2 fonctions puisqu'elle bloque effectivement la première étape de la réaction de restriction-modification [ 63 ]. Une mutation sur le gène *hsdr* affecte seulement la restriction, mais ne bloque ni la spécificité d'hôte ni la modification [ 63 ].



Récemment le locus *hsd* de *E. coli* K a été cloné sur le phage  $\lambda$ . Cette étude a montré que *hsdr* code pour un polypeptide de PM 135.000, *hsdm* pour une sous unité de PM 62.000 et *hsds* pour une sous unité de PM 55.000 [ 63 ]. Cette enzyme composée de 3 sous unités est responsable de la restriction-modification.

L'identification des produits de gènes n'a pas résolu la question de la fonction biochimique catalysée par chaque sous unité. L'une des approches est la dissociation de l'enzyme en ses diverses composantes qui sont alors analysées, seules ou en combinaison les unes avec les autres. Aucune activité n'a été détectée (63) .

Une autre expérimentation a été réalisée en purifiant les enzymes de restriction de souches portant des mutations respectivement sur des gènes *hsdr*, *hsdm*, *hsds*. L'effet de chacune des mutations est étudié en suivant l'interaction de ces enzymes avec l'ATP, SAM et DNA (63) . Plusieurs conclusions ont été tirées de ces expériences. D'une mutation de la sous unité *hsdm* résulte une perte de la liaison avec SAM et donc empêche la restriction et la modification (c'est l'une des classes de mutants  $r^- m^-$ ).

Par contre, une mutation sur *hsds* permet une liaison normale de l'enzyme avec SAM, mais son activation est bloquée et la reconnaissance de sites spécifiques sur l'ADN n'est pas réalisée (c'est une autre classe de mutant  $r^- m^-$ ). Une mutation de la sous unité *hsdr* conduit à une méthylation et une reconnaissance normale, mais l'enzyme n'est pas capable de cliver l'ADN. (ce sont les mutants  $r^- m^+$ ). Ces résultats sont en accord avec l'analyse génétique et soutiennent le mécanisme de réaction décrit plus haut. Les études génétiques menées sur les systèmes de type II, s'accordent pour dire que 2 cistrons codent pour l'endonucléase et la méthylase. Ils sont en particulier portés par les facteurs de transfert de la résistance aux antibiotiques (plasmides RI et RII) chez *E. coli*.

Pour la méthylase comme pour l'endonucléase, le protomère est constitué d'une seule chaîne peptidique donnant d'une part l'activité, d'autre part la spécificité.

Mais récemment l'endonucléase de restriction type II Pae R<sub>7</sub> a été isolée de *Pseudomonas aeruginosa* contenant un plasmide de résistance pMG<sub>7</sub> (42 Kb). Cette activité n'a pas pu être isolée d'une souche isogénique qui ne contient pas ce plasmide. L'endonucléase Pae R<sub>7</sub> exige du Mg<sup>++</sup> pour son activité, mais pas d'ATP ni de SAM ( 25, 28<sub>bis</sub> , 31 ).

Le plasmide codant pour cette activité de restriction-modification a été hybridé avec le plasmide pBR 322 et cloné puis propagé chez *E. coli*. Un clone hébergeant le système RM complet a été obtenu. Le clonage du plasmide hybride partiellement digéré par la nucléase BAL31 a produit un clone  $r^+ m^-$ , dont les extraits cellulaires possèdent une activité endonucléasique mais pas d'activité de méthylase. L'obtention d'un clone  $r^+ m^-$  est surprenante, car cette mutation est théoriquement létale puisque l'enzyme de restriction et l'ADN bactérien non modifié coexisteraient. De plus, dans ce cas il a été montré que l'ADN chromosomique isolé de ce clone est effectivement sensible *in vitro* à Pae R<sub>7</sub>. Toutefois les bactéries vivantes sont incapable de restreindre un ADN phagique étranger.

Trois explications possibles ont été données à ce phénomène :

- soit que l'enzyme de restriction est séparée physiquement de l'ADN cellulaire.

- Soit que le gène qui code pour l'enzyme de restriction a été muté et code pour une protéine non fonctionnelle sous ces conditions physiologiques.

- Soit que la présence de l'endonucléase de restriction toute seule n'est pas suffisante pour une activité *in vivo*.

Quoiqu'il en soit, la présence d'un 3<sup>e</sup> facteur pour l'expression du gène de restriction, impliquerait que le système R-M type II est beaucoup plus complexe que prévu. [ 56 ]

Les études génétiques du type III, sont très succinctes dans ce groupe. On sait que ECOP<sub>1</sub> codé par le prophage P<sub>1</sub> et ECOP<sub>15</sub> codée par le plasmide P<sub>15</sub>B ont une certaine parenté génétique mise en évidence par voie immunologique (IDA et coll 1983).

En 1967, ESKRIDGE et coll [ 22 ] montrent que des coliphages tempérés comme  $\lambda$  sont soumis à une restriction-modification *in vivo*, alors que d'autres phages virulents T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> sont indifférents bien que possédant les sites de reconnaissances pour les enzymes de restriction de l'hôte. De plus les endonucléases d'*Hemophilus influenzae* (Hind II) et d'*E. coli* (ECOB) hydrolysent l'ADN de T<sub>7</sub> *in vitro*, mais aucune activité de restriction n'est observée *in vivo* (Smith et Wilcox 1970) [ 52 ]. Ces 2 phages se protègent de la restriction par un ou deux mécanismes codés par le même gène O<sub>3</sub>. Une mutation sur ce gène rend les phages T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> sensibles aux enzymes de restriction d'*E. coli* Bet K (STUDIER 1975 ; STUDIER et MOVVA 1976). KRUGER et coll en 1977 nomment la fonction qui protège les types sauvages "ouver come classical restriction" (OCR). La fonction du gène OCR des phages T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> s'exerce surtout contre les endonucléases de type I mais également contre EcoP<sub>1</sub> (type III).

Le produit du gène O<sub>3</sub> est la première protéine phagique synthétisée dans une cellule infectée. ( 28 , 4 , 51 ).

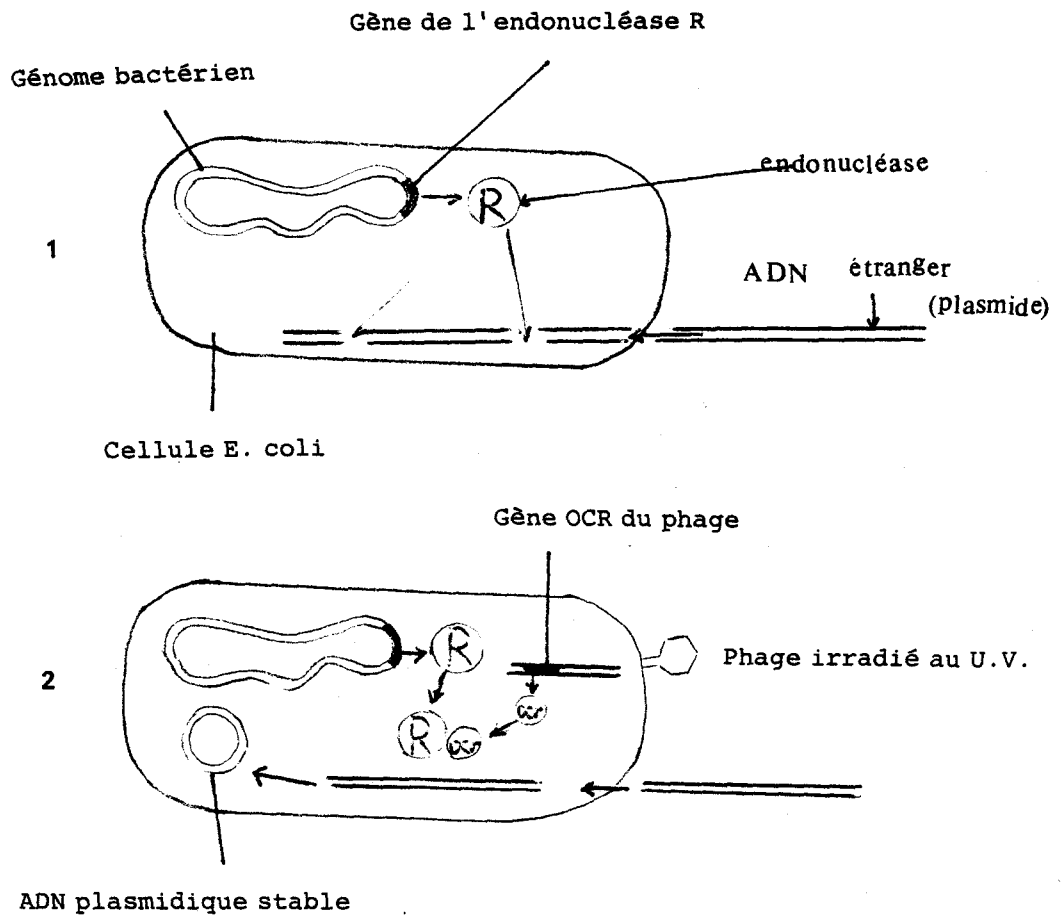


Schéma de la protection de l'ADN plasmidique contre les endonucléases de restriction cellulaire.

1 . Destruction de l'ADN plasmidique introduit dans une cellule réceptrice normale.

2 . Inactivation de l'endonuclease de restriction par la protéine **OCR+** du phage T3 ou T7 et survie de l'ADN plasmidique introduit.

D'après D.H. KRUGER, et coll 1981



L'effet qui en résulte est une protection active des sites de reconnaissance sur l'ADN phagique. Une telle action peut toutefois avoir lieu sur n'importe quel DNA étranger introduit dans la cellule, puisqu'il a été montré que T<sub>7</sub>, irradié au U.V. perd sa virulence mais reste capable d'exprimer la fonction OCR, vis-à-vis d'un ADN étranger que l'on tente d'introduire dans la bactérie, voir fig. 2 [ 37 ]. [ 34, 35, 36, 38, 44 ]

Le gène 0,3 code également pour une enzyme : la SAM ase ou Sadénosine méthionine hydrolase qui élimine donc l'une des exigences des endonucléases de restriction de type II empêchant ainsi leur action. Cette fonction ne se retrouve pas chez le phage T<sub>7</sub>, mais elle existe chez T<sub>3</sub>, ainsi que le coliphage S<sub>6</sub>, le phage IV de *Serratia* et le phage 11 de *Klebsiella* [ 38 ].

# **MATERIEL ET METHODES**

## I - SOUCHES BACTERIENNES

Nous avons utilisé des souches de *R. Meliloti* toutes capables de noduler la luzerne (*Medicago Sativa*) et cinq souches d'*E. coli* : les origines et caractères phenotypiques de ces souches sont présentées dans le tableau I.

Les inoculums des précultures sont conservées à -20° C dans du milieu RC glucosé à 1% et glycerolé à 20%.



## II - BACTERIOPHAGES :

Ils appartiennent à la collection du laboratoire et sont conservés à + 4° C en tampon R. La notion des phages portant la modification de telle souche bactérienne est effectuée selon ARBER et LINN (4)

Ex :  $\emptyset_4$  modifié par  $M_{11}S$  ;  $\emptyset_4 \cdot M_{11}S$

bactériophages et souches hôtes
bactériophages virulents :  $\emptyset_4 \cdot M_{11}S$ ; $\emptyset_6 \cdot M_{11}S$ ; $\emptyset_{20} \cdot M_{11}S$  isolés du sol par M. WERQUIN (59) .
bactériophage tempéré :  $\emptyset_{11} \cdot M_{22}S$ , obtenu au laboratoire par irradiation au U.V. de la souche $M_{11}S$

Nous avons utilisé d'autres phages tempérés de la collection du laboratoire, mais seul le phage  $M_{11}$  a rendu lysogène les souches de *R. meliloti*  $M_{19}S$  et 444.

