

50376
1984
60

50376
1984
60.

N° d'ordre : 1166

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

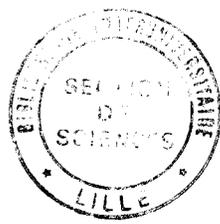
DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

spécialité : «BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES»

par

Monique ANDRIANTSIMIAVONA - OTONIA

**ETUDE COMPARATIVE DE BACTERIOPHAGES
DE RHIZOBIUM MELILOTI**



Soutenue le 22 Juin 1984 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	MM.	J.	GUILLAUME	Président
		R.	TAILLIEZ	Rapporteur
		J.J.	CURGY	Examineur
		J.C.	DERIEUX	Examineur

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

Je tiens à exprimer ma gratitude à **Monsieur le Professeur J.B. GULLAUME** pour l'accueil qu'il m'a accordé.

Je remercie également **Monsieur R. TALLIEZ** d'avoir bien voulu être le rapporteur de cette thèse, ainsi que **Messieurs J.J. CURGY** et **J.C. DERIEUX** d'avoir accepté de faire partie du Jury.

Mes remerciements vont particulièrement à **Monsieur M. WERQUIN** qui m'a toujours assuré de son aide et de sa sympathie durant mes études.

Que **Madame Agnès BEGUE**, ainsi que **Messieurs M. BECHET, A. DECQ, C. DEFIVES** et **K. MAOUI** trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance pour les conseils judicieux qu'ils m'ont apportés tout-au-long de mes recherches.

Je tiens à remercier également **Mesdames M. BONNIER** et **C. JOVENIN**, ainsi que tout le personnel du Laboratoire, pour leur contribution précieuse et leur gentillesse.

Je ne saurai oublier le soutien matériel et psychologique que j'ai trouvé auprès de mes amis **Marius et Lalao A.R., Sahondra R., Bodo R. et Ginette R.**

Enfin, si j'ai pu réaliser cette thèse, c'est en partie grâce à **Michel et Madeleine ROCHAT**. Soyez assurés de ma reconnaissance !

à M A X

Rado et Manantenasoa

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Pages
AVANT-PROPOS	1
HISTORIQUE	4
GENERALITES	10
I - Bref rappel sur la structure de l'ADN.....	11
II - Etude du contenu en bases nucléiques de l'ADN.....	14
III - L'infection virale.....	17
IV - Restriction- Modification (R - M).....	21
1) Définition du phénomène.....	21
2) Mécanisme d'action du système R - M.....	24
3) Les endonucléases de restriction ou les enzymes de restriction.....	25
MATERIEL ET METHODES	29
I - Souches bactériennes et bactériophages.....	30
II - Milieux de culture.....	31
1) Milieu <u>Rhizobium</u> complexe (RC).....	31
2) Milieu RC gélosé.....	31
3) Source de carbone.....	31
4) Milieu gélosé pour bactériophages.....	32
5) Utilisation de CaCl ₂ et MgCl ₂	32
III - Obtention de cultures bactériennes.....	32
IV - Production de bactériophages.....	32
1) Sur milieu gélosé.....	32
2) En milieu liquide.....	33
V - Dénombrement des phages.....	35
VI - Concentration des suspensions phagiques.....	35

VII - L'ADN phagique.....	38
1) Extraction de l'ADN.....	38
a) Méthode d'extraction rapide de l'ADN...	38
b) Utilisation du perchlorure de sodium...	39
c) Extraction au phénol.....	39
2) Méthode utilisée pour déterminer le contenu en bases de l'ADN.....	41
3) Les enzymes de restriction.....	44
4) Electrophorèse en gel d'agarose.....	48
a) Principe.....	48
b) Méthode.....	49
 RESULTATS ET COMMENTAIRES.....	 51
CHAPITRE I : Production de phages en fermenteur. Etude et comparaison de quelques cinétiques de lyse.....	52
1) Etude des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 et Φ_{L9}	52
2) Le groupe des phages Φ_4 , Φ_{5t} et Φ_6	53
3) Etude des phages Φ_{13} , Φ_{16} et Φ_{20}	60
4) Cas d'un phage tempéré : le phage Φ_{M20}	60
CHAPITRE II : Purification et concentration des suspensions phagiques.....	64
CHAPITRE III - L'ADN phagique.....	68
1) Estimation du contenu en G + C de l'ADN des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20}	69
2) Etude comparative des profils de restriction des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20}	74

3) Etude de l'ADN des phages Φ_3 et Φ_{M20} . Digestions simples et multiples par d'autres endonucléases et établissement de leur carte de restriction...	82
CONCLUSION GENERALE.....	98
BIBLIOGRAPHIE.....	103

AVANT - PROPOS

L'accroissement considérable de la population mondiale amène de nombreux états à développer l'agriculture afin de pouvoir assurer une production alimentaire suffisante, voire même excédentaire.

L'utilisation d'engrais azotés autrefois d'un prix relativement faible s'avère aujourd'hui plus difficile du fait des coûts de plus en plus élevés de l'énergie nécessaire à leur fabrication.

De nombreux chercheurs de par le monde se penchent actuellement sur le remplacement plus ou moins partiel des procédés de synthèse chimique des engrais azotés, par des processus biologiques qui permettraient de fixer directement l'azote de l'air, ce qui baisserait considérablement le prix de revient de leur utilisation.

Après la découverte par BOUSSINGAULT, en 1938, (9) de la fixation de l'azote atmosphérique par les légumineuses, les recherches se sont multipliées dans ce sens. Elles ont abouti à la conclusion que, grâce à la symbiose s'établissant entre les végétaux supérieurs tels que les légumineuses, et les microorganismes comme les bactéries du genre Rhizobium, l'azote atmosphérique est transformé par les bactéries en produits azotés directement assimilables par la plante.

A partir de là, chaque état a essayé d'améliorer les techniques d'investigation, manipulant les bactéries, leur conférant des caractères intéressants, utiles, afin de pouvoir étendre cette fixation biologique de l'azote, à d'autres plantes cultivées.

Mais cette "manipulation" des bactéries nécessite une connaissance approfondie de la génétique microbienne.

Pour cela, le phénomène de la transduction (généralisée ou spécialisée), c'est-à-dire le passage d'une fraction du génôme d'une bactérie à une autre, par l'intermédiaire d'un bactériophage, a été largement étudié.

Nous voyons alors l'importance que revêtirait le transfert des gènes de la fixation de l'azote, gènes Nif (Nitrogen fixation) d'une bactérie Nif⁺ à une bactérie Nif⁻.

L'étude approfondie des bactériophages, vecteurs des transferts génétiques est donc primordiale non seulement dans ce cas mais aussi lorsqu'on aborde les phénomènes de compétition entre les souches bactériennes au niveau du sol.

HISTORIQUE

WHO DISCOVERED BACTERIOPHAGES ?

DUCKWORTH (22) nous relate quelques évènements qui ont permis la découverte des bactériophages.

En 1915, un chercheur, TWORT, constate qu'une culture de Micrococcus devenait, par elle-même, transparente. Cette transformation qu'il qualifie de "vitreuse", présente des caractéristiques encore inconnues. En effet, l'analyse des "cultures transformées" ne révèle la présence d'aucune bactérie vivante, mais d'un amas de débris. D'autre part, une culture pure de la même bactérie peut, lorsqu'elle est en contact avec cette culture transformée, devenir, elle aussi, transparente au bout de quelques temps.

En filtrant la culture transformée, il conclut à la présence, dans le filtrat, d'un agent infectieux qui tue les bactéries en se multipliant.

En 1917, d'HERELLE, un chercheur français, en travaillant sur les bacilles dysentériques chez l'homme, s'aperçoit de l'existence du même phénomène et démontre que le principe lytique n'est autre qu'un virus pathogène pour les bactéries, se multipliant en "lysant" son hôte. Confirmant ainsi la découverte de TWORT, il donne le nom de bactériophagie à ce phénomène.

Pourtant d'autres chercheurs, tels que BORDET, refusent cette théorie, attribuant cette transformation soit à un processus enzymatique, soit à des agents extérieurs à la culture bactérienne.

Les recherches ultérieures ont abouti à la confirmation de la conception du phénomène. En effet, en 1923, GERETSEN, GRIJNS, SACH et SOHUGEN (25) ont pu isoler des bactériophages de Rhizobium à partir des nodules racinaires de trèfle et de lupin.

La notion de "bactérie lysogène" a été introduite par Eugène et Elizabeth WOLLMAN (68) en 1933, lorsqu'ils se sont aperçus que des bactéries apparemment normales pouvaient, dans certaines conditions, produire des bactériophages capables d'infecter d'autres cellules voisines.

On donne le nom de "prophage" à ce phage à priori non virulent lorsqu'il est porté par la bactérie (dite lysogène) mais qui l'est, dès qu'il en sort spontanément ou par induction. On l'appelle également phage tempéré par rapport au phage virulent qui lyse toutes les bactéries qu'il infecte.

Les phages des bactéries du genre Rhizobium ont été étudiés depuis longtemps étant donné leur importance du point de vue de l'agriculture.

KLECKZKOWSKA, par exemple, en 1945 (34) grâce à la découverte de d'HERELLE, a mis en évidence l'influence de divers facteurs sur la production, le nombre et la taille des plages de lyse obtenues sur des cultures de Rhizobium.

Les travaux de MARSHALL et VINCENT en 1954 (48) repris d'ailleurs plus tard par VINCENT en 1962 (63) ont montré une relation entre les propriétés sérologiques des Rhizobium et leur sensibilité aux phages, en précisant toutefois que des phages appartenant à des types différents peuvent réagir de la même manière à un antiserum donné.

En 1956, MARSHALL (49) a mis en évidence le phénomène de la lysogénie chez R. trifolii.

Mais l'étude des bactériophages ne connut un essor important qu'après l'apparition de la microscopie électronique et la mise au point des techniques de coloration négative.

C'est ainsi que BRADLEY, en 1967 (11) a observé et décrit la structure de nombreux phages d'origines diverses, qu'il a classés en six groupes morphologiques différents. Sa classification, toujours valable actuellement, demeure celle qu'on utilise dans la systématique des phages.

Dans l'étude de la taxonomie du genre Rhizobium, les bactériophages ont également été utilisés avec succès.

En effet, grâce à la sensibilité des bactéries à des phages spécifiques, de nombreux chercheurs ont pu établir par des méthodes de typage, une classification valable de ces bactéries.

Ainsi, GRAHAM, en 1964 (26) et STANIEWSKI, en 1970 (58) ont pu établir une relation entre R. trifolii, R. leguminosarum, et R. phaseoli ; le R. meliloti faisant partie d'un autre groupe.

Mais cette sensibilité des bactéries aux phages peut être perturbée lorsque les bactéries sont soumises à des agents mutagènes. STANIEWSKI et KOWALSKA en 1974 (60), PATEL en 1976 (53) ont observé cette modification chez le genre Rhizobium.

Toujours grâce à la lysotypie, LESLEY, en 1982 (33) a pu subdiviser 350 souches de R. meliloti en 80 groupes en utilisant 15 bactériophages différents.

Les travaux de génétique bactérienne ont été pendant très longtemps basés sur la transformation.

Ce phénomène, mis en évidence par GRIFFITH en 1928 (64), consiste en un transfert d'ADN libre provenant d'une bactérie vers une autre, réceptrice et compétente.

Par la suite, la transfection fut découverte, puis la conjugaison bactérienne, par LEDERBERG et TATUM (38).

Ainsi, dans le cas du genre Rhizobium, BALASSA en 1963 (7) a démontré que la transformation pouvait s'effectuer chez R. japonicum.

HIGASHI, en 1967 (30) a mis en évidence des transferts génétiques par conjugaison chez R. trifolii et R. phaseoli.

STANIEWSKI et coll., en 1971 (59) ont montré que chez R. meliloti, des cellules bactériennes ou des sphéroplastés pouvaient être infectés par transfection.

La découverte du phénomène de transduction par LEDERBERG et ZINDER, en 1951, (transfert de caractères d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un bactériophage), a donné aux chercheurs l'idée d'étudier plus particulièrement ces bactériophages, vecteurs de caractères génétiques.

Ainsi KOWALSKI, en 1967 (35) isolant des phages tempérés de R. meliloti s'est aperçu que l'un de ces phages était capable de transférer le caractère de résistance à la streptomycine d'une souche (résistante) à une souche sensible.

En 1972, KOWALSKI et DENARIE (36) ont transféré par transduction le caractère de l'efficacité, c'est-à-dire le pouvoir de fixer l'azote, chez R. meliloti. Ils ont constaté que le gène "leucine" et le gène de l'efficacité étaient co-transduits. En effet,

les mutants auxotrophes pour la leucine ne sont pas efficaces alors que les revertants prototrophes ainsi que les transductants le sont.

La plupart des souches de Rhizobium étant porteurs de plasmides (ADN extrachromosomiques), des chercheurs comme BUCHANAN-WOLLASTON, en 1979 (13) ont pu transduire des gènes chromosomiques et des gènes plasmidiques à l'intérieur d'une même espèce et même entre espèces différentes (transduction interspécifique) de Rhizobium (de R. leguminosarum à R. trifolii).

Enfin, SIK et coll., en 1980 (57) ont pu établir la carte génétique d'une souche de R. meliloti grâce à la capacité du phage 11 à transduire plusieurs gènes à la fois.

GENERALITES

I - BREF RAPPEL SUR LA STRUCTURE DE L'ADN

La molécule d'ADN est constituée de deux chaînes polynucléotidiques enroulées l'une autour de l'autre en formant une double hélice (64).

Les quatre principaux nucléotides constituant chaque chaîne sont composés d'un sucre, un désoxyribose, d'un groupement phosphate et d'une base purique (Adénine ou Guanine) ou pyrimidique (Cytosine ou Thymine).

Les liaisons entre les sucres et les groupements phosphate assurent à la molécule une structure organisée, régulière (squelette) faisant toujours intervenir les mêmes radicaux, ce qui contraste avec l'ordre irrégulier de la succession des bases le long de la chaîne. En effet, ces bases sont disposées de façon perpendiculaire par rapport à l'axe de l'hélice et leur ordre varie d'une molécule à l'autre.

L'appariement des bases par des liaisons hydrogène réunit les deux chaînes en maintenant la cohésion de la molécule d'ADN. Mais cet appariement ne se fait pas au hasard. A cause de la stabilité relative de la position des atomes d'hydrogène, de la configuration des atomes d'azote (le plus souvent sous la forme amino : NH_2) et de celle des atomes d'oxygène fixés aux carbones 6 de la guanine et de la thymine (sous forme céto : $\text{C} = \text{O}$), ni les bases puriques, ni les bases pyrimidiques ne peuvent s'apparier entre elles. La guanine est toujours liée à la cytosine (par trois ponts hydrogène) et l'adénine à la thymine (par deux ponts hydrogène), ce qui entraîne une complémentarité entre les séquences des bases des deux chaînes associées et une orientation opposée des deux chaînes.

La FIGURE 1 illustre cette structure organisée de la molécule d'ADN.

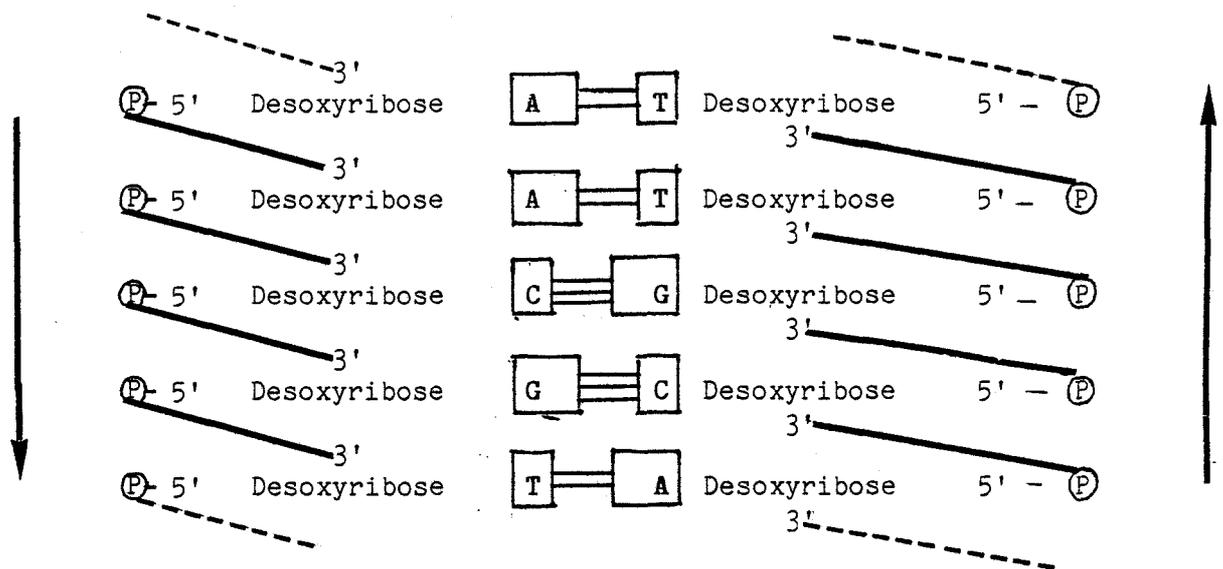


FIGURE 1 : Schéma de la double hélice d'ADN montrant l'appariement spécifique des bases dont la séquence est irrégulière, l'orientation opposée des deux chaînes, les bases et les liaisons hydrogène entre les bases.

A = Adénine ; G = Guanine ; C = Cytosine ; T = Thymine

Compte tenu du fait que les paires de bases G — C sont maintenues par trois liaisons hydrogène alors que A — T ne sont maintenues que par deux liaisons, les molécules d'ADN riches en G et C résistent plus à la dénaturation thermique (températures supérieures aux températures physiologiques) que celles riches en A et T.

La dénaturation se manifeste par la séparation des deux brins de la molécule. Une renaturation, c'est-à-dire la réassociation des brins complémentaires, peut se faire par refroidissement progressif d'une solution d'ADN dénaturé. Cette propriété permet la construction de molécules d'ADN hybrides issues d'espèces différentes.

Les premières observations des ADN extraits de cellules animales ou bactériennes ont conduit à la conclusion que les molécules d'ADN étaient linéaires et d'un poids moléculaire de l'ordre du million.

En fait, il a été démontré ensuite que les extractions, les manipulations telles que l'agitation, le pipetage peuvent couper la molécule d'ADN en petits fragments.

L'étude des molécules d'ADN dégradées a prouvé qu'elles pouvaient se trouver sous forme circulaire. C'est le cas de l'ADN du virus SV40 (circulaire bicatenaire), de l'ADN du phage Φ x174 (circulaire monocaténaire) et de la majorité des chromosomes bactériens.

Chez les virus, l'interconversion des formes circulaires et linéaires peut se faire dans des conditions bien établies. Par exemple, l'ADN du phage λ , extrait de la particule virale se trouve sous forme linéaire mais une fois injecté dans la cellule hôte, il prend une forme circulaire.

L'ouverture de la molécule circulaire donne naissance à des extrémités monocaténaires cohésives. Vingt nucléotides complémentaires vont s'apparier en formant des cercles qui peuvent être fermés grâce à l'action d'une ligase.

Cette interconversion est schématisée sur la FIGURE 2 .

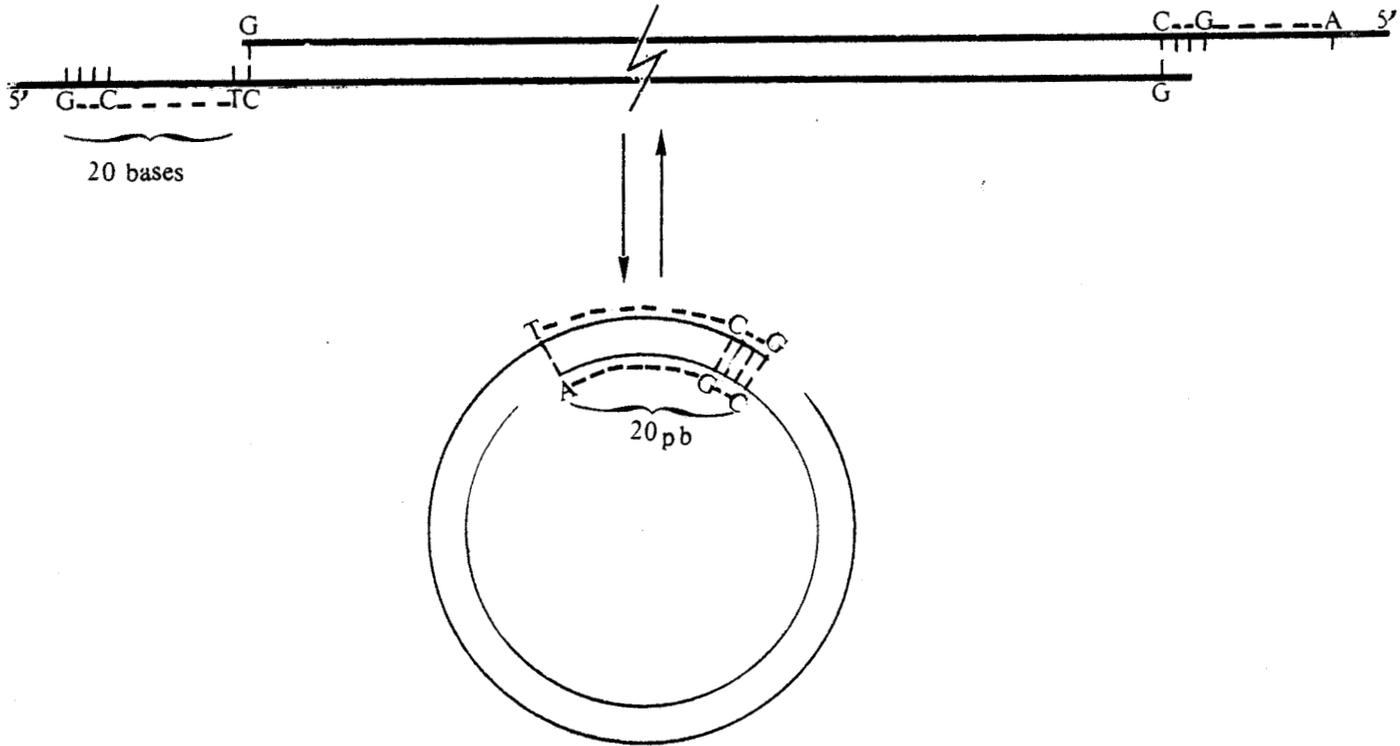


FIGURE 2 : Mécanisme de la conversion entre forme linéaire et forme circulaire de l'ADN du phage λ .

pb: paire de bases

II - ETUDE DU CONTENU EN BASES NUCLEIQUES DE L'ADN

L'étude de la composition en bases des ADN a permis d'apporter un argument important du rôle de l'ADN comme support de l'information génétique.

En effet, alors que l'on pensait que les quatre bases majeures A, G, C et T étaient présentes dans la molécule d'ADN en quantité égale, CHARGAFF et coll., en 1953 (15) ont établi que les rapports $\frac{A}{T}$ et $\frac{G}{C}$ sont égaux à 1 et que le rapport $\frac{A + T}{G + C}$ varie d'une molécule d'ADN à une autre.

Ils ont défini ainsi ce qu'ils ont appelé le **coefficient de CHARGAFF** que l'on peut exprimer également par le nombre de molécules de G et C pour 100 molécules dans l'ADN ou $\% (G + C)$.

Des valeurs proches du contenu en G + C indiquent une similitude des ADN ; des valeurs éloignées excluent l'appartenance des espèces à un même groupe phylogénique. Cependant, des valeurs identiques n'impliquent pas forcément l'appartenance au même groupe.

Il est donc possible d'établir une classification taxonomique des espèces à l'aide de la composition en bases de l'ADN.

Dans les mêmes travaux, CHARGAFF et coll., ont séparé par chromatographie les quatre bases libérées par hydrolyse de l'ADN, et les ont dosées par spectrophotométrie en lumière ultra-violette.

Cette technique a également été utilisée par BENDICH en 1957 (8).

Au cours de la même année, MESELSON, STAHL et VINOGRAD (51) ont étudié la distribution d'une macromolécule dans un gradient de densité obtenu par ultracentrifugation d'un soluté de faible poids moléculaire.

Ils ont étudié en particulier la distribution de l'ADN du phage T₄ dans un gradient de chlorure de césium. A l'équilibre, l'ADN forme une bande dans la zone qui correspond à sa densité effective.

En 1959, SUEOKA (61), SUEOKA et coll. (62) ainsi que ROLFE et MESELSON (55) bénéficiant de l'expérience de MESELSON et coll., ont mis en évidence la variation de la densité de l'ADN en fonction du contenu en G + C. Ils ont pu établir une relation linéaire entre la densité ρ et le contenu en G + C (55).

$$\rho_{25^{\circ} \text{ C}} = 1,658 + 0,100 (\text{GC}) \text{ g cm}^{-3}$$

Une variation de 1,0 % du contenu en G + C entraîne un changement de densité de 0,00103 unités (55).

En 1962, SCHILDKRAUT et coll. (56), se basant sur la densité de flottaison de l'ADN de Escherichia coli ($\rho = 1,710 \text{ g.cm}^{-3}$), non seulement confirment la relation précédente mais établissent également une autre relation :

$$\rho = 1,660 + 0,098 (GC)$$

où ρ = densité de flottaison
(GC) = fraction molaire de (G + C)

Ceci indique que la densité de flottaison d'un ADN dans un gradient de CsCl est directement proportionnelle au contenu en G + C.

Cette technique présente l'avantage de n'utiliser que 1 μg d'ADN dont la purification n'est pas nécessaire. Elle permet également de voir l'hétérogénéité de la composition en bases, la distribution uni ou bimodale, et de connaître le poids moléculaire de l'ADN.

Lorsqu'on chauffe progressivement une solution d'ADN, la densité optique croît légèrement ; c'est ce qu'on appelle l'effet hyperchromique. Le T_m ou Température moyenne de transition, correspond à la moitié de l'augmentation de l'absorption relative et représente la température pour laquelle 50 % de l'ADN est dénaturé.

La valeur du T_m dépend du contenu en G + C de la molécule d'ADN. Plus le contenu en G + C est élevé, plus le T_m est élevé.

MARMUR et DOTY, en 1962 (46), se basant sur la relation linéaire qui existe entre la composition en bases de l'ADN et la température de dénaturation, ont établi que, pour un solvant donné

dont la concentration en ions Na^+ est 0,2 M :

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\text{GC})$$

Pour eux, la mesure du T_m est un moyen pratique pour déterminer la composition en bases d'un ADN. On peut le mesurer en portant sur un graphique la densité optique (lue à 260 nm) en fonction de la température à laquelle on soumet l'ADN ; 10 à 50 μg d'ADN sont nécessaires.

Le T_m dépend également de plusieurs facteurs tels que la force ionique du solvant (43), la nature des ions (21), le pH (47).

DE LEY, en 1967 (19) utilise la méthode rapide de FREDERICQ et coll. (23) basée sur le rapport des absorbances à 260 et 280 nm d'un ADN repris dans de l'acide acétique 0,1 N. Il constate que cette méthode n'est valable que pour des souches dont la teneur en G + C est comprise entre 40 et 70 %. Elle ne permet pas de distinguer deux genres bactériens dont les valeurs du % GC sont proches.

En 1970, il (20) propose la formule suivante :

$$\% \text{GC} = 2,44 (T_m - 69,4)$$

pour laquelle le T_m ne semble pas être affecté par le remplacement de la cytosine par hydroxyméthylcytosine. Cette équation est également valable pour les ADN non bactériens.

III - L'INFECTION VIRALE

Les bactériophages (virus des bactéries) sont constitués d'un acide nucléique porteur de l'information génétique (ARN ou ADN) entouré d'une enveloppe protéique ou capsidie ayant une forme géométrique bien définie. Cette capsidie est constituée d'un assemblage

de sous-unités morphologiquement identiques ou capsomères, celles-ci pouvant être elles-mêmes composées d'un certain nombre d'unités plus petites. C'est à BRADLEY (11) que l'on doit l'un des articles les plus complets sur la classification des phages.

En effet, par l'observation au microscope électronique, il a pu classer les phages de nombreuses espèces bactériennes en 6 groupes morphologiques :

Le premier groupe, **groupe A**, est constitué de phages à tête hexagonale, à queue contractile, avec ou sans fibres caudales.

Le **groupe B** comprend des phages à tête hexagonale mais à longue queue non contractile.

Le **groupe C** comprend des phages à courte queue non contractile.

Le **groupe D** comprend des phages sans queue mais à grands capsomères.

Le **groupe E** est formé de phages sans queue, petits capsomères.

Le **groupe F** comprend des phages en forme de filament allongé.

La FIGURE 3 illustre les 6 groupes morphologiques de BRADLEY.

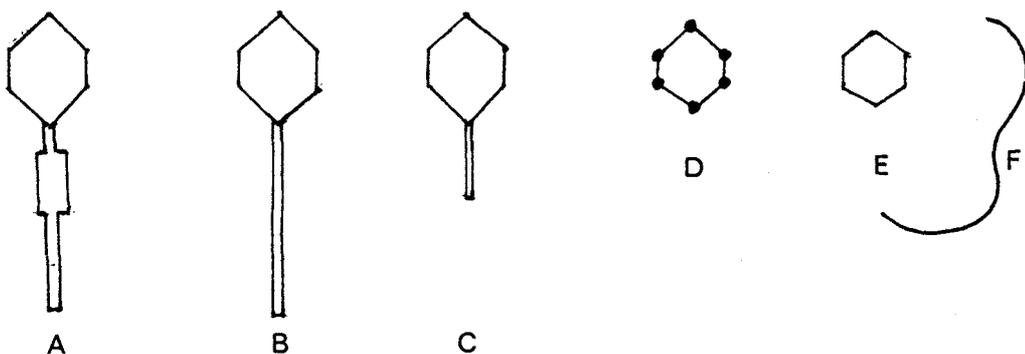
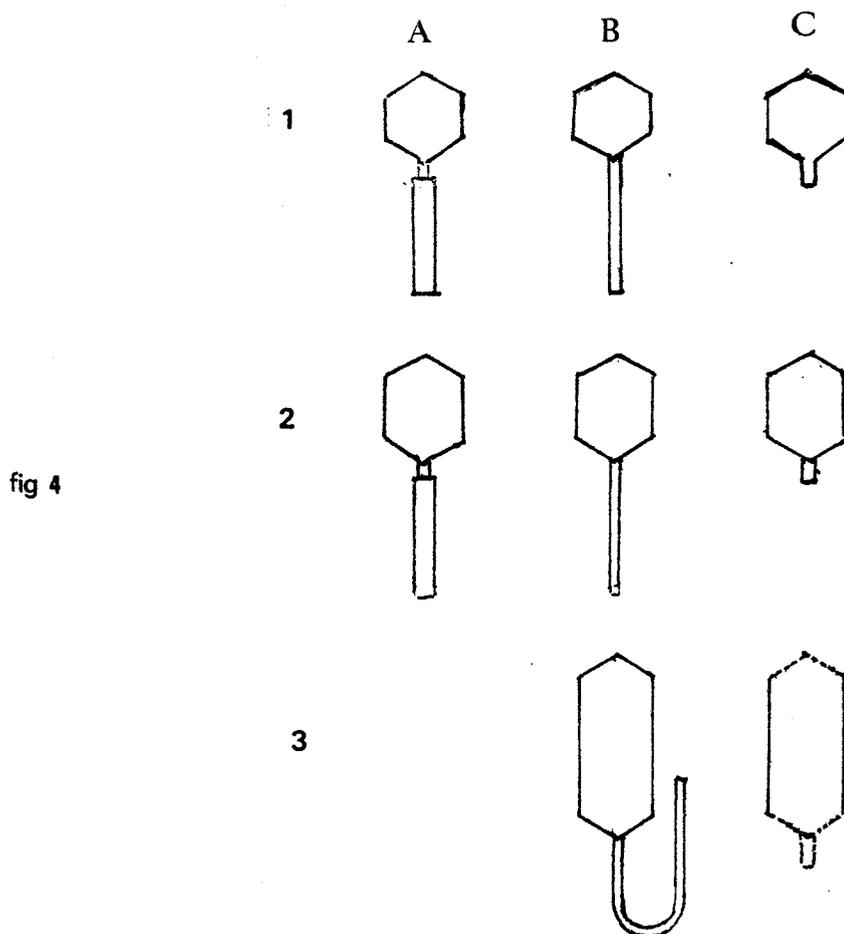


fig 3 Les six groupes morphologiques de BRADLEY

Cependant, BRADLEY lui-même ne considère pas ce schéma comme une classification définitive.