## III - MILIEUX DE CULTURES et SOLUTIONS

a) Tampon R - Milieu synthétique de croissance

Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	0,5
Eau bidistillée .....	qsp 1 l

pH 7,2 à 7,5

Pour le milieu gélosé, on ajoute 15 g/l d'agar difco. Stérilisation 20 min à 120° C.

Tableau I : Souches utilisées

Souches	origine	isolement	phénotype
<i>E. coli</i> J53 R P <sub>4</sub>	D <sup>r</sup> M. VAN MONTAGU Gent (Belgique)		Met <sup>+</sup> Pro <sup>-</sup> (Tra <sup>+</sup> ) Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; TC <sup>r</sup> .
C600	D <sup>r</sup> J. Collins ; Gesellschaft für Biotechnologische Forschung MbH Braunschweig Stöckheim		Δ Trp leu- rk- mk- Rec A, Rif
W3350			Sauvage
S659			RP <sub>4</sub> (TC::Tn7) (Km::Mu) (::Tn <sub>5</sub> ) Thi- Thr- leu- RecA- Ap <sup>r</sup> T <sup>C</sup> Km <sup>r</sup> Tra <sup>+</sup> F' Sup E Ø80 <sup>r</sup>
Q358			rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup>
444	G. Truchet (Marseille)	Non connu	Sauvage
M5N1	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Médicago sativa Lille	Sauvage
M3S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille	Sauvage
M5S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille	Sauvage
M9S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille	Sauvage
M11S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille 1972	Sauvage
M12S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille	Sauvage
M13S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille	Sauvage
M14S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille	Sauvage
M19S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille	Sauvage
M28S	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	Medicago sativa Lille	Sauvage
L530	U.S.T.L. Laboratoire de microbiologie	non connu	Sauvage
M5 N1 m3			Ilv-Try-Arg-St <sup>r</sup> -rif <sup>r</sup>
Revertant M5N1 m3 I			Sauvage
Revertant M5N1 m3 II			Sauvage



AP<sup>r</sup> Km<sup>r</sup> TC<sup>r</sup> SM<sup>r</sup> Rif<sup>r</sup> : Résistances aux antibiotiques ampicilline, kanamycine, tetracycline, streptomycine, rifamycine.

Thi- Thr- Leu- Met- Pro- Lac- : exigeants en thiamine, thréonine, Leucine, méthionine, proline ; incapable de dégrader le lactose.

Tra<sup>+</sup> : plasmide conjugatif qui porte des gènes du transfert.

RecA- : mutant déficient pour la recombinaison.

rK- : mutant déficient du point de vue de la restriction.

mK- : mutant déficient du point de vue de la modification.

Δ : mutant provoqué par une délétion partielle ou totale d'un gène ou d'un opéron.

SuIII : mutant qui supprime la mutation non-sens (ambre).

Le tampon R est utilisé pour les dilutions. Il peut également servir de milieu synthétique de croissance lorsqu'il est additionné de biotine à 0,01 µg/ml et de thiamine à 0,5 µg/ml et d'une source de carbone : glucose (Rglc HB<sub>1</sub>) ou fructose (Rfru HB<sub>1</sub>) à raison de 10 g/l.

*b) Milieu riche (RC)*

Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub> .....	1
Extrait de levure	
(Bacto Yeast Extract Difco) .....	1 g
Eau bidistillée .....	qsp 1l

pH 7,2 à 7,5

Stérilisation 120° C 20 min

La source de carbone (glucose est additionnée à la concentration finale de 1% sous forme d'une solution stérile (105° C, 30 min) .

Ce milieu est éventuellement gélosé (RCG) à l'aide de 15 g/l de Bacto Agar (difco) . Il est utilisé pour le dénombrement des bactéries et des bactériophages .

c) Milieu riche (TY)

Tryptone .....	5 g
Extrait de levure (difco) .....	3 g
CaCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O .....	1,3 g
Eau bidistillée .....	qsp 1 l

pH 7,2 à 7,5

Stérilisation 120° 20 min

Il est utilisé pour la préculture des souches de *rhizobium* en vue de la réalisation de croisement sur milieu TY gélosé (12g/l de Bacto Agar difco)



d) Milieu de Luria

Nacl .....	5 g
Tryptone .....	10 g
Extrait de levure .....	5 g
Eau bidistillée .....	qsp 1 l

pH 7,3 à 7,4

Stérilisation 120° 20 min

Pour le milieu gélosé : Bacto Agar (Difco) 15 g. La source de carbone est le glucose à 10 g/l en concentration finale. Il est utilisé pour la préculture des souches d'*E. coli*.

Nous employons le milieu de Luria gélosé à 7g/l et additionné de biotine(2µg/ml) et de Mg SO<sub>4</sub> (10 mM) pour détecter la lyse d'*E. coli* par le phage λ.

e) Gélose pour bactériophage

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O .....	0,45 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 H <sub>2</sub> O .....	0,06 g
KNO <sub>3</sub> .....	0,06 g
Fecl <sub>3</sub> .....	1 ml d'une solution à 1%
Calcl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O .....	0,10 g
Mannitol .....	10 g
Agar (Difco) .....	7,5 g
Eau bidistillée .....	1 l

Stérilisation s'effectue à 105° pendant 30 min

## f) Tampon pour bactériophages

La composition de cette solution a été mise au point par

MANNASSE [ 43. bis ]

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , .....	1,42 g
$\text{Na H}_2\text{PO}_4$ , .....	1,2 g
$\text{Mg SO}_4$ .....	1,47 g
Eau distillée .....	qsp      1 l

Le pH ajusté à 7

## g) Antibiotiques

Certains antibiotiques utilisés sont additionnés dans les milieux à partir des solutions mères suivantes :

Km 30 mg/ml ; Tc 1 mg/ml ; Sm : 40 mg/ml ;

Ap 5 mg/ml ; Rif 1 mg/ml d'eau distillée, celles-ci sont conservées à +4° C.

La stérilisation de ces solutions d'antibiotiques s'effectuent par filtration sur une unité de filtration stérile ''SARTORIUS'' de porosité 0,22  $\mu\text{m}$ . Dans le cas du trimetoprim qui est insoluble dans l'eau, nous l'ajoutons directement au milieu à concentration finale de 1 mg/ml et l'ensemble est stérilisé à 105° C durant 30 min.

#### IV - Titrage des suspensions de phages

Chaque phage est produit par une souche sensible de *R. meliloti*.

Nous avons utilisé la technique classique dite de double couche. A 0,1 ml d'une suspension phagique est ajouté 0,3 ml d'une culture en phase exponentielle de *R. meliloti* sensible. Après 20 min de contact, on ajoute au mélange 3 ml de gélose molle bactériophage maintenue à 45° C. Le tout est coulé à la surface de boîtes de petri contenant du RCG fructosé et vitaminé.

Après 18 h d'incubation à 25° C, la gélose molle dans laquelle se sont multipliés les phages, est placée dans un pot à centrifugation, additionnée de 2,5 ml de RC et de quelques gouttes de chloroforme, homogénéisé et laissée pendant 20 min à la température ambiante. Après centrifugation à 10.000 tours minute durant 10 minutes, le surnageant contenant les phages est définitivement débarrassé des derniers débris bactériens par filtration sur membrane Millipore de porosité 0,22  $\mu$ .

Le dénombrement des phages contenus dans les suspensions réalisées selon la technique précédente constitue le dosage du stock. Des dilutions appropriées de la suspension phagique sont ajoutées à des cultures de la bactérie sensible. Une partie aliquote de chacun des mélanges est coulée sur un milieu gélosé permettant la croissance bactérienne et la multiplication des phages qui se manifestent par l'apparition de plages de lyse dans le tapis bactérien. Ces phages sont comptés et les résultats sont exprimés en nombre de phages par ml de la suspension originelle.

## V - Calcul du Coefficient d'Efficacité d'Étalement (e.o.p.)

Le coefficient d'efficacité d'étalement d'un phage (efficiency of plating) est donné par le rapport entre le nombre des phages dénombré sur la souche testée et le nombre de phages obtenus sur la souche indicatrice. Par exemple :

Le phage 4 a pour hôte habituel *R. meliloti* M<sub>1</sub>S. Il est toujours reproduit sur cette souche. S'il est énuméré sur M<sub>1</sub>S, on obtient un titre de  $3 \cdot 10^{10}$  phage par ml (eop = 1).

Si maintenant, on infecte une autre souche M5N<sub>1</sub> de *R. meliloti* avec le phage 4, on obtient seulement  $9 \cdot 10^6$  phage par ml.

Le coefficient d'efficacité d'étalement du  $\phi_4$  sur cette deuxième souche sera égale au rapport  $\frac{9 \cdot 10^6}{3 \cdot 10^{10}} = 3 \cdot 10^{-4}$

Donc plus l'e.o.p. est faible plus la restriction est élevée et inversement.

## VI - Adsorption des phages sur les bactéries

La souche est précultivée dans le milieu TY, fructuosé pendant une nuit. Après centrifugation, le culot est repris dans le même volume de RC fructosé additionné de Ca, Mg et péptones ( $4 \cdot 10^{-4}M$ ,  $5 \cdot 10^{-4}M$ , 2,5 ml/100 en concentration finale).



Les phages et les bactéries sont mélangées avec un coefficient de multiplicité de 0,1. Un prélèvement de 0,1 ml est effectué après 30 min puis placé dans une solution contenant 9,5 ml de RC et 0,4 ml de chloroforme maintenue à +4° C pour arrêter l'adsorption. Après centrifugation, les phages libres non adsorbés restent dans le surnageant et sont dénombrés sur la souche indicatrice. Le témoin est cultivé dans les mêmes conditions et subit le même traitement.

En effet, il est admis que l'orsqu'un phage se fixe irréversiblement sur la paroi bactérienne, l'infection s'effectue : le matériel nucléaire phagique est injecté dans le cytoplasme bactérien et s'exprime ou non selon sa destinée.

Le calcul du pourcentage de phages adsorbés permet d'éliminer toutes causes d'erreurs d'interprétations dans le devenir de cet ADN, et qui seraient dues à la non adsorption du phage.

Nous utiliserons donc la relation :

$$\% \text{ phages adsorbés} = \frac{P - P_0}{P} \times 100$$

P : nombre de phages/ml mis en présence des bactéries.

P<sub>0</sub> : nombre de phages libres/ml au temps t.

## VII - Croisements bactériens sur filtre

### a) Application à la transposition

La transposition consiste en l'introduction dans le génome d'une bactérie d'éléments extrachromosomiques. L'intégration de ces transposons dans le chromosome provoque des mutations. Nous avons effectué des transpositions entre des souches d'*E. coli* et de *R. meliloti*.

*E. coli* S659 est cultivée sous agitation à 30° C dans le milieu de Luria glucosé.

*R. meliloti* est cultivée dans les mêmes conditions mais dans le milieu TY fructosé. Les durées d'incubation sont celles nécessaires à l'obtention d'une culture enfin de croissance exponentielle mesurée par spectrophotométrie à 600 nm ( $D_{600} = 1$ ).