ACKERMANN en 1969 (2), en gardant les termes de BRADLEY, subdivise A, B et C comme indiqué dans la FIGURE suivante (fig 4)



ACKERMANN, en 1978 (3) a classé les quelques phages d' Agrobacterium et de Rhizobium d'après leurs propriétés morphologiques et sérologiques et d'après quelques caractéristiques physicochimiques de leur acide nucléique.

L'infection phagique d'une bactérie sensible se fait en plusieurs étapes :

- adsorption du phage sur la paroi bactérienne au niveau des récepteurs pariétaux (lipopolysaccharides chez les bactéries gram négatif, complexe acide teichoïque - peptidoglycane chez les bactéries gram positif) ou sur les appendices des bactéries tels que les pili.
- pénétration de l'acide nucléique viral dans la bactérie après contraction de la gaine caudale. Cette pénétration est facilitée par la lyse de la paroi bactérienne par une enzyme : le lysozyme.
- multiplication phagique intracellulaire.

Cette multiplication s'opère différemment chez un bactériophage à ARN ou à ADN.

Dans le cas des phages à ADN, toute l'information contenue dans l'acide nucléique n'est pas transcrite d'un seul coup, mais se fait :

- selon un programme précoce qui comprend le blocage de l'activité métabolique de la cellule sensible, la synthèse d'enzymes qui accélèrent la fourniture des précurseurs de l'ADN viral puis la synthèse de l'ADN polymérase qui répliquera l'ADN viral.

- ensuite, un programme tardif qui comprend, après la replication de l'ADN viral, la synthèse de toutes les protéines structurales nécessaires à la formation des virions infectieux.

Dans le cas des phages à ARN, cet ARN joue le rôle d'ARN messager pour la synthèse des protéines virales, de matrice pour la synthèse d'ARN complémentaire, lui-même servant à son tour de matrice pour la synthèse d'autres chaînes d'ARN viral (replication).

Dans les deux cas, la multiplication phagique intracellulaire aboutit à une lyse bactérienne avec libération de particules prêtes à infecter de nouveau. Les phages se comportant ainsi sont dit virulents.

Cependant, lors de l'infection des bactéries par des phages, certaines d'entre elles ne sont pas lysées. Dans ce cas l'acide nucléique phagique peut s'insérer dans le chromosome bactérien en s'y fixant sur des sites spécifiques. La bactérie intègre ainsi le génôme viral dans son chromosome. Elle est alors capable de le repliquer de façon synchrone avec son propre génôme.

Un acide nucléique viral ainsi intégré est appelé prophage et la bactérie est dite lysogène. Celle-ci peut libérer son prophage spontanément (à faible fréquence) ou par induction (avec des fréquences nettement supérieures). Il donne alors naissance à un phage appelé phage tempéré.

L'acide nucléique viral, après pénétration dans la cellule sensible peut également être dilué au cours des divisions successives de la bactérie hôte ; tel est le cas d'un phage tempéré infectant une bactérie lysogène portant soit le même phage, soit un phage apparenté.

Enfin, il peut être soumis à l'action des enzymes de restriction de la bactérie hôte.

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces enzymes, un rappel sur le phénomène de la restriction-modification (R-M) chez une bactérie, est nécessaire.

IV - RESTRICTION MODIFICATION (R-M)

1) Définition du phénomène

Ce phénomène, connu depuis assez longtemps, a été décrit en 1962 par ARBER et DUSSOIX (5) lorsqu'ils ont étudié les bases moléculaires de la modification du bactériophage λ par la bactérie sensible. Ils ont pu démontrer que l'ADN du phage est marqué spécifiquement par la souche hôte au cours de la multiplication phagique.

Ainsi, une souche donnée A ne peut être infectée à une fréquence maximale que par un phage $\overline{\Phi}A$ dont l'ADN a été modifié au cours de sa multiplication antérieure sur la même souche.

Si on se sert de ce phage $\overline{\Phi}A$ pour infecter une souche B, celle-ci va restreindre son développement. Les quelques phages qui auront échappé à cette restriction (fréquence très faible, de l'ordre de 10^{-4} , 10^{-5}) vont se multiplier en donnant des clones modifiés par la souche B. Ces clones, cultivés de nouveau sur la souche A vont se multiplier à une faible fréquence car la souche indicatrice ne reconnaît plus son phage qui a été modifié. Par contre, cultivés sur la souche B, ces clones se multiplieront à une fréquence maximale.

Ceci peut être schématisé ainsi :

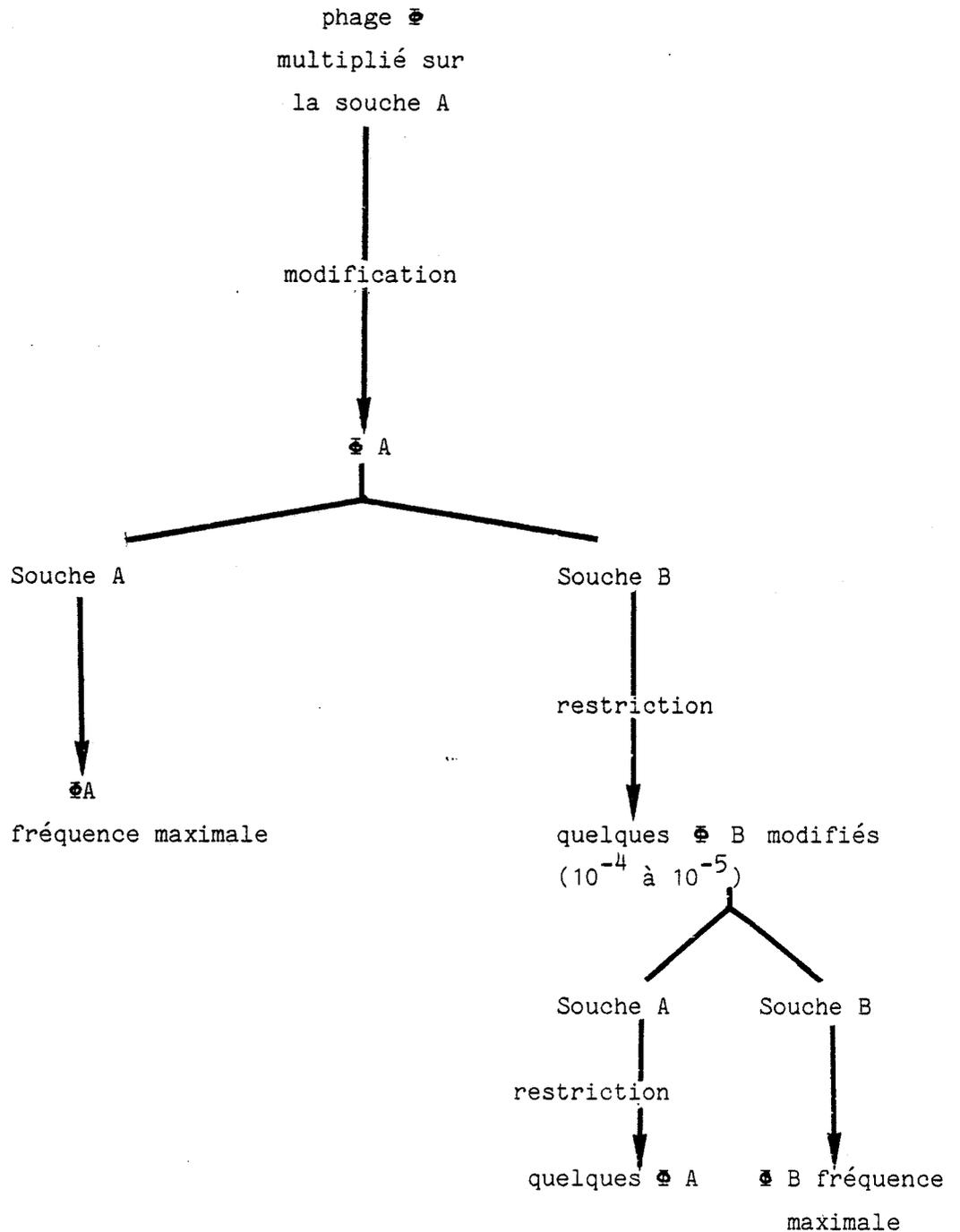


Fig. 5 : Schéma du phénomène de la Restriction - Modification.

Il a été démontré que le système R-M est codé par des gènes situés soit sur le chromosome bactérien, soit sur des éléments extrachromosomiques tels que les plasmides ou le phage P_1 . Les souches de E. coli K12 et B ont été les mieux étudiées en ce qui concerne ce phénomène.

En effet, ces souches portent sur leur chromosome, le gène codant pour l'activité du système R-M. Les souches mutantes, telles que E. coli C ne possèdent pas le système (elles sont notées $r^- m^-$) d'autres sont déficientes soit pour R, soit pour M. D'autre part, E. coli C (P_1) possède un système R-M grâce à la présence du phage P_1 , elle devient donc $r^+ m^+$.

Le TABLEAU 1, d'après HOFNUNG (31) illustre de façon quantitative ce phénomène.

E. coli	C	B	K	C (P_1)	K (P_1)
C	1	10^{-4}	$4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-7}
λB	1	1	$4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-7}
λK	1	10^{-4}	1	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
$\lambda C(P_1)$	1	10^{-4}	$4 \cdot 10^{-4}$	1	$4 \cdot 10^{-4}$
$\lambda K(P_1)$	1	10^{-4}	1	1	1

TABLEAU 1 : Efficacité d'étalement de λ sur différentes souches suivant la souche sur laquelle le précédent cycle de croissance a eu lieu. Les plages obtenues sur la souche restrictive contiennent en général des phages ayant subi la modification correspondante. Notons que l'efficacité d'étalement (ou e.o.p = efficiency of plating) correspond au rapport :

Nombre de phages obtenus par dénombrement sur une souche indicatrice
 Nombre de phages obtenus par détermination physique du nombre de particules

D'après ce TABLEAU, nous constatons qu'un ADN portant la modification d'un système donné est restreint par un autre système comme s'il ne porte aucune modification. Par exemple, l'ADN du phage λ modifié par la souche K (λ K) est restreint par le système de la souche B, l'e.o.p étant égale à 10^{-4} .

D'autre part, un ADN modifié par la souche K peut également l'être par le phage P_1 . Il porte donc la modification de K et de P_1 et est insensible à l'un ou à l'autre, et même aux deux systèmes de restriction à la fois.

2) Mécanisme d'action du système R-M

Les enzymes de restriction d'une bactérie coupent en petits morceaux les molécules bicaténaires d'ADN étrangères à la cellule. Cette coupure a lieu en des endroits, appelés sites, spécifiques pour chaque enzyme, et constitués par des séquences nucléotidiques uniques, en général symétriques, longues de 4 à 6 bases.

Ce processus de coupure est appelé restriction.

La bactérie doit protéger son propre ADN contre l'action de ses enzymes de restriction en méthylant certaines bases de la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme : ce processus est appelé modification.

Ainsi, à chaque enzyme de restriction correspond une méthylase qui reconnaît la même séquence nucléotidique (6).

Les méthylases, responsables donc de la modification, transfèrent les groupements méthyl de la S-adénosyl méthionine à deux adénines d'une paire de bases contigües ou très proches situées sur chaque brin de l'ADN. Les séquences de bases sur les deux brins entre les adénines méthylées sont symétriques par rapport à un axe central.

La méthylation aboutit également à la formation de 2 résidus de 5 méthylcytosine (5-MC) ou 6 méthyl amino purine (6-MAP) par site et selon le système.

On connaît actuellement 3 types de systèmes R-M :

- * le **type I** que l'on trouve chez E. coli K, B et A ;
- * le **type II** que l'on trouve dans certaines souches porteuses du facteur R (notamment R_I et R_{II}) ;
- * le **type III** qui dépend du phage P₁.

Un autre type de système R-M a été découvert, il s'agit de celui d'Haemophilus dont la méthylase n'a pas encore pu être mise en évidence mais dont l'endonucléase est bien connue.

Enfin, il existerait un système R-M s'exerçant sur les phages T-pairs. Dans ce cas, la modification n'est pas due à une méthylation mais à une glucosylation des molécules d'hydroxyméthylcytosine de l'ADN phagique. La restriction serait alors due à des nucléases membranaires (31).

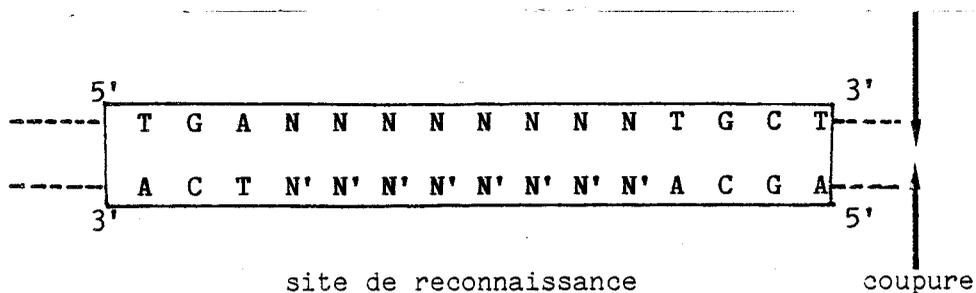
3) Les endonucléases de restriction ou les enzymes de restriction

En général, elles n'agissent ni sur un ADN monocaténaire, ni sur un ADN bicaténaire dont une chaîne a été modifiée.

La coupure des deux brins d'ADN a lieu en deux étapes. Après la coupure d'un brin, le complexe ADN-enzyme se défait puis il se forme un autre complexe. Enfin, selon le type d'enzyme, la coupure peut avoir lieu soit sur le site actif même de reconnaissance, soit quelques bases plus loin.

Les enzymes du type I nécessitent la présence de cofacteurs tels que les ions Mg^{++} , la SAM (S-adenosyl méthionine) qui jouerait un rôle d'effecteur dans la réaction, de l'ATP qui, lors de son hydrolyse en $ADP + P_i$ libérerait assez d'énergie pour permettre à l'enzyme de se déplacer et découper à une distance variable du site de reconnaissance. Les coupures par ces enzymes se font généralement au hasard.

L'endonucléase Eco B (provenant d'Escherichia coli B) fait partie des enzymes du type I.



N = nucléotide non spécifique

N' = nucléotide apparié à N A — T
G — C

Dans le cas des enzymes du type III, la présence d'ATP et de Mg^{++} est nécessaire. Elles peuvent couper soit dans le site de reconnaissance, soit à l'extérieur, mais les extrémités issues des coupures ne sont spécifiques que d'un site donné.

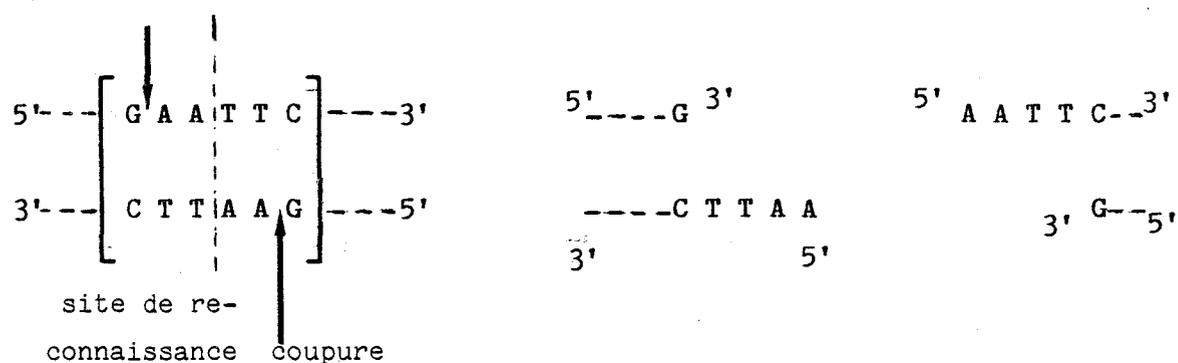
Les enzymes du type II sont les mieux connues. Elles sont de structure plus simple (Eco RI est composée de 2 sous-unités identiques) et n'ont besoin que de Mg^{++} pour leur activité.

Elles coupent l'ADN au niveau ou très près du site de reconnaissance. Celui-ci, constitué de 4 à 6 nucléotides possède un axe de symétrie.

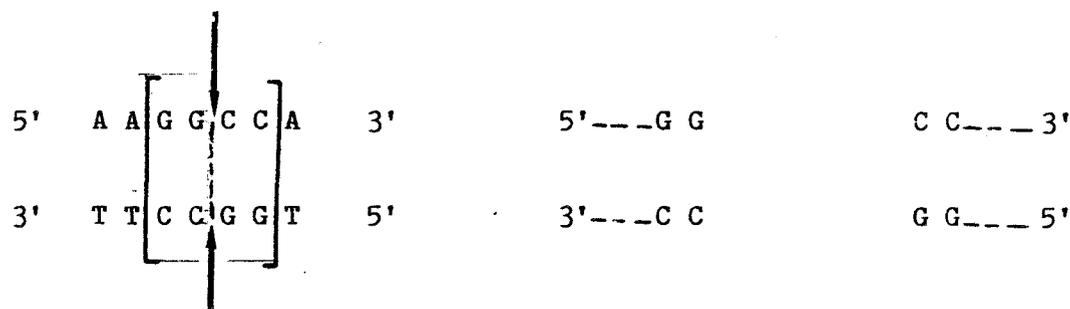
Le mode de coupure peut engendrer soit des bouts francs (coupure au même niveau), soit des bouts cohésifs (coupures décalées de quelques paires de bases dans les deux brins de l'ADN). Dans ce dernier cas, les extrémités monocaténaire engendrées (en 5' ou en 3') sont complémentaires ; ainsi, toutes molécules d'ADN contenant de tels sites peuvent s'unir entre elles et former de nouvelles molécules hybrides.

La FIGURE 6 illustre le mode de coupure par 2 enzymes du type II.

1) Eco RI donne des fragments à bouts cohésifs qui peuvent s'apparier avec tous fragments coupés par la même enzyme.

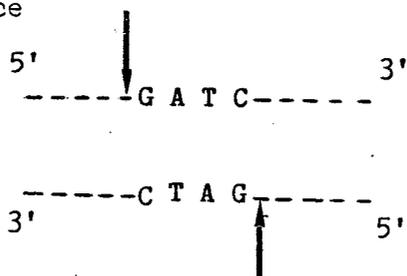


2) Hae III donne des fragments à bouts francs par coupure au niveau de l'axe de symétrie.

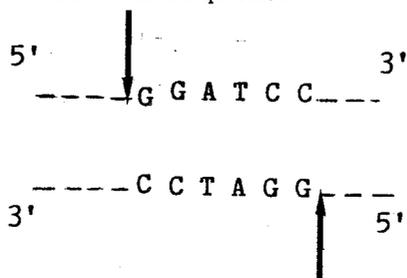


En général, une enzyme de restriction reconnaît une séquence nucléotidique déterminée. Toutefois plusieurs enzymes d'origines différentes peuvent avoir pour cible la même séquence ; elles sont dites isoschizomères. Nous citerons comme exemple les enzymes Eca I isolée d'Enterobacter cloacae et Bst EII isolée de Bacillus stearothermophilus ET. Elles reconnaissent toutes deux la séquence
 $G \downarrow G T N A C C$.

Dans certains cas, la séquence tétranucléotidique d'une enzyme fait partie du site hexanucléotidique d'une autre enzyme. Ainsi les enzymes Mbo I et Sau 3A coupent toutes deux l'ADN au niveau de la séquence



alors que Bam HI reconnaît la séquence



Des fragments produits par digestion complète ou partielle d'un ADN, par l'enzyme MboI et Sau 3A peuvent ainsi être clonés ou sous-clonés dans un ADN vecteur (exemple du phage λ) qui a été coupé par Bam HI.

Ces quelques généralités sur les enzymes de restriction nous montrent leur importance considérable. En effet, elles permettent la conversion de molécules circulaires en des segments linéaires aux extrémités bien définies, l'obtention de fragments d'ADN assez courts pour pouvoir en déterminer la séquence nucléotidique et surtout la fabrication de molécules d'ADN hybrides entre acides nucléiques d'origines diverses.

MATERIEL ET METHODES

I - SOUCHES BACTERIENNES ET BACTERIOPHAGES

Nous avons utilisé les souches de Rhizobium meliloti de la collection du laboratoire, en particulier M₉S - M₁₁S - M₁₂S - M₁₃S - M₁₄S - M₁₈S. Ces souches sont conservées au congélateur en milieu RC (voir sa composition plus loin) fructosé à 1 p. 100 et glycérolé à 20 p. 100.

Les bactériophages utilisés ont été isolés de la terre par D. KRSMANOVIC-SIMIC et M. WERQUIN (37). Ils sont conservés en milieu RC fructosé à 1 p. 100, à + 4° C ou à - 20° C en milieu RC fructosé glycérolé à 50 p. 100.

Le TABLEAU 2 nous donne la liste des bactériophages utilisés dans ce travail ainsi que leurs souches sensibles respectives.

Bactériophages	Souches indicatrices
Φ ₁	M ₉ S ₉
Φ ₂	M ₉ S ₉
Φ ₃	M ₉ S ₉
Φ _{L9}	M ₉ S ₉
Φ ₄	M ₁₁ S ₁₁
Φ _{5t}	M ₁₁ S ₁₁
Φ ₆	M ₁₁ S ₁₁
Φ ₂₀	M ₁₂ S ₁₂
Φ ₁₃	M ₁₄ S ₁₄
Φ ₁₆	M ₁₈ S ₁₈

TABLEAU 2 : Les différents bactériophages étudiés et leurs souches bactériennes hôtes.

La souche M₁₁S étant lysogène (28) nous avons cultivé les phages Φ_4 , Φ_{5t} , Φ_6 sur la souche M₁₃S non lysogène également sensible à ces phages.

II - MILIEUX DE CULTURE

1) Milieu Rhizobium complexe (RC) (18)

K ₂ H PO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2 g
Extrait de levure (Difco).....	1 g
Eau distillée qsp.....	1 l

Le pH est ajusté à 7,2 - 7,5.

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121° C pendant 20 min.

2) Milieu RC gélosé

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

3) Source de carbone

Une solution aqueuse de fructose est préparée à la concentration de 40 p. 100 et est utilisée à une concentration finale de 1 p. 100. Elle est stérilisée par autoclavage à 105° C pendant 30 min.

4) Milieu gélosé pour bactériophages

Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O.....	0,45 g
SO ₄ Na ₂ , 10 H ₂ O.....	0,06 g
KNO ₃	0,06 g
FeCl ₃	0,01 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O.....	0,06 g
Mg Cl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,10 g
Mannitol.....	10 g
Agar (Difco).....	7,5 g
Eau distillée qsp.....	1 1

Ce milieu, dont le pH est ajusté à pH = 7, est autoclavé à 105° pendant 30 min.

5) Utilisation de CaCl₂ et MgCl₂

Les travaux de WERQUIN et BEN BRAHIM (66) ont montré que les ions Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ sont indispensables pour l'adsorption des phages sur les bactéries hôtes, en milieu liquide. Nous avons donc ajouté dans nos milieux de production de phages du Ca Cl₂ et du Mg'Cl₂ aux concentrations finales respectives de 4.10⁻⁴ et 5.10⁻⁴ M.

III - OBTENTION DE CULTURES BACTERIENNES

Les tubes contenant les souches bactériennes sont décongelées à température ambiante. Dans un tube 20 x 220, on ensemence 5 ml de RC fructosé à l'aide de 0,5 ml de la culture glycérolée. On met ensuite le tube en agitation à 30° C pendant 15 à 18 heures.

IV - PRODUCTION DE BACTERIOPHAGES

Le phage est reproduit sur sa souche bactérienne hôte pour pouvoir être conservé et étudié. Cette multiplication peut se faire :

1) Sur milieu gélosé

On utilise la technique dite de la "double couche" d'ADAMS (1). Les préparations phagiques conservées à + 4° C sont diluées au 1/10, celles gardées à - 20° C ne le sont pas.

A 0,1 ml de la suspension phagique, on ajoute 0,3 ml d'une culture de la bactérie sensible en phase exponentielle de croissance. Le mélange est laissé 20 min. à la température du laboratoire de façon à permettre une adsorption maximale des phages sur les bactéries. On ajoute ensuite 3 ml de gélose bactériophage fondue et maintenue à 45° C puis on coule le tout à la surface de boîtes de Pétri contenant du milieu RC gélosé fructosé à 1 p. 100. On incube les boîtes à 25° C pendant une nuit.

Une boîte témoin sans phage est préparée dans les mêmes conditions. Sur cette boîte apparaîtra un tapis bactérien uniforme au bout de 15-18 heures d'incubation.

Les boîtes contenant la suspension phagique présenteront soit quelques plages de lyse (lyse incomplète) soit une lyse totale des bactéries.

A l'aide d'un étaleur stérile, on gratte la couche superficielle de gélose que l'on met dans un tube à centrifuger (5 à 6 boîtes par tube). On ajoute dans chaque tube du RC fructosé à 1 p. 100 (à raison d'environ 1,5 ml de RC fructosé par boîte), on brasse le tout et on laisse à la température ambiante pendant 20 à 30 min.

On centrifuge ensuite à 10 000 t/min. pendant 15 min.. On récupère le surnageant qui contient les phages et on le filtre sur membrane Millipore de porosité 0,45 μ ou 0,22 μ pour éliminer tous les débris bactériens. La suspension filtrée est dosée et conservée au réfrigérateur à + 4° C ou au congélateur à - 20° C.

2) En milieu liquide

Dans un tube cotonné 20/220, un volume de 3 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance est

infectée par les phages prélevés, à l'aide d'une anse de platine, d'une plaque de lyse obtenue sur milieu solide. Au bout d'un temps plus ou moins long, on observe la lyse de la culture par la baisse de la densité optique lue à 600 nm.

La suspension est ensuite traitée comme précédemment.

Grâce à ces deux techniques, on obtient couramment des suspensions phagiques titrant 10^8 à 10^9 particules/ml.

Toutefois, la multiplication en milieu liquide présente quelques inconvénients car des bactéries mutantes résistantes au phage peuvent se développer facilement. En agissant sur plusieurs paramètres tels que l'agitation, l'aération, M. WERQUIN et coll. (67) ont pu exploiter cette technique de lyse en milieu liquide et mettre au point une technique de production massive de bactériophages en fermenteur.

Dans cette technique, 3 litres de culture bactérienne sont mis au contact avec 150 à 200 ml de suspension de phages titrant environ 10^9 particules/ml. Après 20 min. d'adsorption (arrêt de l'agitation et de l'aération), la lyse bactérienne est appréciée par la lecture de la densité optique à 600 nm et par les variations du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu de culture (lecture directe sur enregistreur).

Cette technique permet non seulement d'obtenir une grande quantité de particules phagiques (10^{12} à 10^{13}) mais également, grâce à l'analyse des graphiques représentant l'évolution du pourcentage d'oxygène dissous, d'observer une éventuelle parenté entre eux.

V - DENOMBREMENT DES PHAGES

Grâce à la technique d'ADAMS (1), on peut doser très précisément, c'est-à-dire déterminer le nombre de particules phagiques infectieuses dans une suspension. Pour cela, on soumet la suspension à une série de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-9}). A 0,1 ml des dilutions choisies, on ajoute 0,3 ml de bactériessensibles en phase exponentielle de croissance. Après 20 min. d'adsorption, on ajoute 3 ml de gélose bactériophage et on coule le tout sur des boîtes de Petri contenant du RC gélosé fructosé. Les boîtes sont incubées 1 nuit à 25° C. La bactérie, en se multipliant, forme un tapis parsemé de zones claires ou plages de lyse. En effet, une bactérie infectée libère des phages qui vont à leur tour infecter les bactéries voisines et ainsi de suite.

Chaque plage de lyse est le reflet de la présence d'un phage infectieux ; on peut déterminer le titre de la suspension phagique considérée en multipliant le nombre de plages de lyse par le facteur de dilution.

Ce titre est ramené en nombre de particules phagiques infectieuses par millilitre encore appelé "unités formant plages" (u.f.p.).

VI - CONCENTRATION DES SUSPENSIONS PHAGIQUES

Les trois litres de suspension phagique obtenus en fermenteur vont être concentrés grâce à la technique de YAMAMOTO (69) basée sur le fait qu'en présence de chlorure de sodium, les phages peuvent se fixer sur les particules de polyéthylène glycol en formant un complexe qui précipite.

Cette concentration se fait en plusieurs étapes :

- 1) Le lysat du fermenteur est laissé une nuit à + 4° C.
- 2) Centrifugation à 12 000 g pendant 15 min. afin d'éliminer les débris bactériens.
- 3) L'ADN et l'ARN bactériens libres sont digérés par addition de DNase et de RNase à raison de 1 à 10 µg de chaque par ml de lysat. La digestion se fait à 37° C pendant 1 heure.
- 4) Centrifugation à 12 000 g pendant 15 min.
- 5) On maintient le surnageant à une certaine force ionique en ajoutant du chlorure de sodium à une concentration finale de 0,5 M puis on le laisse une nuit à + 4° C.
- 6) Centrifugation à 12 000 g pendant 15 min.
- 7) Au surnageant, on ajoute du PEG 6 000 à une concentration de 8 à 10 p. 100 puis on laisse le complexe PEG-phage se former puis précipiter dans une ampoule à décanter, à + 4° C pendant quelques jours.
- 8) Centrifugation du précipité à faible vitesse : 2 000 g pendant 15 min. On élimine le surnageant.
- 9) Le culot est dissous dans du tampon pour bactériophage (composition plus loin) en le laissant quelques minutes afin que le complexe PEG-phage se dissocie.
- 10) Centrifugation à 12 000 g pendant 15 min. Le culot est éliminé.
- 11) Le surnageant est centrifugé à 78 000 g pendant 90 min. (34 000 t. min.⁻¹, rotor 60 Ti).
- 12) Le culot contenant les phages est dissous dans 14 ml de tampon pour bactériophages.
- 13) Addition d'environ 9,3 g de chlorure de césium (Cs Cl) pour avoir un indice de réfraction de 1,379 mesuré à 25° C sur un réfractomètre d'Abb. Centrifugation de la solution à 100 000 g pendant 16 à 20 heures (33 000 t. min.⁻¹, rotor SW 50.1).
- 14) Les bactériophages vont se concentrer, en formant une bande visible dans la zone du gradient qui correspond à leur

densité. Cette bande est récupérée par ponction du tube par le fond. Elle est ensuite dialysée pendant 48 heures à + 4° C contre du tampon phosphate dilué au 1/10e afin d'éliminer au maximum le chlorure de cesium.

15) La suspension phagique concentrée ainsi obtenue est dosée et conservée au congélateur.

Les tampons utilisés pour la concentration du lysat sont les suivants :

a) Tampon pour bactériophages : mis au point par MANNASSE (45)

Na ₂ HPO ₄	1,42 g
Na H ₂ PO ₄	1,2 g
Mg SO ₄	2,47 g
Eau distillée qsp	1 1

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

b) Tampon phosphate pour dialyse : mise au point par WEBER et OSBORN (65)

Na ₂ HPO ₄	24,52 g
Na H ₂ PO ₄	7,01 g
Eau distillée qsp.....	1 1

Le pH est ajusté à 7,0.

Lorsque les phages ont été concentrés puis purifiés sur CsCl, une fraction de la suspension est diluée et la densité optique mesurée à 260 nm. D'autre part, une série de dilutions décimales est effectuée dans le but de doser la suspension, par la technique d'ADAMS (1).

Avec les valeurs obtenues, nous pouvons calculer le rapport $\frac{A_{260}}{\text{titre}}$, rapport qui témoigne de la qualité de la purification.

En effet, plus ce rapport est faible, plus le degré de pureté est élevé.

VII - L'ADN PHAGIQUE

1) Extraction de l'ADN

Plusieurs techniques d'extraction ont été utilisées.

a) Méthode d'extraction rapide de l'ADN

Un stock de phages est préparé soit sur un milieu solide, soit en milieu liquide, de façon à avoir environ 10^9 p . f . u / m l . Dans un tube Eppendorf, à 0,4 ml de lysat, on ajoute successivement :

- . 1 μ l de diéthoxydiformate (ou diéthylpyrocarbonate) à température ambiante,

- . 10 μ l de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à 10 %. Ce tube est agité, et

- . 50 μ l d'un mélange de Tris 2M, Na₂ EDTA 0,2 M pH 8,5 sont ajoutés.

Le tout est alors mis à 70° C pendant 5 min.