On effectue les mélanges suivants :

1 ml de milieu Luria	}	Témoin <i>Rhizobium</i>
1 ml de culture de <i>Rhizobium</i>		

1 ml de milieu TY	}	Témoin d' <i>E. coli</i>
1 ml de culture d' <i>E. coli</i>		

1 ml de culture de <i>Rhizobium</i>	}	Croisement
1 ml de culture d' <i>E. coli</i>		

Les mélanges sont filtrés sur membrane (SARTORIUS Ø35 mm, porosité 0,45 µ) stérile déposée sur un appareil de filtration SARTORIUS. Le filtre portant les bactéries est déposé stérilement sur milieu TY gélosé coulé en boîte de Pétri. Après incubation à 30° C pendant 18 h, la membrane est reprise, placée dans un tube à centrifugation contenant 5 ml de milieu R dans lesquels les bactéries sont remises en suspension par agitation forte. Le culot de centrifugation est lavé deux fois puis remis en suspension dans 3 ml de tampon R est dilué au 1/1.000 ou au 1/10.000. 0,1 ml de chacune des dilutions sont étalés sur les milieux nutritifs de sélection contenant les antibiotiques, auxquels la souche transposée doit devenir résistante. Les clones apparaissent après quatre jours d'incubation à 30°. Les témoins sont traités de façon identique.

b) application à la transmission du plasmide RP<sub>4</sub>

Nous avons effectué des croisements entre les souches d'*E. coli* et *R. mélioti* pour transférer le plasmide RP<sub>4</sub> d'une donnatrice à une réceptrice. Rappelons que le plasmide RP<sub>4</sub> provenant de *Pseudomonas aeruginosa* code pour les résistances à la tétracycline, ampicilline et Kanamycine. La technique de croisement est la même que celle de la transposition.

## VIII - Mutagénèse chimique

### ● N - méthyl - N' - Nitro - N - Nitrosoguanidine (NTG)

On utilise la NTG à la concentration de 740 µg/ml dans le tampon tris maleïque :

Acide maleïque M .....	5 ml
Tris (hydroxyméthyl - aminométhane) .....	9 ml
Eau bidistillée .....	qsp 100 ml

L'agent mutagène est dissous dans le tampon par agitation 2 H à 37° C. Le culot de centrifugation de la culture bactérienne est lavé et remis en suspension dans 10 ml de tampon tris - maleïque auxquels on ajoute le même volume de solution de NTG.

On laisse agir l'agent mutagène 30 mn à 30° C en agitation, puis on centrifuge, on lave et on reprend les cellules dans du tampon R.

Pour déterminer le taux de survivants, on fait avant et après action de la NTG, 2 types de dénombrements.

- 1) Bâtéries viables sur milieu TY gélosé
- 2) Mutants auxotrophes se développant sur milieu TY mais ne cultivant pas sur milieu minimum R glC HB.

● Ethyl méthyl sulfonate (E.M.S)

La méthode que nous avons utilisé dérive de celle de MEADE et SINGER ( 45 bis ). *Rhizobium meliloti* est cultivé sur milieu TY jusqu'à obtention d'une DO à 60 nm de 0,9 ( $10^9$  cellules/ml). On centrifuge 10 ml de cette culture. Le culot est lavé 2 fois par du tampon Tris-Hcl M à pH 7,6 et repris finalement dans 5 ml de tampon. On ajoute 2,2 ml d'E.M.S. et on laisse agir pendant 2 h à 30° C en agitation. Ensuite les bactéries sont récupérées puis lavées par centrifugation pour éliminer toutes traces de l'agent mutagène. Les germes viables sont dénombrés comme précédemment.

● Mutagenèse successives (EMS-NTG-EMS)

Nous avons employé successivement les techniques décrites ci-dessus.

## IX - Techniques d'analyses des mutants

Les mutagénèses avaient pour premier objectif la recherche de mutants déficients sur la restriction ( $r^- m^\pm$ ). Nous avons utilisé 3 techniques de sélection.

### 1) Répliques sur velours

Il s'agit de la méthode classique de LEDERBERG ( 39 ) . L'ensemble des clones ayant subi l'action de l'agent mutagène et ayant cultivé sur milieu TY gélosé puis les mutants auxotrophes sélectionnés préalablement sur Rglc HB<sub>1</sub> sont répliqués sur milieu TY gélosé recouvert d'une double couche de 3 ml de gélose "bactériophage" contenant 0,1 ml de la suspension de phages vis-à-vis duquel on veut mettre en évidence une absence de restriction. Les colonies de bactéries non mutées sur ce caractère se développent alors que les mutants r- sont lysés.

### 2) Stries croisées

Des boîtes de Pétri, contenant du milieu TY gélosé sont mises à sécher à 30° C durant une nuit. Le lendemain, la suspension phagique est étalée à la pipette en stries parallèles et la gélose laissée au repos jusqu'à absorption complète de liquide. L'opération est répétée 3 fois pour concentrer les particules phagiques à la surface du milieu.

Chaque clone de bactéries ayant cultivé sur milieu TY gélosé après mutagénèse est partiellement prélevé à l'aide d'un cure dent stérile et on trace une strie perpendiculaire à la strie du phage avec cet inoculum. Si le clone est déficient dans son système de restriction, il y a une lyse des bactéries à l'intersection des deux stries. Les photos 1 et 2 illustrent cette technique.

### 3) Microcupules

En raison de l'originalité de cette méthode, que nous avons mise au point au cours de notre travail, nous en consacrerons un paragraphe ultérieur.

## X - Lysogénisation

A 1 ml d'une culture de *R. meliloti* en phase exponentielle de croissance, nous ajoutons 1 ml de la suspension de phage titré à  $10^9$  particules/ml. Le mélange est laissé en agitation pendant une nuit à 30° C. Des dilutions appropriées sont ensemencées sur TY gélosé de façon à obtenir des clones isolés. Ces derniers sont repiqués sur milieu TY gélosé. Après culture, les colonies sont irradiées au U.V durant 10 secondes, puis les boîtes sont recouvertes d'une couche de gélose "bactériophage" contenant la souche bactérienne indicatrice du prophage. Après incubation 16 heures à 30° C, les clones ayant libéré le prophage intégré durant la phase initiale de la manipulation sont entourées d'un halo de lyse dû à la destruction des bactéries sous-jacentes.

## XI - Mise en évidence électrophorétique des plasmides

Cette nouvelle méthode d'électrophorèse dérive de celle de R. SIMON de l'Université de BIELEFELD.

### ● Lyse des bactéries

Elle consiste en une lyse douce des bactéries sur un gel d'agarose. Les différentes souches de *R. meliloti* sont précultivées dans le milieu TY jusqu'à l'obtention de la croissance bactérienne en phase exponentielle. Le nombre de cellules utilisées est estimé par la mesure de la densité optique de la culture au spectrophotomètre. Une Do de 1 correspond environ à  $10^9$  cellules/ml.

On dépose 0,5 ml de culture à Do 0,3 dans des petits tubes coniques en plastique 'Eppendorf' de 1,5 ml de capacité et on ajoute un volume de SARKOSYL NL 97 à 0,2% dans le tampon Tris 50 mM ; Na<sub>2</sub> EDTA 20mM (TE), pH 8. On mélange en inversant le tube doucement plusieurs fois. Ensuite le tube en plastique est placé dans la glace et après quelques minutes, est centrifugé au moyen d'une centrifugeuse de paillasse Eppendorf 541, pendant 4 min. à température ambiante. Le surnageant est retiré à l'aide d'une seringue et le culot est repris dans 60 µl de tampon d'électrophorèse (Tris 89 mM, Na<sub>2</sub> EDTA 2,5 mM, B(OH) 89 mM de pH 8,3 contenant du saccharose à 25%, 1 unité/ml de RNase et 1 mg/ml de lysozyme (ce dernier est ajouté au moment de l'utilisation). Puis le culot est rapidement homogénéisé au moyen d'un vortex. 30 µl de cette suspension sont déposés dans une alvéole d'un gel vertical d'agarose à 0,8%. Attendre quelques minutes et déposer au-dessus 90 µl du tampon d'électrophorèse renfermant du saccharose à 5%, du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 1%, du bleu de bromophenol (BBP) à 0,025% et de l'agarose à 0,4%.

#### ● Conditions de migration en gel d'agarose

Nous avons employé, pour nos conditions expérimentales une concentration à 0,8% d'agarose (sigma).



L'électrophorèse verticale est effectuée sous une intensité de 20 V pendant 45 min., ensuite nous l'avons fait passer à 130 V pendant 3 heures pour faire migrer l'ADN plasmidique. La visualisation des bandes plasmidiques s'effectue en ajoutant un colorant témoin de migration : Bromure d'éthidium. Ce colorant s'intercale entre les paires de bases de l'ADN et donne une fluorescence en ultraviolet à 302 nm. Le gel est trempé dans un bain de bromure d'éthidium à la concentration approximative de 1 µg/ml et placé pendant 30 min. à l'obscurité, car il s'agit d'un produit instable à la lumière.

Les gels placés sur le transilluminateur sont photographiés au moyen d'un appareil reflexe 24 × 36 muni d'une combinaison de filtres couleur.

## **XII - Production de suspensions de phages à titre élevé**

### **● Préparation et ensemencement**

Les cultures sont effectuées, en fermenteur SETRIC type F7T (Toulouse) de 4,5 litres, à agitation magnétique. La température, le pH, le débit d'air et la vitesse d'agitation du fermenteur sont contrôlés. Les variations de pH et de l'oxygène dissous sont enregistrés.

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

Pourcentage d'oxygène  
dissous dans le milieu

Densité optique  
(600 nm)