On porte ensuite 50 μ l d'acétate de potassium 5 M et le tube est refroidi à 0° C pendant au moins 30 min. Une centrifugation de 15 min. est effectuée, puis le surnageant est récupéré.

A ce surnageant, on rajoute de l'éthanol à température ambiante, puis une deuxième centrifugation est effectuée, à l'issue de laquelle le culot est dissous dans un volume de 50 μ l d'un tampon composé de Tris 10 mM, Na₂ EDTA 1 mM et de RNase A 10 μ g/ml, pH 7,5.

5 μ l de ce mélange suffisent généralement pour une digestion par les enzymes de restriction.

b) Utilisation du perchlorure de sodium Na ClO₄ (24)

30 ml d'un lysat de phages sont mis dans des tubes à centrifuger. On dépose délicatement 1 ml de Na ClO₄ 5M dans le fond du tube puis on place à la surface 0,5 ml de saccharose à 30 p. 100.

Les tubes sont centrifugés 90 min. à 24 000 t. min.⁻¹ avec le rotor SW 25, temps suffisant pour obtenir un culot.

Lorsque le phage descend dans la couche de perchlorate dont la densité est élevée, il éclate, libérant son ADN. Les débris bactériens et les protéines n'y pénètrent pas.

Cet ADN peut alors être récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur. S'il contient des traces de cristaux de perchlorure de sodium ou des débris bactériens, ceux-ci peuvent être éliminés après dilution de la solution d'ADN et centrifugation à faible vitesse.

c) Extraction au phénol

Le phénol présente l'avantage d'être à la fois inhibiteur des nucléases et fortement déprotéinisant. Mais des traces de résidus phénoliques dans la solution d'ADN extraite peuvent perturber certaines propriétés de l'ADN (interférer dans l'analyse spectrale, provoquer une dénaturation partielle de la molécule, etc...). Il est donc nécessaire d'éliminer ensuite le phénol.

L'une des techniques d'extraction de l'ADN par le phénol que nous avons utilisée est due à A. BEGUE (technique non publiée) à laquelle nous avons apporté quelques modifications.

A la suspension phagique purifiée, on ajoute une solution de protéinase K à une concentration finale de 200 µg/ml. Après 5 à 10 min. de réaction, on ajoute une solution de sarcosinate de sodium (concentration finale 0,5 p. 100), on laisse en contact pendant 3 heures à une nuit à 37° C.

Le volume de la suspension est ramené à 2,5 ml avec du tampon, puis deux extractions, l'une de 10 min., l'autre de 5 min. sont effectuées. Pour cela, on ajoute à la solution précédente le même volume de phénol saturé en tampon STE.

Ce tampon STE a pour composition :

Na Cl	100 mM
Tris (hydroxymethyl) - aminomethane....	20 mM
Titriplex II (EDTA).....	1 mM

Le pH de ce tampon est ajusté à 7,4.

Pour réaliser la solution de phénol saturée en STE, on utilise

1 kg de phénol

400 ml de tampon STE

35 ml NaOH 3 N

0,1 p. 100 8-hydroxyquinoléine

30 mM β -mercaptoéthanol

Le mélange phage/phénol (v/v) est agité doucement pendant 10 min. (première extraction), refroidi à 0° C pour arrêter la réaction puis centrifugé à 2 000 g pendant 10 min. La phase aqueuse (supérieure) étant recueillie, on procède à la deuxième extraction pendant 5 min.

Après l'extraction proprement dite, une série d'opérations est effectuée afin d'obtenir une solution d'ADN pur.

- Addition d'un même volume d'éther qu'on laisse s'évaporer pour éliminer le phénol ;
- 6 dialyses pendant 3 à 4 heures à température ambiante, contre 3 000 ml de tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM ;
- Précipitation de l'ADN en ajoutant à la solution 1/9 du volume en acétate de sodium 3M pH 8 puis 2 fois le volume en éthanol à 95° C. ;
- Porter le tout à - 20° C pendant une nuit ;
- Centrifugation à 10 000 t.min.⁻¹ pendant 10 min. ;
- Séchage du culot, remise en suspension de l'ADN dans 1,5 à 2 ml de tampon SSC dilué au 1/10 (citrate trisodique 1,5 mM, NaCl 15 mM pH 7,0 ± 0,2) ;
- 8 dialyses rapides à température ambiante contre 4 000 ml de tampon SSC dilué au 1/10e.

L'ADN ainsi extrait est analysé et sa densité optique mesurée à 260 et à 280 nm.

La pureté d'un ADN est vérifiée par le rapport $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ qui doit être compris entre 1,8 et 2.

D'autre part, à $A_{260} = 20$ correspond 1 mg/ml d'ADN.

Cette méthode permet d'obtenir approximativement 45 µg d'ADN à partir de 10^{12} particules phagiques.

2) Méthode utilisée pour déterminer le contenu en bases des ADN phagiques

La connaissance du contenu en bases, en particulier le (G + C)% constitue la première étape de l'analyse d'un ADN. Nous avons utilisé la méthode de SCHILDKRAUT (56) modifiée.

Nous savons que la densité de flottaison d'un ADN dans le chlorure de cesium est directement proportionnelle au contenu en G + C. D'autre part, la mesure de cette densité est facilitée par l'utilisation de la relation linéaire entre l'indice de réfraction (n_D) et la densité ρ (32).

$$\rho_{25^\circ C} = 10,8601 \times n_{D,25^\circ C} - 13,4974$$

D'après SCHILDKRAUT :

$$\rho = 0,098 (GC) + 1,660 \text{ g.cm}^{-3}$$

ou ρ représente la densité de flottaison et GC la fraction molaire de G + C.

Dans un tube de 16 x 160 muni d'un bouchon à vis, on introduit 9 ml de SSC dilué au 1/10e. On y ajoute des quantités équivalentes à :

4 μ l de solution d'ADN de Micrococcus de densité apparente
= 1,731

4 μ l de solution d'ADN poly d (A - T) de densité apparente
= 1,678

4 μ l de solution d'ADN à déterminer

et environ 8 g de Cs Cl.

On agite le tout et on ajuste avec du Cs Cl de façon à avoir une densité finale

$$\rho = 1,704,$$

ce qui correspond à un indice de réfraction

$$n_D = 1,398.$$

On répartit la solution dans deux tubes à centrifuger remplis jusqu'à 2 à 3 mm du bord. On centrifuge à 33 000 t/mn pendant 48-72 heures dans le rotor SW 50.1 (ultracentrifugeuse Beckman L2-65B).

Dans la même expérience, on réalise parallèlement :

- un témoin composé d'une solution aqueuse de CsCl de densité $\rho = 1,704$;
- un autre témoin contenant les deux ADN de référence [Micrococcus et poly d (A - T)] et l'équivalent de 4 δ d'ADN de phage λ dont la densité est égale à 1,709 - 1,710.

A l'issue de la centrifugation, les gradients sont recueillis, fractionnés en temps constant grâce à un fractionneur de gradients ISCO (modèle 185) qui permet également de détecter l'ADN à l'aide d'un absorptiomètre (254 nm).

Les courbes d'absorption (en transmittance) sont directement tracées par un enregistreur ISCO (modèle UA6) couplé au fractionneur de gradients. En traçant la droite qui relie les deux valeurs des densités de référence, on peut déterminer la valeur qui correspond à la densité de l'ADN à étudier. Cela peut se schématiser ainsi.

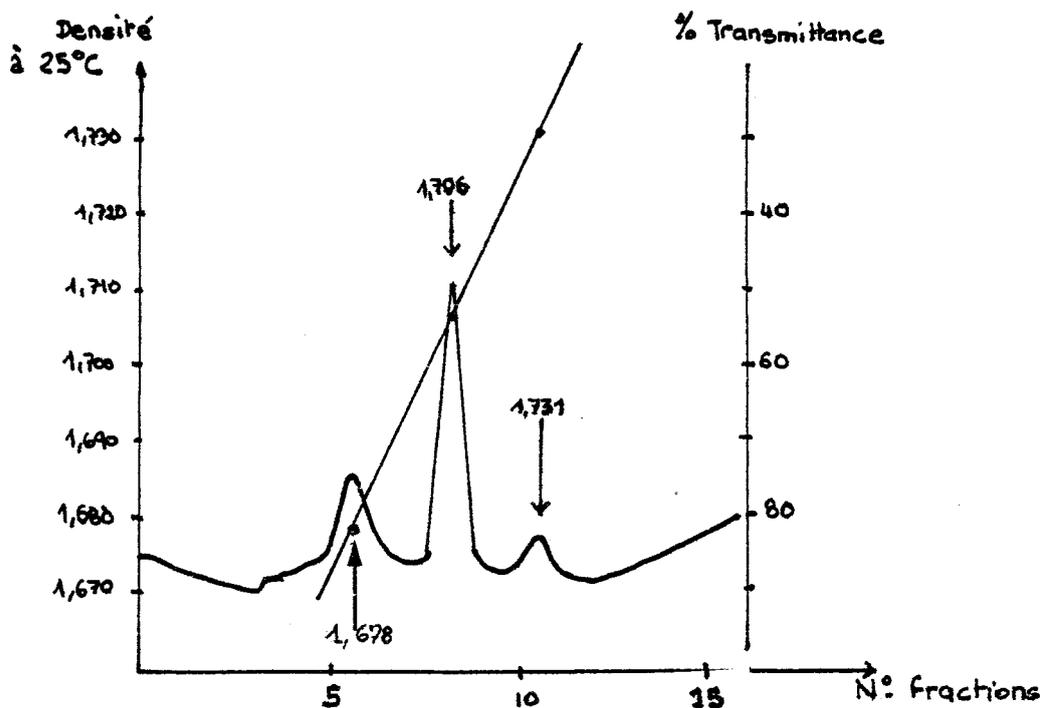


FIGURE 7 : Courbe d'absorption de 3 ADN en fonction de leur densité de flottaison dans le Cs Cl.

Lorsque la densité de l'ADN inconnu a été déterminée, il suffit d'appliquer la formule de SCHILDKRAUT :

$$\rho = 1,660 + 0,098 (GC) \text{ g.cm}^3$$

$$\text{soit } \% GC = \frac{1,660}{0,098} \times 100$$

3) Les enzymes de restriction

Les endonucléases de restriction (du type II) sont commercialisées par Boehringer, Bethesda Research Laboratories. Elles sont conservées au congélateur, à -20°C et ne doivent rester à température ambiante que le temps minimum nécessaire au prélèvement.

Chaque enzyme a besoin de conditions de réaction particulières, les variables les plus importantes étant la température d'incubation et la composition du tampon de réaction ; celles-ci sont spécifiées par le fabricant. Cependant les différences entre les tampons de réaction sont souvent légères, aussi il est plus commode de diviser les enzymes en trois groupes en fonction de la force ionique à laquelle elles agissent. Cette force ionique peut être faible, moyenne ou forte. Ainsi, il suffit de préparer trois sortes de tampons de réaction, généralement concentrés 10 fois et conservés quelques semaines à 4°C , indéfiniment à -20°C .

Force ionique \ mM de	Na Cl	Tris-HCl pH 7,5	MgCl ₂	Dithiothreitol
faible	0	10	10	1
moyenne	50	10	10	1
forte	100	50	10	1

TABLEAU 3 : Composition des tampons de réaction des enzymes de restriction utilisées. D'après MANIATIS et coll. (44).

Les digestions enzymatiques sont réalisées dans des tubes Eppendorf stériles. 0,2 à 1 μg d'ADN sont soumis à 1 unité enzymatique dans un volume final de 10 à 50 μl : une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour la digestion complète de 1 μg d'ADN du phage λ en une heure dans les conditions de température et de tampon recommandées et dans un volume final de 20 à 50 μl .

La quantité d'enzyme utilisée peut être réduite si on augmente le temps de réaction ce qui permet d'obtenir des digestions complètes.

Pour l'établissement de la carte de restriction d'un ADN, les digestions partielles sont également intéressantes.

En général, des concentrations en glycérol supérieures à 5 % (les enzymes sont conservées dans un tampon contenant 50 % de glycérol), ou plus de 10 mM d'EDTA dans le mélange réactionnel, inhibent la réaction enzymatique (l'EDTA chélate les ions Mg^{++}). Ainsi, lors d'une digestion, il faut réduire le volume de réaction au minimum mais en tenant compte de la concentration en ces éléments.

Dans le cas de digestions multiples, celles-ci peuvent être réalisées simultanément si les enzymes réagissent dans le même tampon. Sinon, on fait d'abord agir l'enzyme qui exige une faible force ionique, puis on complète par la quantité de sel suffisante pour l'amener à la force ionique nécessaire à l'action de la deuxième enzyme.

Entre deux digestions, il est possible de précipiter l'ADN. Pour cela, deux volumes d'éthanol à -20°C sont rajoutés au mélange, le tout étant laissé 30 min. à -20°C puis centrifugé. L'ADN ainsi précipité est redissous dans le tampon de réaction de la deuxième enzyme.

Lorsque le volume final de la réaction est trop important et ne peut être introduit totalement dans les alvéoles du gel (pour l'électrophorèse), après avoir arrêté la réaction, on pratique une précipitation de l'ADN que l'on reprend dans un volume au plus égal à celui de l'alvéole.

Le protocole expérimental d'utilisation des enzymes de restriction se déroule comme suit :

- 1) Dans un tube Eppendorf stérile, diluer 0,2 - 1 µg d'ADN dans de l'eau, qsp 18 µl.
- 2) Ajouter 2 µl de tampon de réaction 10 fois concentré , mélanger.
- 3) Faire agir 1 unité enzyme.
- 4) Incuber à la température et pendant le temps recommandé par le fabricant.
- 5) Arrêter la réaction en ajoutant le tampon d'arrêt.
- 6) Analyser directement des fragments de restriction par électrophorèse sur gel d'agarose.

Dans notre travail, nous nous sommes servis des endonucléases suivantes :

Enzyme	Origine	Laboratoire
Hind III	<u>Haemophilus influenzae</u> Rd	Boehringer
Eco RI	<u>Escherichia coli</u> BS 5	Boehringer
Bam HI	<u>Bacillus amyloliquefaciens</u> H	Boehringer
Ava I	<u>Anabaena variabilis</u>	B.R.L.
Pst I	<u>Providencia stuartii</u>	Boehringer
Bgl II	<u>Bacillus globigii</u>	Boehringer
Sma I	<u>Serratia marcescens</u> Sb	Boehringer
Sst II	<u>Streptomyces stanford</u> (65)	B.R.L.
Sal I	<u>Streptomyces albus</u> G	Boehringer
Sac I	<u>Streptomyces achromogenes</u>	Boehringer
Bst EII	<u>Bacillus stearothermophilus</u> ET	Boehringer
Xba	<u>Xanthomonas badrii</u>	Boehringer

TABLEAU 4 : Liste des enzymes de restriction utilisées.

B.R.L. : Bethesda Research Laboratories.

Parallèlement aux enzymes de restriction, nous avons été amenée à utiliser une autre enzyme : la T_4 - DNA ligase isolée d'E. coli infecté par le phage T_4 .

Cette enzyme catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre des extrémités adjacentes 3'—OH et 5'—P d'une molécule d'ADN. Elle peut lier des molécules d'ADN dont les extrémités cohésives sont compatibles et même des molécules d'ADN double brin, à bouts francs. Ceci peut se schématiser ainsi :

Activité	Réaction	Substrats
Soudure des bouts cohésifs	Par exemple : $ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ 5' \dots \text{pA-pC-pG-pA-pA-pT-pC-pT} \dots 3' \\ \\ 3' \dots \text{Tp-Gp-Cp-Tp-Tp-Ap-Gp-Ap} \dots 5' \\ \\ \text{OH} \\ \downarrow \\ \text{ATP} \quad \text{Mg}^{++} \\ \dots \text{pA-pC-pG-pA-pA-pT-pC-pT} \dots \\ \text{Tp-Gp-Cp-Tp-Tp-Ap-Gp-Ap} \end{array} $	ADN double brin avec des extrémités cohésives complémentaires
Soudure des bouts francs	Par exemple : $ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ 5' \dots \text{pC-pG-pA-pC-pG-pT-pA} \dots 3' \\ \\ 3' \dots \text{Gp-Cp-Tp-Gp-Cp-Ap-Tp} \dots 5' \\ \\ \text{OH} \\ \downarrow \\ \text{ATP} \quad \text{Mg}^{++} \\ \dots \text{pC-pG-pA-pC-pG-pT-pA} \dots \\ \dots \text{Gp-Cp-Tp-Gp-Cp-Ap-Tp} \dots \end{array} $	fortes concentrations en ADN double brin, à bouts francs, avec des extrémités 5'-P et 3'-OH

TABLEAU 5 : Action de la T_4 DNA ligase.