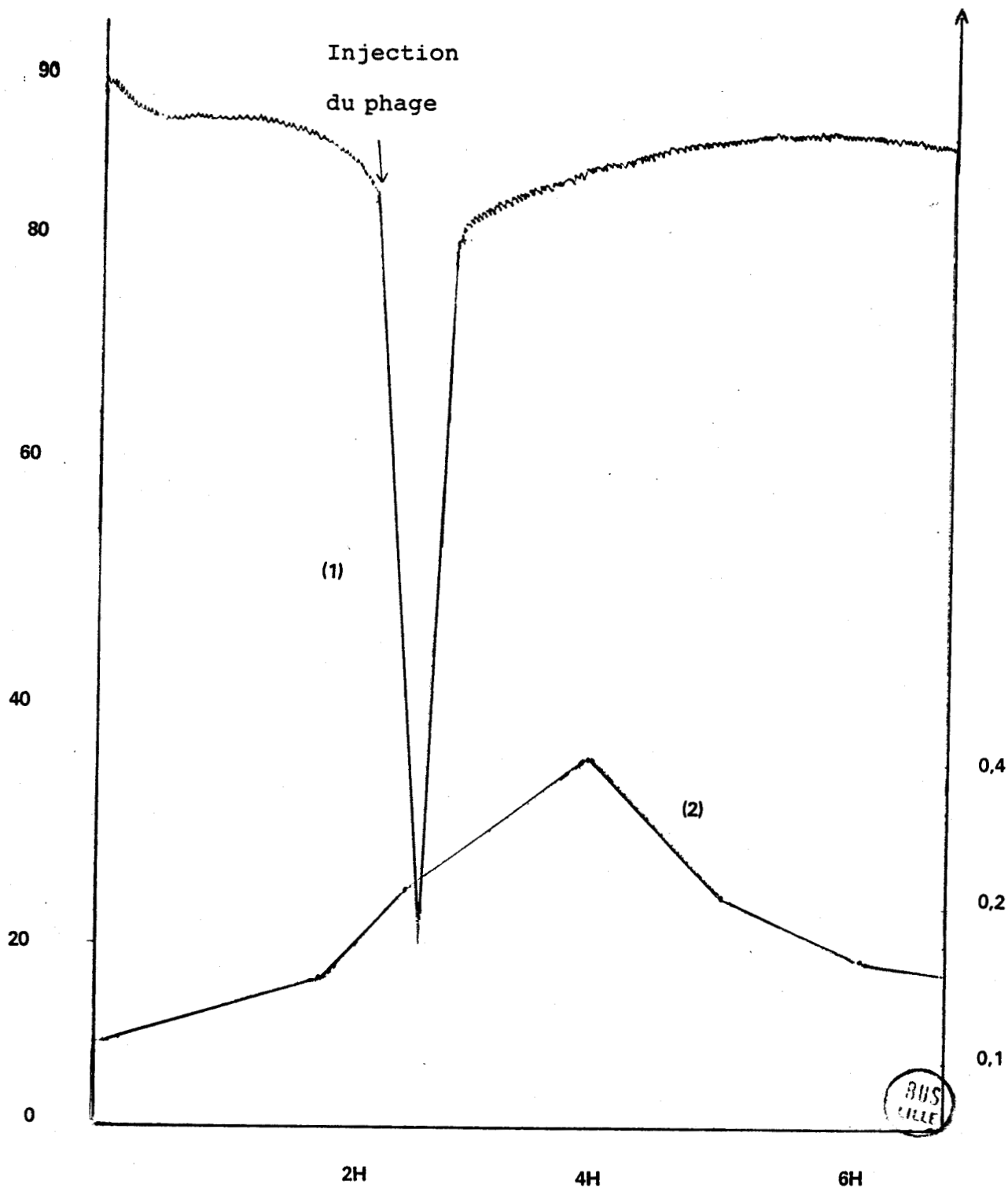


fig 2

Production en masse du Ø4 par lyse de la souche M5N1 de *R. meliloti*.

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

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

Le milieu est complété par addition de :

Fructose à concentration finale de : 1%

Péptones à concentration finale de : 0,25%

MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O à concentration finale de : 5 10<sup>-4</sup> M

CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O à concentration finale de : 5 10<sup>-4</sup> M

● Paramètres de la culture :

Les valeurs suivantes ont été adoptées dans notre manipulation

- une température de 30° C correspondant à la température optimale de croissance de *R. mélioti*
- un débit de l'air de 60 l/h
- une vitesse d'agitation de 300 t/min.
- la régulation du pH n'est pas indispensable car il varie dans la zone optimale de croissance de notre souche
- le pourcentage d'oxygène dissous est fixé à 80 ou 90%.

● Lyse des bactéries

La variation de la densité optique de la culture bactérienne, et celle du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu, permet de mettre en évidence la lyse des bactéries (fig. 2 ). Une période latence de 30 min. suit l'ensemencement du milieu.

Les bactéries s'adaptent aux nouvelles conditions de cultures, elles vont ensuite se multiplier rapidement. La DO va donc augmenter. L'oxygène sera consommé de plus en plus, ce qui se traduit par une baisse du taux d'oxygène dissous (TOD). L'arrêt de l'aération de la cuve va faire chuter brusquement le TOD. La suspension du Ø4 est injectée, 20 min. après, l'adsorption des particules phagiques ayant en lieu, l'aération est reprise, ce qui entraîne une hausse rapide du TOD. Les bactéries commencent à être lysées une heure après l'injection du Ø4. Le nombre de bactéries diminuant, la DO baisse. La consommation de l'oxygène diminue, ce qui provoque une augmentation du TOD. La lyse bactérienne a lieu pendant une période de 3 heures.

#### ● Concentration des bactériophages

La technique utilisée est due à YAMAMOTO ( 62 ). Elle est basée sur la propriété qu'ont les bactériophages de précipiter en présence de chlorure de sodium et de polyéthylène glycol 6000 (PEG) :

- Une culture de *Rhizobium méliiloti* M5N1 est lysée par le phage 4 puis laissée à + 4° C pendant une nuit.
- Centrifugation à 10.000 t/min. pendant 15 min. pour éliminer les débris bactériens.
- Digestion de l'ADN et de l'ARN bactérien libre, par addition de déoxyribonucléase (DNase) et le ribonucléase (RNase) à raison de 1 µg de chaque enzyme par ml de lysat. Ceci est réalisé à 37° C pendant une heure.

- Le surnageant est additionné de chlorure de sodium afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 M, puis laissé une nuit à + 4° C.
- Centrifugation à 10.000 t/min. pendant 25 min.
- Addition du PEG 6000 pour obtenir une concentration de 8%.  
La suspension est laissée plusieurs jours à + 4° C, temps nécessaire à la précipitation des bactériophages.
- Centrifugation à 4000 t/min. pendant 15 min. du précipitat obtenu, le surnageant est écarté.
- Le culot est dissous dans 10 ml de tampon pour bactériophages.
- Centrifugation à 10.000 t/min. pendant 15 min., le culot est écarté.
- Le surnageant est centrifugé à 78.000 g (34 000 t/min.) pendant 1 heure avec le rotor Ti.
- Le culot contenant les phages est dissous dans 2 ml de tampon pour bactériophage.
- Centrifugation à 10.000 t/min. pendant 1 min. le culot est écarté.
- Le surnageant est centrifugé à 78.000 g (34.000 t/min.) pendant 1 h avec le rotor ti)
- Le culot contenant les phages est dissous dans 2 ml de tampon bactériophage. Les phages peuvent être ultra-centrifugés dans Cs cl (9,3 g/14 ml), la bande obtenue est dialysée contre du tampon phosphate.

### XIII - Technique particulière mise au point :

#### ● Sélection de mutants par la méthode des microcupules

Ses techniques de sélection de mutants par répliques sur velours ou par stries croisées décrites précédemment sont longues et nécessitent un matériel considérable étant donné le grand nombre de clones bactériens à analyser pour tenter d'obtenir une ou plusieurs mutants, en raison des fréquences de mutation relativement faibles. Nous avons donc mis au point une technique de sélection en milieu liquide, utilisant peu de matériel et permettant d'étudier rapidement une importante quantité de clones. Nous utilisons des plaques de microtitration stériles comportant 100 vupules. Dans chacune d'elles on dépose 150  $\mu$ l de milieu TY contenant  $10^7$  phage/ml ainsi que du  $\text{CaCl}_2$  ( $9 \cdot 10^{-2}$  mM) et du rouge de phénol (0,04 g/l) comme indicateur coloré. Les cupules sontensemencées à partir des colonies de *R. meliloti* cultivant sur TY gélosé après mutation. Les plaques sont incubées à 30° C durant 16 heures. Le témoin est constitué par une série de cupulesensemencées avec la souche sauvage exerçant une restriction sur le phage. Dans ce cas, les bactéries se développent, utilisant le glucose contenu dans le TY et acidifient aussi le milieu qui vire au jaune.

Par contre s'il s'agit d'un mutant ayant perdu son pouvoir de restriction, il est lysé par le phage, ne peut donc pas se développer et le milieu reste rouge dans la cupule correspondante (photo. A-B-C-D)

# CHAPITRE I

## Mutagénèse

### I - Mise en évidence de la restriction chez *R. meliloti*

Nous avons commencé notre étude pour la recherche du phénomène de la restriction-modification qui constituerait l'aspect le plus intéressant de la relation entre *R. meliloti* et ses bactériophages.

A cet effet nous avons obtenu des stocks de phages 4, 6 et 20 multipliés sur les souches bactériennes M5N1 et M<sub>11</sub>S. Chacune de ses suspensions phagiques a été ensuite dénombrée. Le tableau 1 donne les coefficients d'efficacité d'étalement qui en dérivent. Les 3 phages obtenus sur la souche M<sub>11</sub>S, c'est-à-dire portant la modification correspondante, voient leur croissance restreinte par la souche M5N1 de *R. meliloti*. Les coefficients d'étalement sont faibles de l'ordre de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$ .

Par suite lorsque ces phages ont en leur ADN modifié par le ou les systèmes de la souche M5N1, seul le phage 4 est fortement restreint par la souche M<sub>11</sub>S alors que les 2 autres ne sont que peu ou pas inactivés. Les e.o.p. sont de 1 pour le phage 6 et de  $10^{-1}$  pour le phage 20. Le fait que le phage 6 ne soit pas restreint par la souche M<sub>11</sub>S peut résulter de ces causes :



			SOUCHES      TESTEES	
			M <sub>11</sub> S	M5N1
			Coefficients d'efficacité d'étalement	
S O U C H E S	M <sub>11</sub> S	P H A G E S	Ø <sub>4</sub>	1  3 10 <sup>-4</sup>
		Ø <sub>6</sub>	1  10 <sup>-5</sup>	
		Ø <sub>20</sub>	1  3 10 <sup>-2</sup>	
	M5N1	P H A G E S	Ø <sub>4</sub>	3 10 <sup>-4</sup>  1
		Ø <sub>6</sub>	1  1	
		Ø <sub>20</sub>	10 <sup>-1</sup>  1	

IBUS  
LILLE



Tableau 1 - Coefficients d'efficacité d'étalement des pages 4, 6 et 20 sur les souches de *R. meliloti* M<sub>11</sub>S et M5N1.

- L'ADN de ce phage ne possède pas de sites spécifiques aux endonucléases de restriction de la souche M<sub>11</sub>S.

- Les modifications sur l'ADN phagique par la souche M5N1 bloquent les sites de restriction de la souche M<sub>11</sub>S.

Dans ce cas, cela signifie que ces deux souches possèdent un système de restriction-modification de spécificité identique.

De plus, nous remarquons que pour les autres phages les modifications portées par l'une de ces bactéries n'empêchent par l'action des enzymes de restriction de l'autre. Les e.o.p. sont inférieurs à 1 c'est donc que les bactéries M<sub>11</sub>S et M5N1 possèdent aussi au moins un autre système de restriction-modification de spécificité différente.

La coexistence de plusieurs systèmes de restriction-modification au sein d'une même bactérie est tout à fait possible puisque l'on sait que le codage génétique peut être effectué non seulement par le chromosome mais aussi par un plasmide ou un prophage 26 . Or nous verrons ultérieurement que *R. meliloti* M5N1 et M<sub>11</sub>S possèdent chacune 2 plasmides et un prophage.

Le calcul des coefficients d'efficacité d'étalement de différents phages, tableau 1, nous a donc permis non seulement de mettre en évidence le phénomène de restriction-modification chez *R. meliloti* mais également de soupçonner la présence simultanée de plusieurs de ces systèmes au sein des souches M5N1 et M<sub>11</sub>S. L'extension de ces conclusions à l'ensemble des souches de notre collection n'est pas invraisemblable.

En possession de ces résultats, il nous a semblé que l'un des moyens d'étudier cette relation phage-bactérie pourrait consister en une tentative de la faire varier. Nous avons donc essayé de provoquer des mutations au niveau de la restriction, ce qui impliquerait en fait à rechercher des mutants de *R. meliloti* déficients en leur pouvoir de restriction ( $r^- m^\pm$ ).