La T_4 DNA ligase est donc capable de réaliser des soudures intramoléculaires, dans le cas de la circularisation d'une molécule linéaire, par exemple. De même, elle peut associer deux molécules d'origines différentes (soudures intermoléculaires) lors de la formation d'ADN hybrides.

Son activité étant contraire à celle des enzymes de restriction, la préparation d'ADN à soumettre à la ligase doit être exempte de toutes traces d'endonucléases.

Enfin, les conditions d'utilisation de la ligase, c'est-à-dire la quantité, la composition du tampon, la température et la durée de la réaction enzymatique sont spécifiées par le fabricant.

Dans notre cas, nous avons utilisé 4 μ g d'ADN et 0,1 unité de ligase. Après une réaction de 2 heures à 37° C, une inactivation de l'enzyme 10 min. à 65° C puis une précipitation à l'éthanol, nous avons repris l'ADN dans le tampon de réaction de l'enzyme de restriction, puis nous avons procédé à la digestion.

4) Electrophorèse en gel d'agarose

a) Principe

Très utilisée actuellement en génie génétique, l'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode simple pour séparer, analyser les protéines, les acides nucléiques et toute autre substance chargée.

En effet, au cours de l'électrophorèse, les molécules chargées sont entraînées dans un gel traversé par un champ électrique créé dans un tampon. En faisant varier les compositions et les concentrations du gel et du tampon, on peut séparer les molécules en fonction de leur charge, leur poids moléculaire et leur point iso-électrique.

La molécule d'ADN, chargée négativement sur les groupements phosphate, migre vers l'anode à une vitesse inversement proportionnelle au logarithme décimal de sa masse moléculaire.

Puisqu'il existe une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité relative d'un ADN dans un gel et le logarithme du poids moléculaire (14), on peut établir l'équation d'une droite de régression de la forme :

$$\log MM = A \log MR + B$$

où MM = Masse Moléculaire

MR = Mobilité Relative

Cette équation est calculée d'après le poids moléculaire d'un ADN témoin (entier ou fragments de restriction) et d'après la migration sur le gel.

Ainsi, il est possible de déterminer, grâce à un témoin (fragments obtenus par digestion de l'ADN du phage λ par Hind III ou par Eco RI / Bam HI par exemple) le poids moléculaire des fragments de restriction d'un ADN quelconque et d'en déduire celui de l'ADN entier.

b) Méthode

Les électrophorèses sont réalisées horizontalement, dans des plaques de dimension L/l/e : 21 cm - 10 cm - 0,8 cm (Biorad electrophoresis cell 1415) ou verticalement (14 cm - 16 cm - 0,3 cm Biorad Proteam cell).

L'agarose (IBF indubiose A37NA) est dissous à chaud dans différents tampons d'électrophorèse, à des concentrations variant de 0,5 à 1,2 p. 100. Les tampons utilisés sont :

- le TBE (Tris 89 mM ; Borate 89 mM ; EDTA 2,5 mM) pH 8,2 - 8,3, préparé et conservé à température ambiante, 12 fois concentré. Ce tampon permet d'obtenir un champ électrique élevé (jusqu'à 10 V/cm) sans provoquer l'échauffement du gel qui est toutefois réfrigéré au cours de l'électrophorèse.

- le tampon phosphate réalisé comme suit : 2 volumes de phosphate disodique 1 M + 1 volume de phosphate monosodique 1 M, pH 6,8, à diluer 100 fois.

A l'issue de l'électrophorèse (en général, 130 V pendant 3 à 5 heures), les molécules qui ont migré selon leur masse vont former une bande dans le gel.

Cette bande est visualisée par coloration du gel dans un bain d'eau distillée contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium, pendant 30 min. ; on le décolore ensuite dans de l'eau distillée pendant au moins une heure.

Le bromure d'éthidium est un colorant qui s'intercale entre les bases de l'ADN, émettant une radiation orange de longueur d'onde 590 nm, donc visible, lorsqu'il est éclairé par des rayons ultra-violet.

L'observation du gel se fait sur un trans-illuminateur UV Products C63, à une longueur d'onde de 302 nm.

RESULTATS ET COMMENTAIRES

CHAPITRE I - PRODUCTION DE PHAGES EN FERMENTEUR.
ETUDE ET COMPARAISON DE QUELQUES CINÉTIQUES DE LYSE

La technique de lyse en fermenteur qui, rappelons-le, permet à la fois d'obtenir des quantités de phages pouvant aller jusqu'à 10^{13} particules, et de suivre l'évolution du pourcentage d'oxygène dissous, nous donne un moyen valable d'étudier et de comparer certains caractères particuliers à chaque phage.

En effet, la période de latence, c'est-à-dire le temps qui s'écoule entre l'addition des phages aux bactéries, et le début de la lyse, ainsi que le temps nécessaire pour l'obtention de la lyse sont des paramètres spécifiques à chaque phage.

De même, lorsque la lyse bactérienne est terminée, le lysat est recueilli puis dosé afin de déterminer le facteur de multiplication des phages ; ce rapport est constant lorsque les conditions de culture sont identiques.

Dans notre travail, nous avons comparé la cinétique de lyse des phages énumérés dans le TABLEAU 2 de la page 30 .

Grâce à la variation du pourcentage d'oxygène dissous au cours de la lyse, nous pouvons suivre la production des phages. Les FIGURES 8 à 18 illustrent le phénomène.

1) Etude des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 et Φ_{L9}

Le profil des courbes du pourcentage d'oxygène dissous présentent une nette similitude pour les quatre phages.

En effet, lorsqu'on mesure la durée de la phase de latence, il s'avère que celle-ci varie entre 1 heure 30 min. et 2 heures ; quant à la durée totale de la lyse bactérienne, elle est de l'ordre de 3 heures.

En outre, il est à remarquer que dans les quatre cas, le pourcentage d'oxygène dissous à la fin de la lyse est inférieur à celui qui correspond à la croissance optimale des bactéries, c'est-à-dire au moment de l'introduction des phages dans le fermenteur.

Cela signifie que toutes les bactéries n'ont pas été lysées, soit parce que les phages ne sont pas tous virulents, soit parce que des bactéries résistantes aux phages se sont développées dans le milieu de culture.

En considérant les résultats du TABLEAU 7, nous pouvons constater que le facteur de multiplication des 4 phages est très élevé, variant de 100 à 200. Ils sont donc virulents.

L'explication de la lyse incomplète pourrait donc être attribuée à la croissance de bactéries résistantes, ce qui se traduit d'ailleurs sur les graphiques par une baisse du taux d'oxygène dissous et par l'augmentation de la densité optique à la fin de la lyse.

2) Le groupe des phages Φ_4 , Φ_{5t} et Φ_6

Ce groupe de phages, antérieurement cultivés sur la souche lysogène $M_{11}S$ (28) a été reproduit sur une autre souche sensible $M_{13}S$ non lysogène, afin d'éviter toute interaction éventuelle entre le prophage et le phage infectant

Ici également, on note une grande similitude des courbes pour les trois phages considérés.

Les FIGURES 13, 14 et 15 permettent de calculer la durée de la phase de latence qui est respectivement de 2 heures 10 min. pour le Φ_4 , 2 heures 40 min. pour le phage Φ_{5t} et 2 heures pour le phage Φ_6 . De même, le temps de lyse est sensiblement le même. Il dure

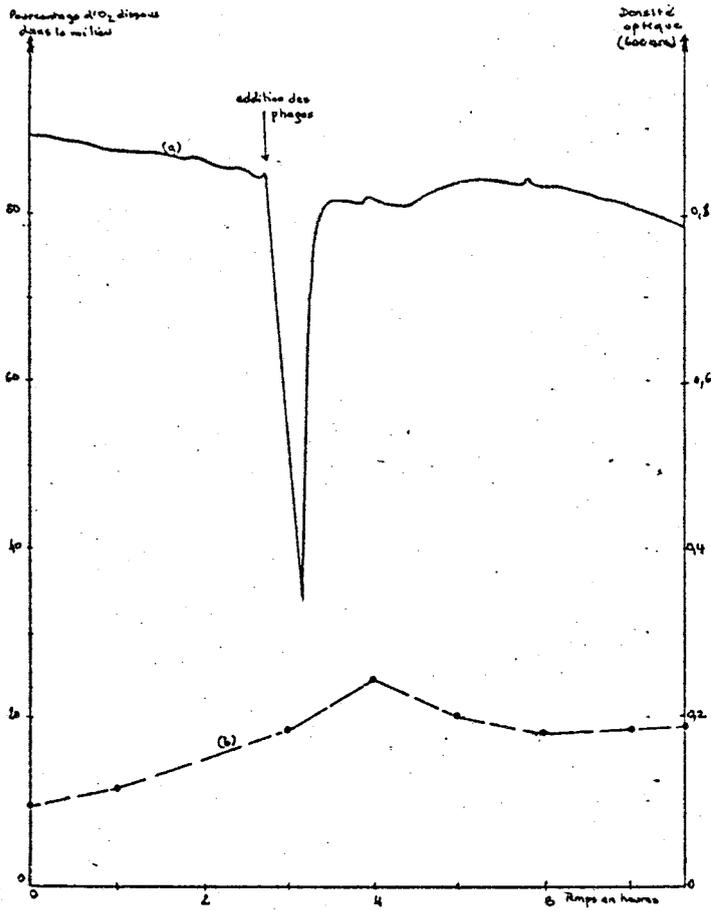


fig 8

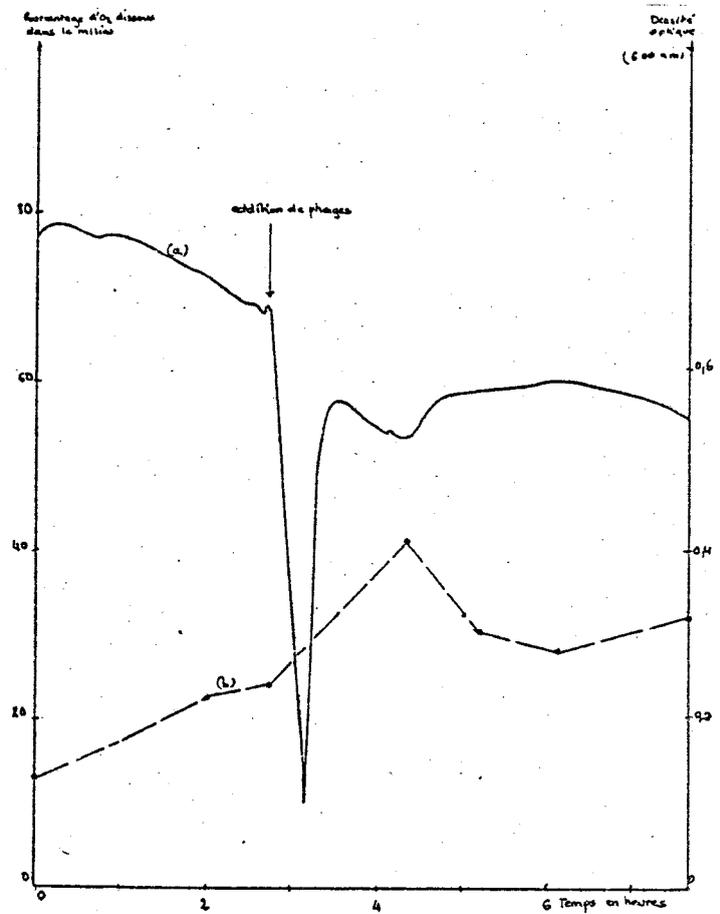


fig 9

FIGURES 8 et 9 : Production en masse du Φ_1 / M95 et du Φ_2 / M95 en fermenteur.

a) Evolution du pourcentage d' O_2 dissous dans le milieu, en fonction du temps.

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

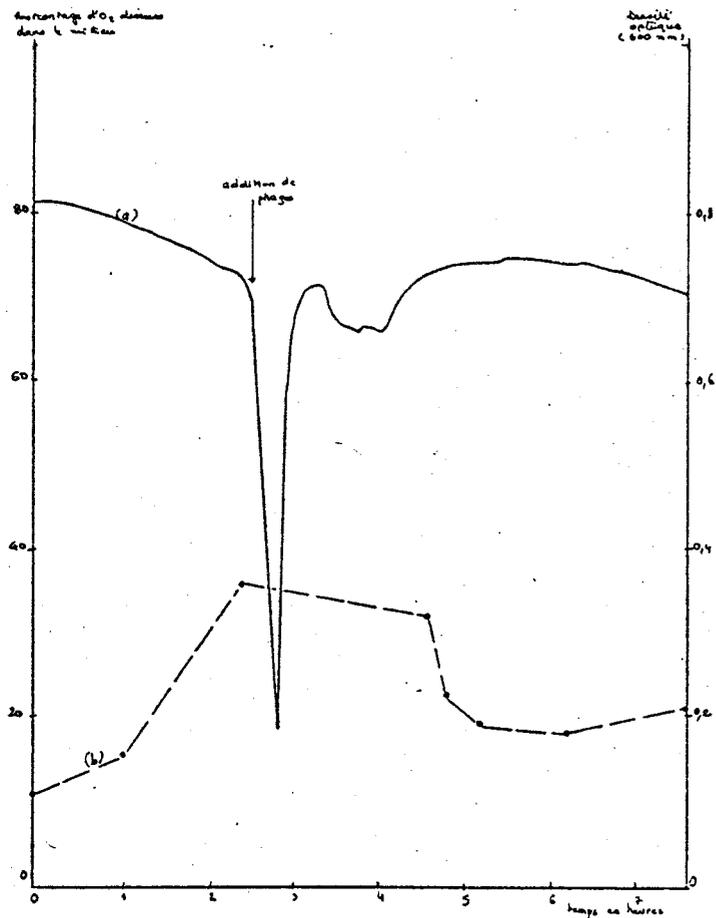
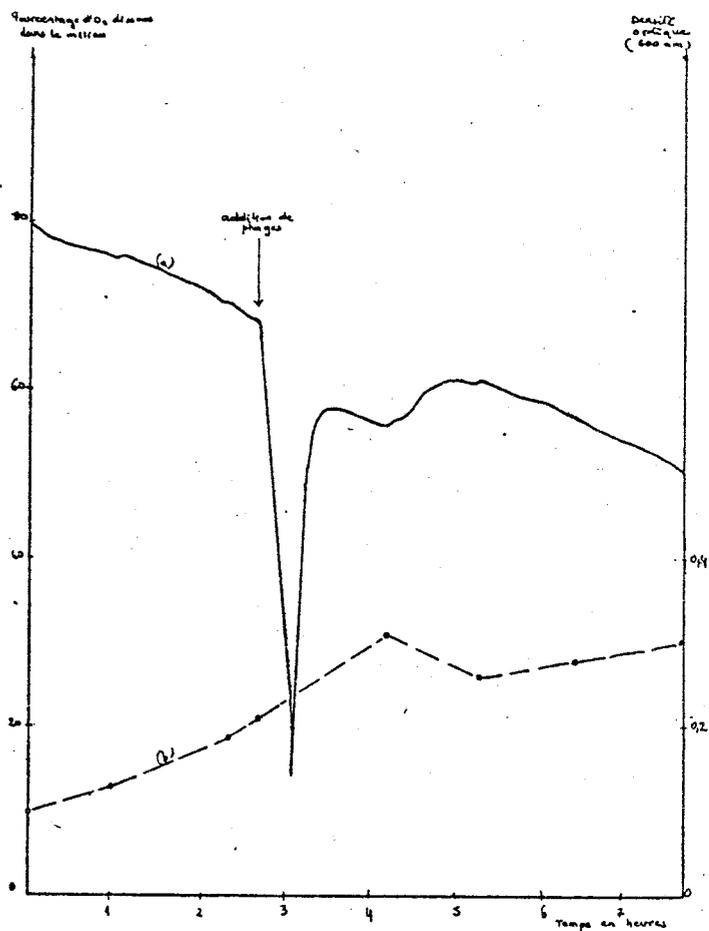


fig 10

fig 11



FIGURES 10 et 11 : Production en masse du Φ_3 /Mqs et du Φ_{L_3} /Mqs en fermenteur.

- Evolution du pourcentage d' O_2 dissous dans le milieu, en fonction du temps.
- Evolution de la densité optique de la culture en fonction du temps.

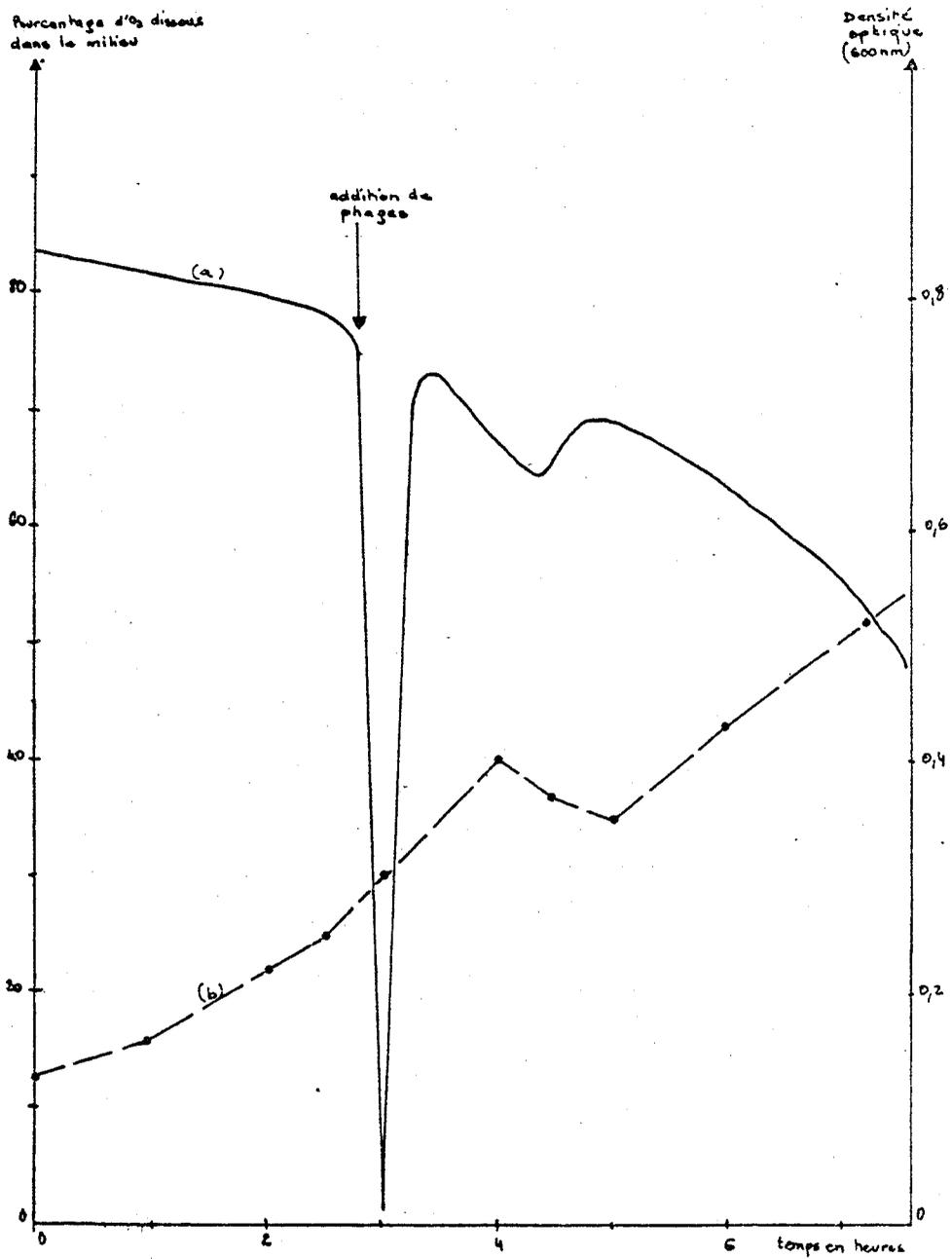


FIGURE 12 : Production en masse du Φ M20/M95 en fermenteur.

- a) Evolution du pourcentage d'O₂ dissous dans le milieu, en fonction du temps.
- b) Evolution de la densité optique de la culture en fonction du temps.

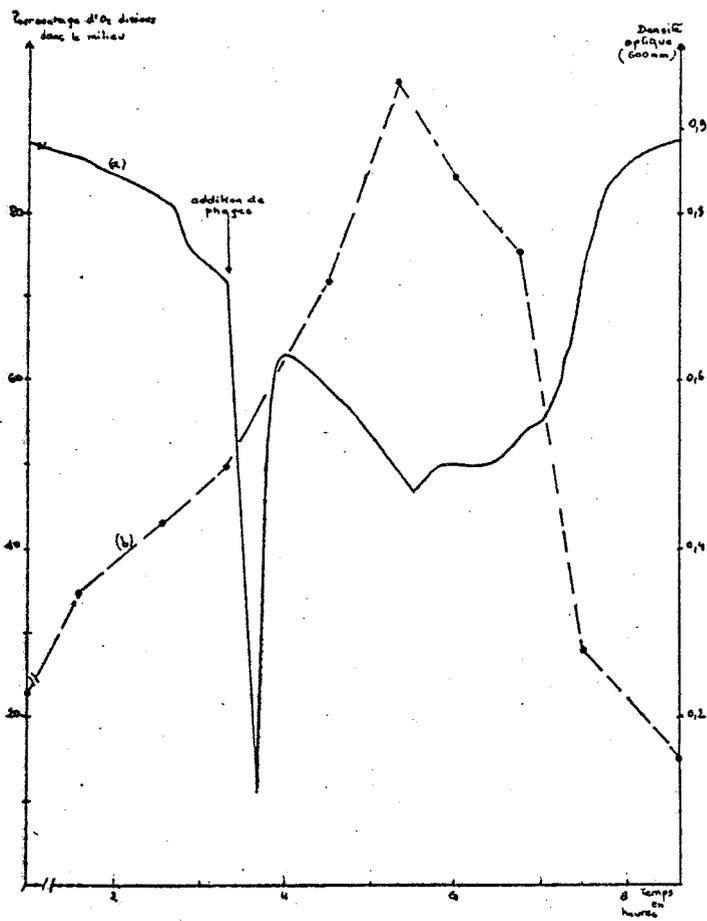


fig 13

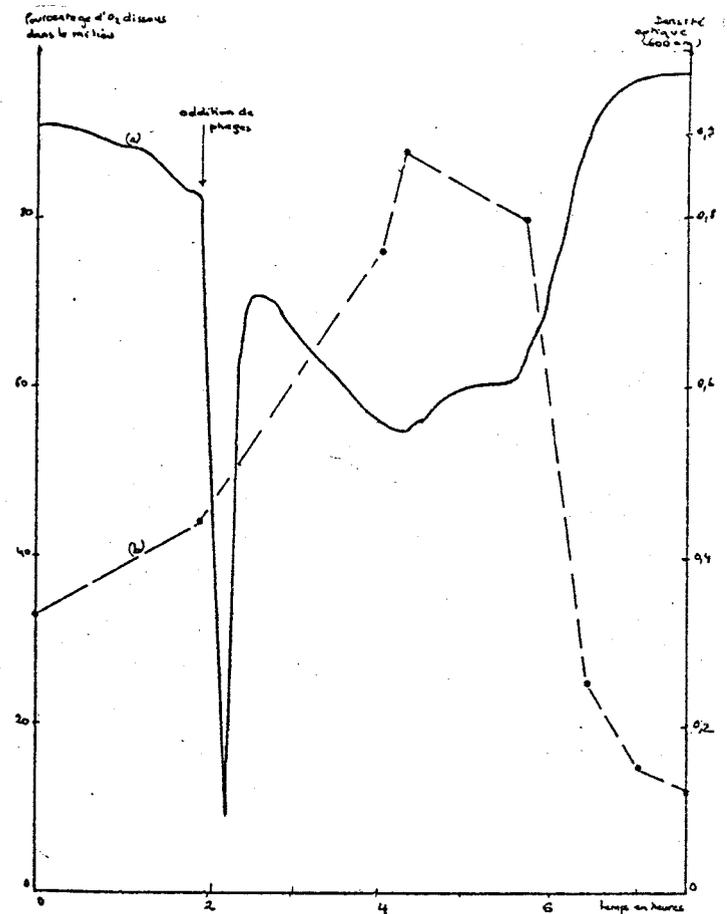


fig 14

FIGURES 13 et 14 : Production en masse du $\Phi_4/M135$ et du $\Phi_{5t}/M135$ en fermenteur.

- Evolution du pourcentage d'O₂ dissous dans le milieu, en fonction du temps.
- Evolution de la densité optique de la culture en fonction du temps.

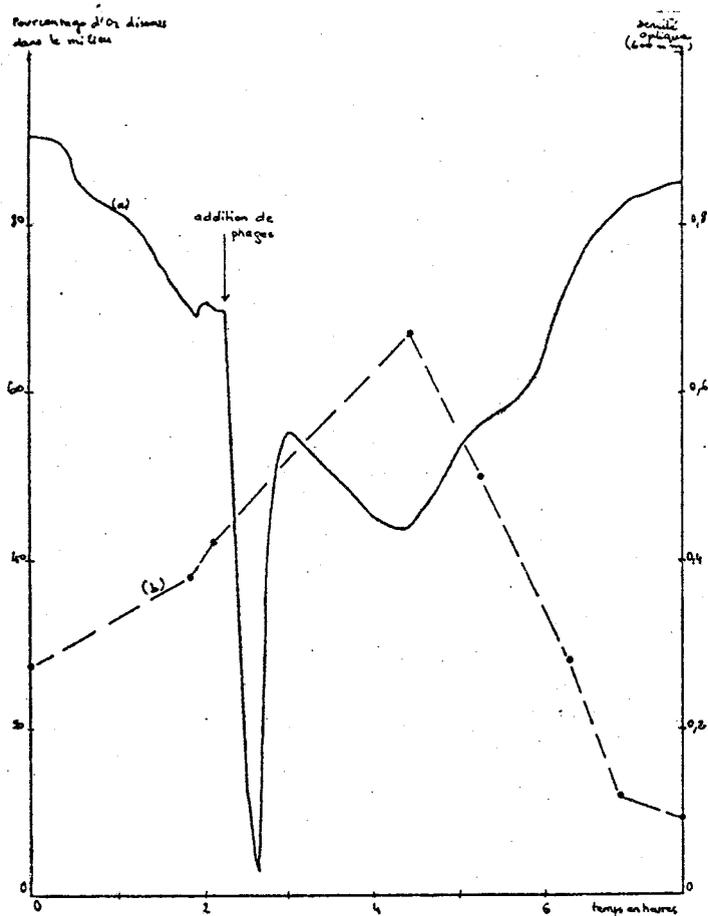


fig 15

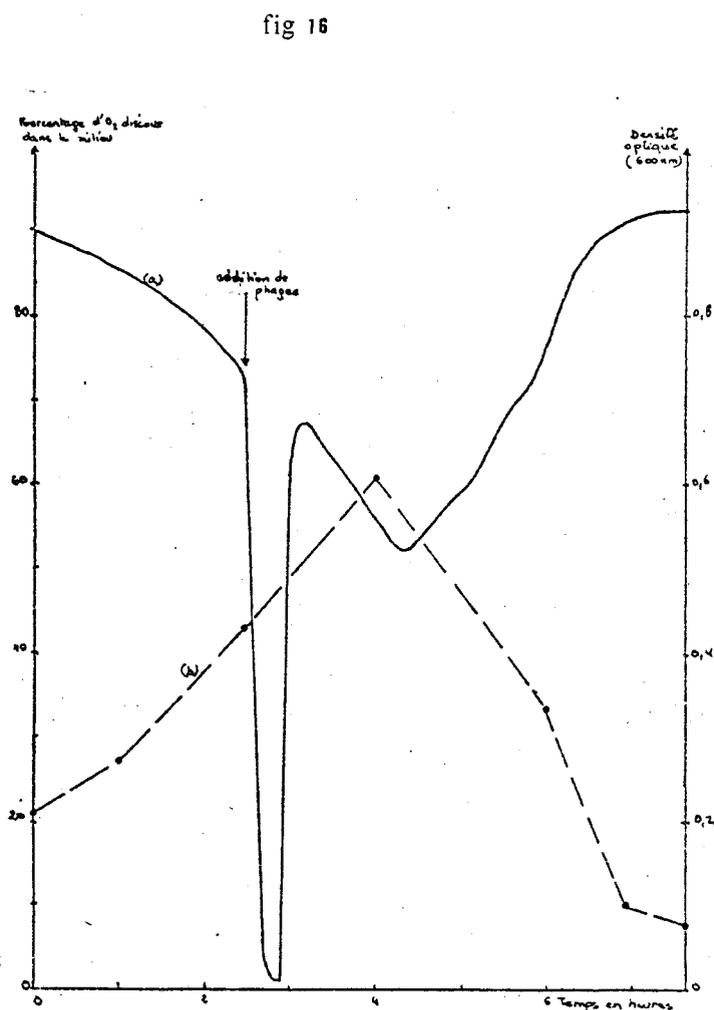


fig 16

FIGURES 15 et 16 : Production en masse du $\Phi_{6/1135}$ et du $\Phi_{13/1145}$ en fermenteur.

a) Evolution du pourcentage d'O₂ dissous dans le milieu, en fonction du temps.

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

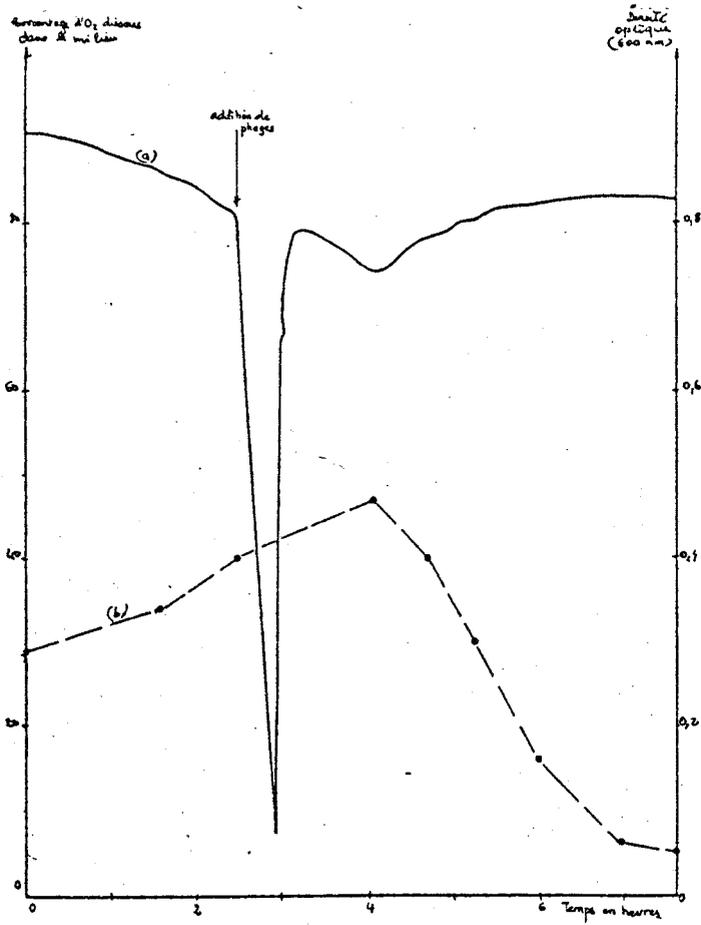


fig 17

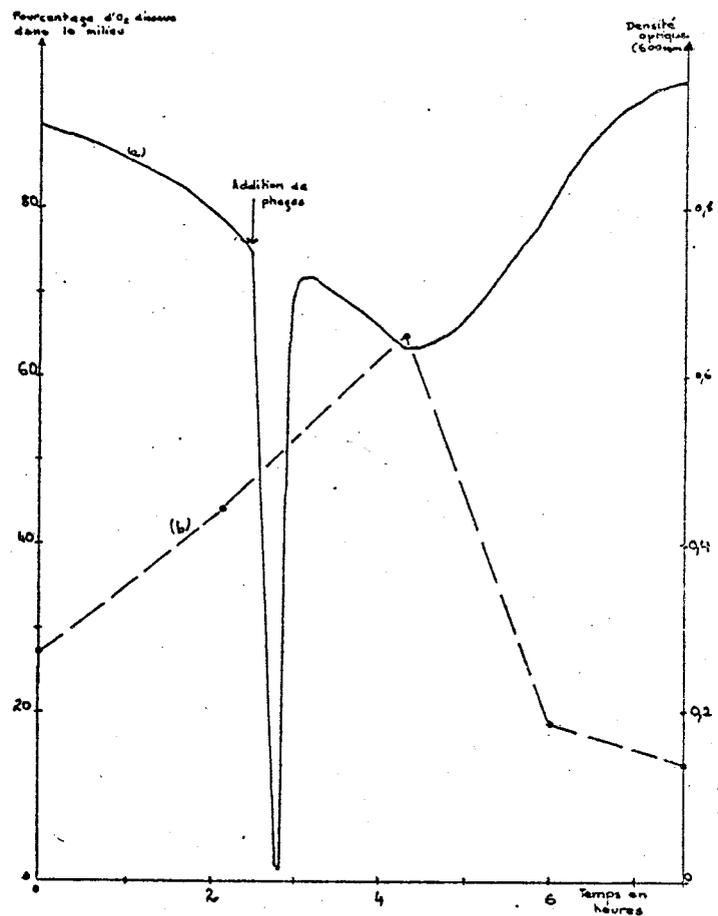


fig 18

FIGURES 17 et 18 : Production en masse du Φ_{16}/M_{195} et du Φ_{20}/M_{125} en fermenteur.

a) Evolution du pourcentage d' O_2 dissous dans le milieu, en fonction du temps.