## II - Mutagénèse par transposition

Les transposons sont des segments d'ADN discontinue structuralement et génétiquement capable de se déplacer d'une molécule d'ADN à l'autre. Le processus de transposition a pour résultat qu'un fragment d'ADN initialement présent sur une certaine molécule est transféré sur une molécule différente qui ne possède d'homologie génétique ni avec l'élément transposable ni avec l'ADN donneur. Les gènes au niveau desquels sont insérés les

PLASMIDE SUICIDE DE LA SOUCHE  
D'E.COLI S650-9

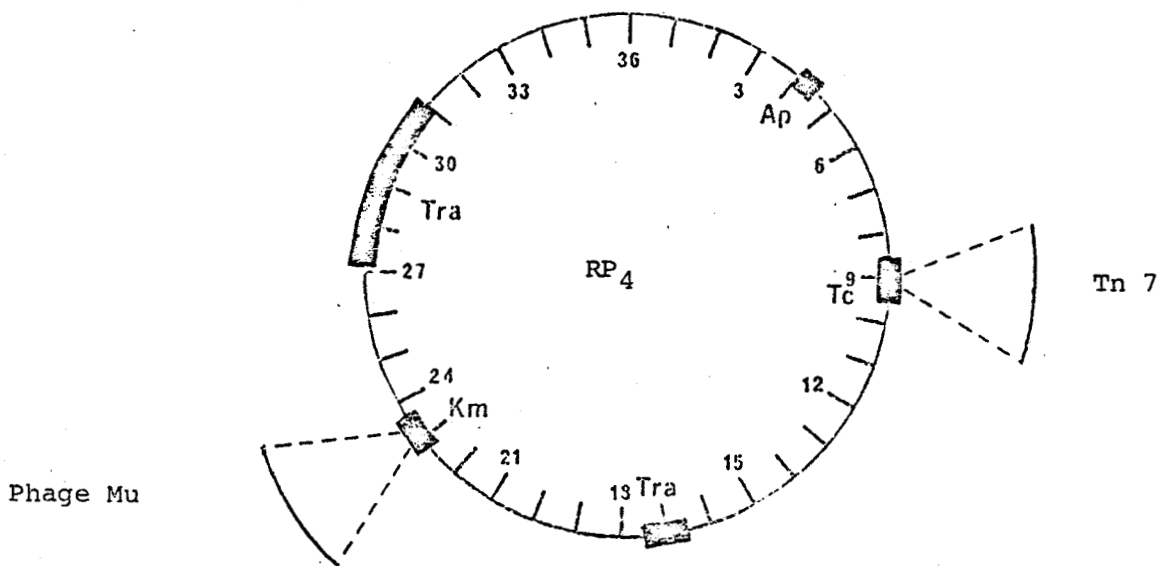


fig 3

■ Tra : gènes responsables de la transférabilité

■ Ap, Tc, Km : gènes conférant la résistance à l'ampicilline,  
la tétracycline, la kanamycine



transposons perdent ainsi complètement leur fonction. De plus ces éléments possèdent un ou plusieurs gènes conférant la résistance à certains antibiotiques.

Ainsi la technique de mutation par transposition présente le double avantage de pouvoir toucher un grand nombre de sites sur le chromosome bactérien et de ''marquer'' la bactérie en lui faisant acquérir une résistance aux antibiotiques, facilitant ainsi la sélection des mutants.

Chez *R. meliloti* le moyen efficace d'introduire des transposons consiste à transférer chez cette bactérie un plasmide hybride composé du :

- plasmide RP<sub>4</sub> qui contient déjà le transposon Tn1 codant pour la résistance à l'ampicilline.
- Le phage Mu.
- Le transposon Tn7 portant un gène de résistance à la streptomycine, à la spéctinomycine et à la triméthoprime.

fig. 3

Ce plasmide est contenu dans la souche S659 d'*E. coli*. Le transfert s'effectue par croisement avec *R. meliloti*.

● Croisement *E. coli* S659 × *R. meliloti* M<sub>11</sub>S

Nous avons réalisé un premier croisement *E. coli* S<sub>659</sub> × *R. meliloti* M<sub>11</sub>S. Cette dernière souche a été choisie puisqu'elle possède des systèmes R.M mis en évidence au paragraphe précédent. Les mutants sont sélectionnés sur milieu minimum Rglc Hb<sub>1</sub> additionné d'ampicilline ou de Kanamycine ou encore de triméthoprime. Les fréquences de transposition sont mentionnées sur le tableau 2.

Souches réceptrices	fréquence de transposition	pourcentage de mutants spontanés
M <sub>11</sub> S	4 10 <sup>-7</sup>	0,84
M <sub>28</sub> S	1 10 <sup>-6</sup>	0,20
M <sub>19</sub> S	2 10 <sup>-6</sup>	<0,2
444	6 10 <sup>-6</sup>	0,03
M5N1	5 10 <sup>-7</sup>	80

**Tableau 2** - Fréquences de transposition entre la souche d'*E. coli* et les couches sélectionnées.

Les colonies sont répliquées sur milieu TY contenant le Ø4.M5N1 pour rechercher les bactéries éventuellement touchées dans leur pouvoir de restriction. Toutefois nous n'avons détecté aucun mutant r- m±.

● Croisement *E. coli* S 659 × *R. meliloti* M5N1

Nous avons essayé cette fois d'introduire des variations dans le patrimoine génétique de la souche M5N1 de *R. meliloti*. Il a été montré antérieurement que cette souche possède un système de R.M mise en évidence. Les sélections ont été effectuées comme précédemment, mais n'ont pas permis de repérer de mutant r- m±.

● Croisement *E. coli* S<sub>659</sub> × *R. meliloti* M<sub>28</sub>S

Les souches M<sub>11</sub>S et M5N1 présentent l'inconvénient de transposer de manière relativement faible comme le montre les fréquences de transposition sur le tableau 2.

Nous avons donc pensé à utiliser *R. meliloti* M<sub>28</sub>S qui réalise une transposition de l'ordre de 10<sup>-6</sup>. Cependant, si l'on obtient un plus grand nombre de clones ayant acquis les caractères de résistance aux antibiotiques, nous n'avons pas décelé de mutants ayant perdu leur pouvoir de restriction.

Le tableau 3 donne un exemple des résultats obtenus. Le phage utilisé dans ce système est le Ø13.M<sub>14</sub>S. Nous avons ici calculé le coefficient d'efficacité d'étalement du phage (e.o.p.) sur 110 clones de la souche M<sub>28</sub>S ayant acquis le transposon Tn5, aucun ne montre une augmentation de l'e.o.p., au contraire, chez 14 clones, ce coefficient diminue et pour 86 souches il n'a pas pu être chiffré car on n'observait aucune plaque de lyse. Donc dans la majorité des cas, l'efficacité du phage est abaissée de façon plus ou moins importante par rapport à la souche sauvage M<sub>28</sub>S.

+ Nombre de clones M <sub>28</sub> S::Tn5	e.o.p. du Ø13.M <sub>14</sub>
86	<10 <sup>-9</sup> *
2	10 <sup>-3</sup>
1	8,5 10 <sup>-4</sup>
1	7 10 <sup>-4</sup>
3	6 10 <sup>-4</sup>
5	4 10 <sup>-4</sup>
2	3,5 10 <sup>-4</sup>
1	2 10 <sup>-4</sup>
1	5 10 <sup>-5</sup>

Témoin Ø13.M<sub>14</sub>S/M<sub>28</sub>S sauvage = e.o.p. 10<sup>-3</sup>

\* 10<sup>9</sup> UFP/ml (unite plaque forming) ne donne aucune plage de lyse.

+ Les souches transposées proviennent de la collection de H. Ali (2)

Tableau 3 - Coefficient d'efficacité d'étalement du Ø13.M<sub>14</sub>S sur  
100 clones de *R. meliloti* M<sub>28</sub>S::Tn5





● Croisement *E. coli* S659 × *R. meliloti* M<sub>19</sub>S

Nous avons enfin essayé un dernier système de transposition en utilisant *R. meliloti* M<sub>19</sub>S comme souche réceptrice. Celle-ci exerce une restriction importante sur la croissance du Ø4 .M5N1 (e.o.p.) = 10<sup>-6</sup>) alors que dans les cas précédents les coefficients d'efficacité des phages sont plus élevés, ce qui indique donc une restriction plus faible. On pourrait penser que la probabilité de mettre en évidence une altération de la restriction était plus grande lorsque l'e.o.p. de phage était faible.

De plus, *R. meliloti* M<sub>19</sub>S a une bonne fréquence de transposition 2 10<sup>-6</sup>. Toutefois, parmi les colonies transposées nous n'avons pas observé de mutant r- m± mais bien souvent, comme nous l'avons décrit pour les transposées de *R. meliloti* M<sub>28</sub>S, on constate que l'e.o.p. diminue d'avantage.

La mutagénèse par transposition ne nous a donc pas permis d'isoler de mutants déficients sur la restriction, mais nous a néanmoins fourni des renseignements que nous discuterons ultérieurement.

Nous avons toutefois essayé une autre voie pour l'obtention de mutants, c'est-à-dire la mutagénèse chimique classique.

### III Mutagénèse chimique

#### A. N - méthyl - N' - nitro - N - Nitrosoguanidine (NTG)

L'effet mutagène de la NTG fut découvert en 1960 par MANDELL et GREENBERG (43) . Il est difficile de distinguer l'effet mutagène de la NTG et de ses produits de dégradation.

A un pH < 5, elle se décompose en acide nitreux et en N - méthyl - N' - nitroguanidine.

A un pH > 5,5 elle se décompose en diazométhane et en nitro urée.

Pour CERDA OLMEDO et HANAWALT ( 15 ), le diazométhane est le principal agent de la mutagénèse mais la NTG possède également une activité mutagène propre. Le mécanisme de réparation et le mécanisme normal de réplication ne semblent pas introduire de mutations. Il existerait 2 types de lésion :

- Les lésions réparables s'il existe un système de réparation chez la bactérie et sinon létales
- Les lésions mutagènes, indépendamment du système de réparation.

Le diazométhane est un agent qui peut réagir avec les acides nucléiques et leurs constituants. Son action sur le DNA s'exerce en méthylant les bases à différentes positions .

Nous avons réalisé des mutagénèses sur les souches M<sub>19</sub>S et 444 de *R. melloti*. Après action de la NTG, la culture bactérienne est diluée et étalée sur milieu TY. Les colonies sont analysées pour leur restriction par la méthode des stries croisées ou des microcupules. Le phage utilisé dans les deux cas est Ø4.M5N1. Parfois nous avons uniquement utilisé les clones auxotrophes préalablement sélectionnés. Lorsque certaines colonies semblent être partiellement lysées par le hage, elles sont cultivées sur milieu TY liquide et les coefficients d'efficacité d'étalement sont calculés. Les tableaux 4 et 5 donnent des exemples de résultats obtenus.

Nombre de clone <i>R. meliloti</i> 444 traité par la NTG	e.o.p. de Ø4.M5N1
3	1,1 . 10 <sup>-5</sup>
4	1,3 . 10 <sup>-5</sup>
5	1,4 . 10 <sup>-5</sup>
1	1,5 . 10 <sup>-5</sup>
2	1,6 . 10 <sup>-5</sup>
2	1,7 . 10 <sup>-5</sup>
4	1,8 . 10 <sup>-5</sup>
4	1,9 . 10 <sup>-5</sup>
4	2 . 10 <sup>-5</sup>
3	2,1 . 10 <sup>-5</sup>
2	2,5 . 10 <sup>-5</sup>
1	2,8 . 10 <sup>-5</sup>

Témoin Ø4.M5N1/444 sauvage : e.o.p. = 1,6.10<sup>-5</sup>

Tableau 4 - Coefficients d'efficacité du phage Ø4.M5N1 sur 35 clones de *R. meliloti* 444 traité par la N.T.G.

Nombre de clone <i>R. meliloti</i> M <sub>19</sub> S traité par la NTG	e.o.p. de Ø4.M5N1
4	10 <sup>-6</sup>
4	1,6 . 10 <sup>-6</sup>
1	2,3 . 10 <sup>-6</sup>
2	2,5 . 10 <sup>-6</sup>
2	3,5 . 10 <sup>-6</sup>
2	4 . 10 <sup>-6</sup>
5	1,2 . 10 <sup>-7</sup>
6	2,5 . 10 <sup>-7</sup>
4	3 . 10 <sup>-7</sup>
7	4,2 . 10 <sup>-7</sup>
5	5,5 . 10 <sup>-7</sup>
4	6,4 . 10 <sup>-7</sup>
3	7 . 10 <sup>-7</sup>
5	8 . 10 <sup>-7</sup>
3	7 . 10 <sup>-7</sup>
3	ID

ID = Indéterminé (pas de lyse).

Témoin Ø4.M5N1/M<sub>19</sub>S : e.o.p. = 10<sup>-6</sup>



Tableau 5 - Coefficients d'efficacité du phage Ø4.M5N1 sur 60 clones de *R. meliloti* M<sub>19</sub>S traité par la N.T.G.

Dans le cas de la souche 444, le Ø4.M5N1 donne des E.o.p un peu plus élevés que le témoin pour 13 souches sur 35, mais les écarts sont beaucoup trop faibles pour que l'on puisse dire qu'il s'agit de mutant r- m±. Pour 20 autres clones par contre on observe une légère augmentation de la restriction mais ici encore les écarts ne sont pas significatifs. Chez la souche M<sub>19</sub>S, l'augmentation de la restriction est la règle générale. On remarquera même que pour 3 clones le coefficient d'efficacité du phage est trop faible pour être déterminé, nous n'avons pas obtenu de plages de lyse dans ce cas.

#### B. Ethyl méthyl sulfonate (E.M.S.)

L'E.M.S. appartient aux groupes des agents alkylants c'est-à-dire des composés chimiques qui réagissent avec l'ADN pour y fixer des radicaux tels que des groupes méthyls ou éthyls. Il est considéré comme un agent mutagène très efficace.

*R. meliloti* M<sub>19</sub>S a été traité par l'E.M.S. et les bactéries survivantes ont été analysées comme précédemment. Les résultats sont identiques à ceux décrits plus haut(cf tableau 5).

### C. Mutations successives

Nous avons enfin essayé des mutagénèses successives : EMS - NTG - EMS sur *R. meliloti* M<sub>19</sub>S pour tenter d'augmenter les possibilités de mutation. Etudiés à l'aide des mêmes techniques qu'auparavant, aucun des clones n'a révélé une déficience de la restriction mais au contraire on constate à nouveau une diminution des coefficients d'efficacité d'étalement du phage Ø4.M5N1.

### IV - Interprétation des résultats et discussion

Les mutagénèses réalisées sur différentes souches de *R. meliloti* ne nous ont pas permis d'isoler des mutants déficients dans leur pouvoir de restriction, mais au contraire, en règle générale, lorsque cette restriction varie, après action de l'agent mutagène, c'est dans le sens d'une augmentation. Nous avons même obtenu des clones de la souche M<sub>19</sub>S sur lesquels le phage n'avait plus aucune efficacité. Il nous a semblé intéressant de les étudier plus précisément. Pour cela nous avons calculé le taux d'adsorption des phages sur les bactéries. Les résultats consignés dans le tableau 6 montre clairement qu'il n'y a plus d'adsorption du bactériophage sur les bactéries traitées par la NTG.

Les gènes bactériens ou plasmidiques codant pour la structure des récepteurs phagiques pariétaux ont donc été modifiés par suite d'une mutation. Il ne s'agit donc plus de restriction mais de résistance au phage.

Phage	Souches	Taux d'adsorption calculé 30 min. après l'infection
Ø4.M5N1	M <sub>19</sub> S sauvage	66%
	M <sub>19</sub> S traité à la NTG	0%
	N5N1	90%

Tableau 6 - Taux d'adsorption du phage Ø4.M5N1 sur *R. meliloti* M<sub>19</sub>S avant et après traitement de la bactérie par la NTG.

Cette conclusion ne semble pas s'appliquer aux bactéries dont le taux de restriction s'est élevé mais qui conservent une certaine sensibilité aux phages. Comme des plaques de lyse ont été observées, l'adsorption des phages s'est réalisée, il n'y a donc pas de résistance totale. Toutefois nous ne pouvons pas actuellement donner d'explication valable à ce phénomène.

Il ressort également de ces expériences que la réalisation d'une mutation sur la restriction chez *R. meliloti* semble très difficile.

Plusieurs hypothèses peuvent être énumérées à ce sujet. En particulier nous pensons à la possibilité de la présence chez *R. meliloti* de systèmes de réactions ''SOS'' très puissants. L'existence de cette sauvegarde de matériel génétique de la bactérie est d'ailleurs compatible avec l'écologie de *Rhizobium*, bactérie du sol soumise à de nombreuses agressions.

La recherche de l'activité de gènes comparables aux *RecA* et *LexA* d'*E. coli* pourrait être une voie intéressante. Mais *R. meliloti* a aussi l'avantage (pour la bactérie mais pas pour le généticien) de posséder un matériel génétique complexe.

Le tableau 7 donne le contenu d'ADN extrachromosomique des souches utilisées.

Souches	*Plasmides et leur poids moléculaire	Prophages
M <sub>11</sub> S	1 mégaplasme > 300 Md 1 plasmide moyen	+
M5N1	1 mégaplasme > 300 Md 1 plasmide moyen 92 Md	+
M <sub>28</sub> S	1 mégaplasme > 300 Md 1 plasmide moyen 133 Md 1 mégaplasme > 300 Md	-
M <sub>19</sub> S	1 plasmide moyen 135 Md 1 petit plasmide 4.8 Md	-
444	1 mégaplasme > 300 Md 1 plasmide moyen 82 Md	-

\*D'après X. PINET DEA U.S.T.L. Lille 1980

Ainsi chacune des souches possède un mégaplasme (supérieur à 300 Md) plus au moins un autre plasmide plus petit. De plus les souches M5N1 et M<sub>11</sub>S sont lysogènes.

L'existence de tels éléments influence vraisemblablement le comportement génétique de cette espèce. Nous avons donc étudié le rôle possible de plasmides ou de prophages sur la réaction entre *R. meliloti* et les bactériophages.



## **CHAPITRE II**



## Influence de l'ADN extrachromosomique sur la relation phage-bactérie

### I - Interaction des plasmides

Devant les difficultés rencontrées pour provoquer des mutations chez *R. meliloti* et, en ce qui nous concerne, affecter par ces moyens la relation phage-bactérie, nous avons choisi d'étudier l'hypothèse selon laquelle les éléments extrachromosomiques bactériens, pouvaient interférer dans cette relation. Nous allons étudier l'influence d'un plasmide étranger puis l'action éventuelle des plasmides indigènes.

#### A. Action du plasmide RP<sub>4</sub>

Nous avons introduit le plasmide RP<sub>4</sub> provenant de *Pseudomonas aeruginosa* et appartenant au groupe d'incompatibilité. P<sub>1</sub> chez *R. meliloti* 2011, 444 et M5N1.

Ceci a été réalisé par croisement avec *E. coli* J5-3 RP<sub>4</sub>. Les transconjugants de *R. meliloti* sont sélectionnés grâce à l'acquisition de la résistance à la tétracycline due au RP<sub>4</sub>. La photo 3 donnant l'électrophoregramme en gel d'agarose du contenu d'ADN des souches transconjuguées et des témoins montrent que les clones transconjugués possèdent effectivement le RP<sub>4</sub>.

**Plasmide géant**

**Plasmide  
moyen**

**Plasmide RP4**

**2011**

**2011 RP4**

**M5N1**

**M5N1 RP4**

**444**

**444 RP4**

**PHOTO.N°3**



Nous avons comparé les coefficients d'efficacité d'étalement du Ø4. M<sub>11</sub>S sur les souches sauvages de *R. meliloti* avec ceux des transconjugants. Le tableau 8 illustre ces résultats.

Souches Phage	2011	2011 (RP <sub>4</sub> )	444	444 (RP <sub>4</sub> )	M5N1	M5N1 (RP <sub>4</sub> )
Ø4. M <sub>11</sub> S	5 10 <sup>-6</sup>	< 10 <sup>-9</sup>	2 10 <sup>-5</sup>	< 10 <sup>-9</sup>	3 10 <sup>-4</sup>	< 10 <sup>-9</sup>

Les transconjugants ont été sélectionnés sur milieu TY + tétracycline (10µg/ml)

Tableau 8 : EOP du phage Ø4. M<sub>11</sub>S sur différentes souches de *R. meliloti* sauvages et ayant acquis le plasmide RP<sub>4</sub>.

On constate que les coefficients d'efficacité d'étalement du phage sur les bactéries porteuses du plasmide RP<sub>4</sub> sont fortement diminués. Dans certaines de nos expériences nous n'avons même pas obtenu de phages de lyse. Il peut s'agir d'une restriction supplémentaire codée par le plasmide RP<sub>4</sub> mais il peut s'agir également de résistance acquise. Pour lever cette incertitude nous avons étudié l'adsorption de ces phages sur les bactéries correspondantes et calculé les pourcentages de phages adsorbés.

Le tableau 9 montre que 30 minutes après l'infection, les phages sont adsorbés sur les souches de *R. meliloti* possédant le plasmide RP<sub>4</sub>, comme chez les témoins.

Ces résultats semblent donc en faveur de l'introduction chez *R. meliloti* d'un nouveau système codé par le plasmide RP<sub>4</sub>.

Phage	Souches <i>R. meliloti</i>	Pourcentages d'adsorption (30 min. après l'infection)
Ø4. M <sub>11</sub> S	M5N1	99
	M5N1 (RP <sub>4</sub> )	99
	444	83
	444 (RP <sub>4</sub> )	72
	2011	86
	2011 (RP <sub>4</sub> )	75

Tableau 9 - Pourcentages d'adsorption de Ø4. M<sub>11</sub>S sur *R. meliloti* avec ou sans plasmide RP<sub>4</sub>.

Ceci est en accord avec les propriétés des plasmides dont certains possèdent un système de restriction-modification [ 26 ]. Toutefois, il faut signaler que nos expériences tendant à mettre en évidence un système R-M, codé par le RP<sub>4</sub> chez *E. coli* - se sont révélés vains jusqu'à présent.

#### B. Influence des plasmides indigènes

Le laboratoire possède des clones appartenant à une même souche mais ayant des contenus plasmidiques différents.



rev  $M_5 N_1 RP_4$   
 mut.  $M_5 N_1 RP_4$   
 $M_5 N_1 RP_4$   
 rev.  $M_5 N_1 m_3 II$   
 revertant  $M_5 N_1 I$   
 mutant  $M_5 N_1 m_3$   
 $M_5 N_1$

Plasmide géant

Plasmide  
moyen

Plasmide  $RP_4$

#### PHOTO.N°4

La photo [ 4 ] montre l'électrophorogramme sur gel d'agarose de ces clones. Nous voyons que chez le revertant  $M_5 N_1 m_3 I$  du mutant  $M_5 N_1 m_3$ , le plasmide moyen n'est plus visible et que chez le revertant  $M_5 N_1 m_3 II$  ce sont les deux plasmides de la souche d'origine qui ont disparu. De même chez le revertant du mutant *R. meliloti* 2011 *m. a.*, on n'observe plus le mégaplasme. PHOTO.N°5

Nous avons calculé l'efficacité d'étalement ainsi que le taux d'adsorption du phage  $\phi 4.M_{11}S$  sur ces différents clones.

Le tableau 10 donne ces résultats et rappelle le contenu  
plasmidique



2011 RP4

Révértant  
2011<sup>ma</sup>

Mutant 2011<sup>ma</sup>

2011

Plasmide géant

Plasmide RP4

PHOTO. N° 5



Phage	Clones	e.o.p.	Pourcentage d'adsorption 30 min. après infection	Plasmide
Ø4.M <sub>11</sub> S	M5N1 m <sub>3</sub>	3. 10 <sup>-4</sup>	99	2 plasmides
	M5N1 m <sub>3</sub> I (revertant)	<10 <sup>-9</sup>	0	perte du plasmide moyen
	M5N1 m <sub>3</sub> II (revertant)	<- <sup>9</sup>	0	perte des deux plasmides
	2011 m.a.	5.10 <sup>-4</sup>	75	1 mégaplasme
	2011 ma I (revertant)	<10 <sup>-9</sup>	0	perte du mégaplasme

Tableau 10 - Efficacité d'étalement et adsorption du Ø4.M<sub>11</sub>S sur divers clones de *R. meliloti* au contenu plasmidique différent.

Nous observons que dans tous les cas où les clones de *R. meliloti* ont perdu un ou deux plasmides, l'efficacité du phage est devenue presque nulle mais ceci est en corrélation normale avec une adsorption qui ne s'effectue plus.



## II - Lysogénisation

Si la production de phages et la destruction des cellules sont les résultats les plus manifestes d'infection phagique, ce ne sont pourtant en aucune manière les seules issues possibles. Il est plus profitable pour de nombreux phages, comme pour beaucoup de cellules, de persister à l'intérieur de l'hôte de manière inoffensive.

*R. meliloti* M<sub>19</sub>S et 444 ont été lysogéinisées à l'aide du prophage Ø<sub>11</sub>.M<sub>22</sub>S. Puis le pouvoir de restriction de ces souches a été évalué grâce au phage Ø4.M5N1.

Le tableau 11 montre que dans les deux cas, le phage voit sa croissance plus fortement restreinte par les clones lysogènes que par les sauvages. Les coefficients d'efficacité d'étalement diminuent de 10 à 100 fois.

Souches	EoP du Ø4.M5N1 souches lysogènes ou non
M <sub>19</sub> S	10 <sup>-6</sup>
M <sub>19</sub> (M <sub>11</sub> )	5 10 <sup>-8</sup>
444	2 10 <sup>-5</sup>
444(M <sub>11</sub> )	3 10 <sup>-6</sup>

M<sub>19</sub>(M<sup>11</sup>) : Souche lysogéinisé par le ØM<sub>11</sub>.

Tableau 11 - EoP du Ø4.M5N1 sur les souches lysogènes et non lysogènes



### III - Interprétation des résultats et discussion

L'introduction du plasmide  $RP_4$  chez *R. meliloti* résulte en une perte considérable de l'efficacité du phage sur les souches examinées. Ceci peut provenir d'un système de R.M. codé par le plasmide  $RP_4$  bien que nous n'ayons pas pu être confirmés chez une autre souche telle que *E. coli*. Il se peut que le plasmide inhibe en fait le développement des phages chez *R. meliloti* par un phénomène d'incompatibilité. ( 10, 17, 19, 21, 45, 55 )

On connaît également d'autres exemples tels que l'inhibition du coliphage T<sub>7</sub> par un blocage de la traduction de l'ARN due à un plasmide ( 47 )

Les plasmides indigènes de *R. meliloti* influent sur la relation de la bactérie avec ses phages. En effet, la disparition du mégaplasme ou du plasmide moyen chez les souches 2011 et M5N1 est en corrélation avec la non adsorption des phages. Il semble que dans ce cas la restriction ne soit pas directement concernée. Par contre, nous pouvons comparer nos expériences avec celles de CORRAL et Coll qui ont montré que la sensibilité aux phages chez *R. meliloti* était la conséquence de la présence d'un plasmide.

PALOMARES et Coll (1978) expliquent ultérieurement que de ce plasmide dépend la composition d'exopolysaccharides qui auraient un rôle dans l'adsorption phagique. Dans la même optique, il a été prouvé que *R. meliloti* Rm4 et R m11 héberge un plasmide transférable à haute fréquence entre des bactéries de même espèce. Ce plasmide nommé pEZ, confère la sensibilité aux phages pour les souches qui le possèdent. (19).

Les ADN plasmidiques étrangers ou indigènes paraissent donc procurer à *R. meliloti* une résistance aux phages en intervenant au niveau de l'adsorption sur les structures externes.

La lysogénisation, par contre, dans nos conditions expérimentales, semble apporter une augmentation du pouvoir de restriction tout au moins pour les souches 444 et M<sub>19</sub>S ayant acquis le phage ØM<sub>11</sub>. M<sub>22</sub>S. En effet, les coefficients d'efficacité d'étalement du phage indicateur Ø4.M5N1 sont considérablement diminués par rapport aux coefficients obtenus sur les souches sauvages. Toutefois nous obtenons encore des plages de lyse, sur les cultures bactériennes en nombre suffisant pour éliminer l'intervention de mutations naturelles chez les phages ou les bactéries.

Le phage ØM<sub>11</sub>. M<sub>22</sub>S posséderait donc des gènes codant pour un système de R.M. chez les souches 444 et M<sub>19</sub>S de *R. meliloti*, bien que nous n'écarterons pas non plus l'hypothèse d'une compétition entre le ØM<sub>11</sub>. M<sub>22</sub>S temperé et le Ø4. M5N1 virulent au sein des souches de *R. meliloti* utilisées (57).

## Discussion Générale et Conclusion

Notre étude nous a permis de préciser quelques aspects génétiques de la relation phage-bactérie chez *R. meliloti*.

Dans un premier temps, l'utilisation de nos modèles expérimentaux a permis de mettre en évidence l'un des phénomènes les plus intéressants, c'est-à-dire la restriction-modification de l'ADN phagique par les souches bactériennes. A partir de l'étude des coefficients d'efficacité d'étalement des bactériophages, nous avons également émis l'hypothèse selon laquelle plusieurs systèmes de restriction-modification pouvaient coexister au sein d'une même souche.

Dans le but d'étudier plus profondément ce comportement bactérien, nous avons tenté d'introduire des variations génétiques, au niveau de la restriction, à l'aide de différents moyens de mutation. Pour cela nous avons d'abord tenté d'insérer le transposon Tn5 dans l'ADN chromosomique bactérien espérant ainsi réaliser une mutation sur les gènes codant pour le phénomène étudié. L'avantage de cette technique réside dans le fait que le transposon Tn5 confère à la bactérie une résistance à certains antibiotiques qui facilite la sélection des mutants. Plusieurs souches de *R. meliloti* ont ainsi effectivement acquis le transposon Tn5 mais aucune ne s'est avérée déficiente du point de vue restriction, mais au contraire certains mutants provoquent une diminution de l'efficacité du phage.

Si la mutation par transposition permet une sélection commode des mutants, elle a par contre l'inconvénient de ne pas toucher toutes les régions du chromosome et de plus l'insertion des transposons se heurte parfois à des compétitions dues par exemple à la présence de prophage.

Nous avons donc eu recours à l'utilisation de substances mutagènes alkylantes classiques (NTG, EMS) qui agissent au hasard et sans exclusive. Pourtant nous n'obtenons pas non plus de mutants ayant une altération de leur pouvoir de restriction. Il semble plutôt que ce sont les gènes codant pour les sites récepteurs des phages sur la paroi bactérienne qui sont touchés puisque nous observons souvent une forte diminution de l'efficacité des phages, allant dans certains cas jusqu'à une résistance totale de la bactérie, confirmée par le fait que les phages ne s'adsorbent plus.

Les mutations n'ayant pu modifier la relation phage-bactérie dans le sens d'une diminution notable du pouvoir de restriction, nous avons proposé d'expliquer cet état de fait en considérant la complexité du patrimoine génétique de *R. meliloti* qui est constitué, outre le chromosome, de plusieurs plasmides et parfois un prophage.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier les interactions possibles entre les réactions de défense de la bactérie et ces éléments extrachromosomiques.

L'introduction du plasmide  $RP_4$  chez *R. meliloti* inhibe cette fois le cycle lytique du phage. Il ne s'agit pas de résistance puisque les bactériophages s'adsorbent sur la paroi. Il semble qu'il puisse s'agir d'une augmentation de la restriction grâce à l'acquisition pour la bactérie d'un nouveau système codé par le plasmide  $RP_4$ , bien que l'on ne puisse pas exclure, dans nos conditions, l'oeuvre d'une interférence entre la réplication du plasmide et celle du phage(47).

Quant aux plasmides indigènes de *R. meliloti*, nous avons observé que leur disparition totale ou partielle se traduit par l'apparition de la résistance au phage vérifiée à nouveau par la non adsorption de ces derniers. La sensibilité de la bactérie aux bactériophages serait donc une conséquence plasmidique.

Enfin, certaines souches de *R. meliloti* ont été rendu lysogène et l'influence de ce prophage sur la relation phage-bactérie a été étudiée. Nous avons remarqué qu'il y avait une agmentation importante de la restriction résultant probablement de l'expression d'un système codé par le prophage.

L'ensemble de nos travaux nous amène donc à conclure que *R. meliloti* oppose à ses bactériophages des réactions de défense importantes que nous n'avons pu faire varier que dans le sens d'un renforcement. Ces phénomènes doivent être soumis à un contrôle génétique complexe où interviennent des plasmides et des prophages qui apportent leur concours codant pour des systèmes de restriction-modification, soit peut être en entrant en compétition avec de l'ADN du phage virulent lorsque celui-ci a pu pénétrer dans la bactérie.

Rappelons encore que *R. meliloti* est une bactérie du sol et que les considérations qui précèdent sont en accord avec un environnement hostile.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 - ADAMS, M. 1959  
The Bacteriophages.  
New-York Interscience Publishers.
- 2 - ALI, H. 1982  
Obtention de mutants chez *R. meliloti* par l'insertion du trans-  
poson Tn5 et étude de leurs revertants.  
Thèse de Docteur de 3ème Cycle n°963, Université des Sciences et  
Techniques de Lille.
- 3 - ANDERSON, C.W. and EIGNER, J. 1971  
*Virology* 8, 869-886.
- 4 - ARBER, W. and LINN, S. 1969  
DNA modification and restriction.  
*Ann. Rev. Biochem.* 38, 467-500.
- 5 - ARBER, W. 1974  
DNA modification and restriction.  
*Prog. Nucleic. acid. res. Mol. Biol.* 14, 1-37.
- 6 - AYANABA, A. 1982  
Les bactéries et l'économie de l'azote.  
*Science et Société* 2, 203-212.
- 7 - BANNISTER, D. and GLOVER, S.W. 1970  
The isolation and properties of non restricting mutant of two  
different host specifilities associated with drug resistance  
factors.  
*J. Gen. Microbiol.* 61, 63-71.
- 8 - BAYER, M. 1979  
In bacterial outer membranes.  
Ed. INOUE M., Wiley, New-York.
- 9 - BEARD, J.P. and BISHOP, S.F. 1975  
Role of the cell surface in bacterial mating.  
*J. Bacteriol.* 3, 316-920.
- 10 - BEDMAR, E.J. and OLIVARES, J. 1980  
Autotransmissible resident plasmid of *R. meliloti*.  
*Mol. Gen. Genet.* 177, 329-331.



- 11 - BOUSSEMAER, J.P., SCHRAUWEN, P.P. and SOURROUILLE, J.L. 1980  
Multiple modification restriction system in *Lactic Streptococci*  
and their significance in defining a phage typing system.  
*J. Dairy Res.* 47, 401-403.
- 12 - BOYER, H. 1964  
Genetic control of restriction modification in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol.* 88, 1652-1660.
- 13 - BRON, S. 1975  
Restriction and modification in *B. subtilis*.  
*Mol. Gen. Genet.* 143, 13-23.
- 14 - BRON, S. and LUXEN, E. 1980  
Restriction and modification in *B. subtilis*.  
*Mol. Gen. Genet.* 179, 103-110, 111-117.
- 15 - CERADA-OLMEDO, E. and HANAWALT, P.C. 1967  
*Mol. Gen. Genet.* 101, 191.
- 16 - CHATTORAJ, D.K., OBEROI, Y.K. and BERTANI, G. 1977  
Restriction of bacteriophage P<sub>2</sub> by the *E. coli* RI plasmid, and  
*in vitro* cleavage of its DNA by the ECORI endonuclease.  
*Virology* 81, 460-470.
- 17 - COETZEE, J.N., BRADLEY, D.E. and HEDGES, R.W. 1982  
Phages I<sub>α</sub> and I<sub>2</sub><sup>-2</sup> : In CI plasmid dependent bacteriophages.  
*J. Gen. Microbiol.* 128, 2797-2804.
- 18 - CONN, H.J., BETTCHER, E.J. and RANDALL, C. 1945  
The value of bacteriophage in classifying certain soil bacteria.  
*J. Bacteriol.* 49, 359-367.
- 19 - CORRAL, E., MONTOYA, E. and OLIVARES, J. 1978  
Sensitivity to phages in *R. meliloti* as plasmid consequence.  
*Microbios Letters* 5, 77-80.
- 20 - ECHOLS, H. 1972  
Developmental pathways for the temperate phage : lysis vs. Lysogeny.  
*Ann. Rev. Genet.* 6, 157-190.

- 21 - EMBDEN, J.D.A.V. and LEEUWEN, W.J.V. 1976  
Interference with propagation of typing bacteriophages by  
extrachromosomal elements in *Salmonella typhimurium* :  
bacteriophage type 505.  
*J. Bacteriol.* 3, 1414-1426.
- 22 - ESKRIDGE, R.W., WEINFELDH, H. and PAIGEN, K. 1967  
Susceptibility of different coliphage genomes to host-controlled  
variation.  
*J. Mol. Biol.* 18, 109-126.
- 23 - FELIX HUBERT D'HERELLE 1917  
Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.  
*C. R. Acad. Sci. (Paris)* 165, 373-375.
- 24 - FUCHS, E. 1977  
The formation of bacteriophage T<sub>7</sub> and T<sub>3</sub> lysozymes from inactive  
precursors.  
*FEBS Letters* 80, 27-29.
- 25 - GINGERAS, T.R. and BROOKS, J.E. 1983  
Cloned restriction - modification system from *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 80, 402-406.
- 26 - HADI, S.M., BACHI, B. and IIDA, S. 1983  
DNA restriction - modification enzymes of phages P<sub>1</sub> and plasmid  
p 15 B.  
*J. Mol. Biol.* 165, 1-18, 19-34.
- 27 - HANCOCK, R.E.W. and REEVES, P. 1975  
Bacteriophage resistance in *E. coli* K<sub>12</sub> : general pattern of  
resistance.  
*J. Bacteriol.* 3, 983-993.
- 28 - HAUSMANN, H. 1971  
Expression of the genomes the related phages T<sub>3</sub> and T<sub>7</sub>.  
*Proc. First. Europ. Biophys. Cong.*, 467-488.
- 28bis - HINKLE, N.F. and MILLER, R.V. 1979  
pMG<sub>7</sub>-mediated restriction *Pseudomonas aeruginosa* phage DNAs is  
determined by a class II restriction endonuclease.  
*Plasmid* 2 : 387-393.

- 29 - HONN, D. 1960  
In microbial genetics. Tenth Symp.  
Soc. gen. gene. microbial.  
Ed. : HAYES, W 39-66.
- 30 - JACOBY, G.A. and SUTTON, L. 1982  
Restriction and modification determined by a *Pseudomonas* R  
plasmid.  
*Plasmid* 1, 115-116.
- 31 - JACOBY, G.A. and SUTTON, L. 1982  
Restriction and modification determined by a *Pseudomonas* plasmids.  
*Plasmid* 8, 141-147.
- 32 - JESAITIS, M.A. and GOEBEL, W.F. 1953  
Cold spring harbor symp.  
*Quant. Biol.* 18 : 205-208.
- 32bis - KELLENBERGER, E. and SECHAUD, J. 1959  
*Virology* 8, 478-498.
- 33 - KORNBERG, A. 1978  
Aspect of DNA replication.  
Cold spring harbor symp., *Quant. Biol.* 43, 1-9.
- 34 - KRUGER, D.H. and SCHROEDER, C. 1977  
Active protection by bacteriophages T<sub>3</sub> and T<sub>7</sub> against *E. coli*  
B - and K - specific restriction of their DNA.  
*Mol. Gen. Genet.* 157 , 81-85
- 35 - KRUGER, D.H., CHERNIN, L.S. and HANSEN, S. 1978  
Protection of foreign DNA against host controlled restriction in  
bacterial cells.  
*Mol. Gen. Genet.* 159, 107-110.
- 36 - KRUGER, D.H. and GOLA, G. 1978  
The ocr gene fonction of bacterial viruses T<sub>3</sub> and T<sub>7</sub> prevents  
host controlled modification.  
*J. Gen. Virol.* 41, 189-192.

- 37 - KRUGER, D.H. and SCHROEDER, C. 1981  
Bacteriophage T<sub>3</sub> and bacteriophage T<sub>7</sub> virus host cell interactions.  
*Microbiol. Rev.* 45, 9-51.
- 38 - KRUGER, D.H., REUTER, M. and CHERNIN, L.S. 1981  
Transformation in *E. coli* : protection of plasmid DNA by the  
*ocr*<sup>+</sup> gene function of bacteriophages T<sub>3</sub> or T<sub>7</sub> against restriction.  
Ed. M. POLSINELLI and G. MAZZA, Cotswold press, Lim, Oxford.
- 39 - LEDERBERG, J. and LEDERBERG, E.M. 1952  
Replicating and indirect selection of bacterial mutants.  
*J. Bacteriol.* 63, 399-406.
- 40 - LESLEY, S.M. 1981  
A bacteriophage typing system for *R. meliloti*.  
*Canad. J. Microbiol.* 28, 180-189.
- 41 - LINDBERG, A.A. 1973  
Bacteriophage receptors.  
*Ann. Rev. Microbiol.* 27, 205-241.
- 42 - LIU, C.C. and BURKE, R.L. 1978  
Cold spring harbor symp.  
*Quant. Biol.* 43, 469-487.
- 43 - MANDEL, J.D. and GREENBERG, J. 1960  
A new chemical mutagen for *Dacteria*, 1 methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 575-577.
- 43bis - MANNASSE, R.J. and STAPLES, R.C. 1972  
Morphological, biological and physical properties of  
*Agrobacterium tumefaciens* bacteriophages.  
*Virology* 47, 375-384.
- 44 - MARK, J.L. and STUDIER, W. 1981  
Purification of the gene 0,3 protein of bacteriophage T<sub>7</sub> an  
inhibitor of the DNA restriction system of *E. coli*.  
*J. Biol. Chem.* 5, 2573-2578.

- 45 - MARRERO, R. and LOVETT, P.S. 1982  
Interference of a plasmid pCM 194 with lysogeny of bacteriophage  
SP<sub>02</sub> in *Bacillus subtilis*.  
*J. Bacteriol.* 1, 284-289.
- 45bis - MEADE, H.M. and SINGER, E.R. 1977  
*Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 74, 2076-2078.
- 46 - MESELSON, M. and YUAN, R. 1968  
DNA restriction enzymes from *E. coli*.  
*Nature* 217, 1110-1114.
- 47 - MORRISON, T.R. and MALAMY, M.H. 1970  
Translational control mechanisms and their inhibition by F factors.  
*Nature* 231, 37-41.
- 48 - PALOMARES, A., MONTTOYA, E. and OLIVARES, J. 1978a et 1978b  
Induction of polygalacturonase in legume as a consequence of  
extrachromosomal DNA carried by *Rhizobium meliloti*.  
*Microbios* 21, 33-39.
- 49 - RABUSSAY, D. 1982  
Bacteriophage T<sub>4</sub> infection mechanisms. Molecular action of toxins  
and viruses.  
Ed. COHEN and VAN HEYNINGEN, Elsevier Biomedical Press, 219-331.
- 50 - ROBERTS, R.J. 1983  
Restriction and modification enzymes and their recognition  
sequences.  
*Nucleic acids research* 1, 135-168.
- 51 - SIMON, M.N. and STUDIER, W. 1973  
Physical mapping of the early region of bacteriophage T<sub>7</sub> DNA.  
*J. Mol. Biol.* 79, 249-265.
- 52 - SMITH, H.O. and WILCOX, K.W. 1970  
A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*.  
*J. Mol. Biol.* 51, 379-391.

- 53 - SMITH, H.O. and NATANS, O. 1973  
Suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes.  
*J. Mol. Biol.* 81, 419-423.
- 54 - STANIEWSKI, R. 1970a  
Relation ship among different *Rhizobium* strains determined by phage lysis.  
*Acta, Microbiol. Polon.*, ser. B, 2, 3-12.
- 55 - TAYLOR, D.E. and GRANT, R.B. 1977  
Incompatibility and bacteriophage inhibition properties of N<sub>-1</sub>, a plasmid belonging to the H<sub>2</sub> incompatibility group.  
*Mol. Gen. Genet.* 153, 5-10.
- 56 - THOMAS, R. and BROOKS, E. 1983  
Cloned restriction modification system from *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 402-406.
- 57 - TRAUTNER, T.A., PAWLEK, B. and GUNTHER, T. 1980  
Restriction and modification in *Bacillus subtilis*.  
*Mol. Gen. Genet.* 180, 361-367.
- 58 - TWORT, S.W. 1915  
An investigation of the nature of the ultramicroscopic viruses.  
*Lancet* 2, 1241-1243.
- 59 - WERQUIN, M. et BEN BRAHIM, M. 1977  
Etude des bactériophages de *Rhizobium meliloti*.  
*C. R. Acad. Sci. (Paris)* 284, 1851-1854.
- 60 - WOOD, W.B. 1966  
Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA.  
*J. Mol. Biol.* 16, 118-133.
- 61 - XAVIER, P. 1980  
Etude des plasmides chez *Rhizobium meliloti*.  
D.E.A., Université des Sciences et Techniques de Lille.

62 - YAMAMOTO, K.R. and ALBERTS, B. 1970

Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylen glycol and its application to large scale virus purification.

*Virology* 40, 734-744.

63 - YUAN, R., BURCKHARDT, J. and HAMILTON, D.L. 1982

The methylated state of a DNA sequence and its effect on the functions of the restriction endonuclease from *E. coli* K.

Ed. Cancer biology program by Academic press.