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

en moyenne 5 heures dans les trois cas.

La lyse est très importante, voire même totale, car nous voyons que le pourcentage d'oxygène dissous à la fin est supérieur à celui de départ sinon, au même niveau. Ceci se traduit également par la diminution de la densité optique qui devient inférieure à celle mesurée lors de l'ensemencement du fermenteur.

3) Etude des phages Φ_{13} / $M_{14}S$, Φ_{16} / $M_{18}S$ et Φ_{20} / $M_{12}S$

Ces trois phages appartiennent à des groupes différents mais présentent des caractères similaires.

En effet, dans les trois cas, la période de latence varie peu, entre 1 heure 40 min. et 2 heures ; le temps de lyse dépasse généralement 5 heures.

D'après l'allure des graphiques, les phages Φ_{13} et Φ_{20} lysent complètement leurs souches sensibles, alors que le phage Φ_{16} est moins efficace.

En ce qui concerne le facteur de multiplication des phages celui du Φ_{13} est très élevé, ainsi que celui du Φ_{16} , étant du même ordre de grandeur que celui des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 et Φ_{L9} . Celui du phage Φ_{20} par contre est plus faible et proche du facteur de multiplication des phages Φ_4 , Φ_{5t} et Φ_6 .

4) Cas d'un phage tempéré : le phage Φ_{M20}

Dans le cadre de ses travaux, HASSANI (28) a isolé à partir de la souche $M_{20}S$ irradiée aux rayons ultra-violetts, un phage tempéré qu'il a appelé Φ_{M20} .

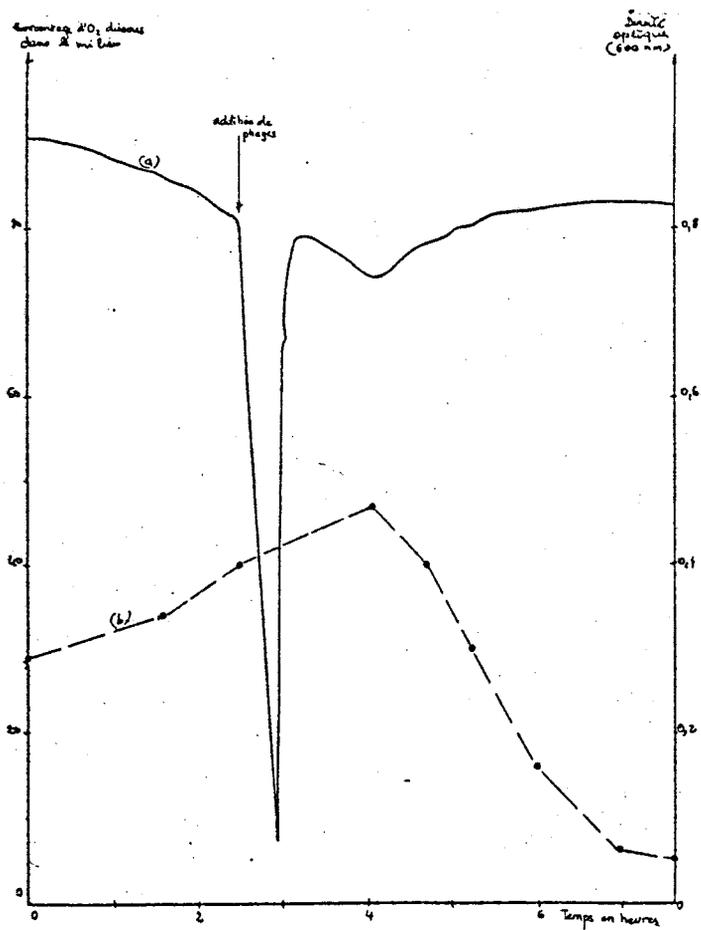


fig 17

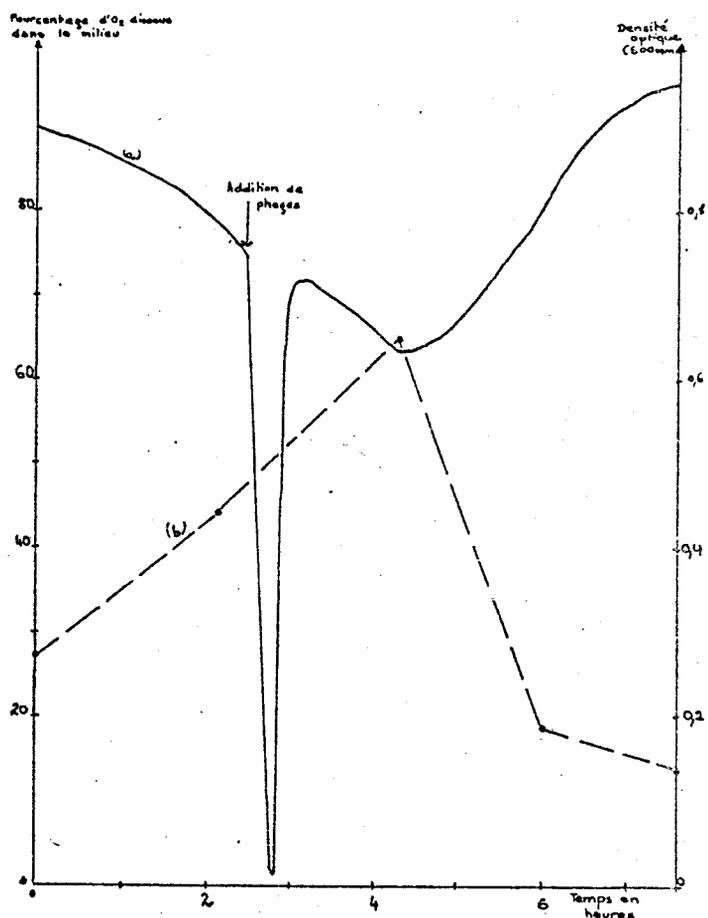


fig 18

FIGURES 17 et 18 : Production en masse du Φ_{16}/M_{185} et du Φ_{20}/M_{185} en fermenteur.

a) Evolution du pourcentage d' O_2 dissous dans le milieu, en fonction du temps.

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

en moyenne 5 heures dans les trois cas.

La lyse est très importante, voire même totale, car nous voyons que le pourcentage d'oxygène dissous à la fin est supérieur à celui de départ sinon, au même niveau. Ceci se traduit également par la diminution de la densité optique qui devient inférieure à celle mesurée lors de l'ensemencement du fermenteur.

3) Etude des phages Φ_{13} / M₁₄S, Φ_{16} / M₁₈S et Φ_{20} / M₁₂S

Ces trois phages appartiennent à des groupes différents mais présentent des caractères similaires.

En effet, dans les trois cas, la période de latence varie peu, entre 1 heure 40 min. et 2 heures ; le temps de lyse dépasse généralement 5 heures.

D'après l'allure des graphiques, les phages Φ_{13} et Φ_{20} lysent complètement leurs souches sensibles, alors que le phage Φ_{16} est moins efficace.

En ce qui concerne le facteur de multiplication des phages celui du Φ_{13} est très élevé, ainsi que celui du Φ_{16} , étant du même ordre de grandeur que celui des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 et Φ_{L9} . Celui du phage Φ_{20} par contre est plus faible et proche du facteur de multiplication des phages Φ_4 , Φ_{5t} et Φ_6 .

4) Cas d'un phage tempéré : le phage Φ_{M20}

Dans le cadre de ses travaux, HASSANI (28) a isolé à partir de la souche M₂₀S irradiée aux rayons ultra-violetts, un phage tempéré qu'il a appelé Φ_{M20} .

Ce phage a une large spécificité d'hôte et lyse la souche M_9S . Celle-ci a donc été utilisée comme souche indicatrice.

HASSANI a également procédé à la lysogénisation de la souche M_9S par le Φ_{M20} afin de voir le comportement de celle-ci vis-à-vis des autres phages. Cette lysogénisation a été obtenue dans 30 p. 100 des cas. La souche obtenue est notée $M_9 (M_{20})$.

La souche $M_9 (M_{20})$ n'est alors plus lysée par les phages Φ_1 , Φ_3 et Φ_{L9} (qui lysent la souche M_9S) car ceux-ci ont été inhibés par le represseur du Φ_{M20} . Cette observation laisse penser que ces quatre phages sont apparentés.

A partir de ces résultats, nous avons étudié la lyse en fermenteur de la souche M_9S par le phage Φ_{M20} afin d'apporter un argument en plus en faveur de cette parenté.

Le graphique de la FIGURE 12 nous indique effectivement une similitude avec celui des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 et Φ_{L9} . Les courbes ont la même allure. Le pourcentage d'oxygène dissous, à la fin de la lyse, continue même à décroître, preuve d'une multiplication des bactéries résistantes.

S'agissant d'un phage tempéré, la souche bactérienne a pu être lysogénisée au cours de la "fermentation" devenant ainsi résistante, d'où sa multiplication.

En ce qui concerne les autres caractéristiques, c'est-à-dire la période de latence, la durée de la lyse et le facteur de multiplication, les valeurs trouvées sont semblables à celles des quatre phages cités précédemment.

Ces phages semblent donc être apparentés ; la multiplication des bactéries résistantes au cours de la production des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 et Φ_{L9} est probablement due à une lysogénisation de la souche M_9S .

Les résultats obtenus par HASSANI (28) confirment d'ailleurs cette hypothèse. La souche M₉S peut facilement être lysogénisée par les phages étudiés (TABLEAU 6).

	Φ_1	Φ_2	Φ_3	Φ_{L9}	Φ_{M20}
Pourcentages de lysogenisation	42	1	32	57	30

TABLEAU 6 : Pourcentages de lysogenisation de la souche M₉S par les phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} , Φ_{M20} d'après HASSANI (28).

En conclusion de cette partie de notre travail, nous avons reporté dans le TABLEAU suivant les principaux résultats obtenus pour nos phages. Notons que ces résultats constituent une moyenne sur plusieurs fermentations.

Phages	Souches indi- catrices	Nombre de phages		Facteur de multiplication	Période de latence	Durée de la lyse	Groupe de BRADLEY
		introduits	récupérés après la lyse				
Φ_1 Φ_2 Φ_3 Φ_{L9} Φ_{M20}	M ₉ S	5.10 ¹¹	6.10 ¹³	120	1 H 40 - 2 H	2 H 40 - 3 H	B
		4.10 ¹¹	6.10 ¹³	150	1 H 40 - 2 H	2 H 40 - 3 H	B
		4.10 ¹¹	8.10 ¹³	200	1 H 30 - 2 H	2 H 40 - 3 H	B
		6.10 ¹¹	6,5.10 ¹³	108	1 H 30 - 2 H	2 H 40 - 3 H	B
		5.10 ¹¹	9.10 ¹³	180	1 H 40 - 2 H	2 H 40 - 3 H	N.D.
Φ_4 Φ_{St} Φ_6	M ₁₃ S	6.10 ¹¹	4,5.10 ¹³	75	1 H 50 - 2 H 20	5 H - 6 H	B
		3.10 ¹¹	9.10 ¹²	30	2 H 40 - 3 H	5 H - 6 H	A
		6.10 ¹¹	3.10 ¹³	50	1 H 30 - 2 H	4 H - 4 H 30	A
Φ_{13}	M ₁₄ S	9,6.10 ¹⁰	1,9.10 ¹³	200	2 H	5 H - 5 H 30	A
Φ_{16}	M ₁₈ S	5,4.10 ¹¹	6.10 ¹³	110	1 H 40 - 2 H	5 H - 5 H 30	A
Φ_{20}	M ₁₂ S	1,3.10 ¹²	5,8.10 ¹³	40	1 H 50 - 2 H 20	5 H 20 - 6 H	A

TABLEAU 7 : Les principales caractéristiques de quelques phages produits en fermenteur.

N.D. = Non Déterminé

A = Queue contractile

B = Queue non contractile

CHAPITRE II - PURIFICATION ET CONCENTRATION DES
SUSPENSIONS PHAGIQUES

Les phages du lysat sont concentrés par la méthode de YAMAMOTO (69) modifiée (la dernière étape de cette concentration s'effectuant en gradient discontinu de chlorure de césium).

Des solutions de CsCl de densité $\rho = 1,40$ $\rho = 1,50$ et $\rho = 1,60$ sont préparées en tenant compte de la formule suivante :

$$\rho_{25^{\circ} C} = 10,8601 \times IR - 13,4974$$

où IR représente l'indice de réfraction lu à 25° C.

Des volumes de 1,3 ml de chaque solution sont déposés délicatement dans un tube à centrifuger de 5 ml (pour le rotor SW 501 ou SW 65), en commençant par la solution la plus dense. Après dépôt de 1 ml de la suspension phagique concentrée, les tubes sont centrifugés à 100 000 g pendant 16 à 20 heures. Les phages se rassemblent en une bande dans la zone correspondant à leur densité. Ils sont récupérés par ponction du fond du tube ou par pipettage (généralement sous un volume final de 0,8 à 1 ml). Après dialyse, le phage est dosé, sa densité optique lue à 260 nm (A_{260}) ceci afin de déterminer le rapport A_{260} /titre qui reflète le degré de pureté du phage (29). L'indice de réfraction est également mesuré à 25° C pour déterminer la densité du phage.

La méthode de YAMAMOTO comporte la précipitation des phages en présence de polyéthylène glycol 6 000. Afin de nous mettre dans les meilleures conditions, nous avons déterminé la concentration en PEG permettant d'obtenir le plus grand nombre de phages.

Ces résultats sont consignés dans le TABLEAU suivant.

	Pourcentage de phages recouverts après précipitation en présence de PEG 6000 à			
	6 %	8 %	10 %	12 %
☉ L ₉ /M ₉ S	38	50,8	49,7	49,8
☉ M ₂₀ /M ₉ S	36	39,6	39,9	39,8
☉ 5t / M ₁₃ S	46	49,8	49,7	49,8
☉ 13 / M ₁₄ S	36	39,8	40	39,4
☉ 16 / M ₁₈ S	28	32,3	31,9	31,5

TABEAU 8 : Influence de la concentration en PEG 6000 sur la précipitation des phages.

Une quantité importante de phages est perdue au cours de la précipitation, probablement lors des centrifugations successives.

Nous avons choisi de soumettre nos lysats à une concentration en PEG 6000 de 8 p. 100.

Le TABLEAU 9 résume les résultats que nous avons obtenus.

Phages	Souches indi- catrices	Nombre de phages		Pourcentage des phages recouverts	A ₂₆₀ /titre (x 10 ¹¹)	Indice de réfraction à 25° C	Densité relative g.cm ⁻³
		dans le lysate	après concentration				
Φ ₁ Φ ₂ Φ ₃ L ₉ Φ _{M20}	M ₉ S	6.10 ¹³	1,2.10 ¹³	20	0,61	1,3830	1,52212
		6.10 ¹³	2,4.10 ¹³	40	0,46	1,3825	1,51669
		8.10 ¹³	3.10 ¹³	37	0,54	1,3828	1,51995
		6,5.10 ¹³	2,8.10 ¹³	42	0,72	1,3833	1,52538
		9.10 ¹³	3,2.10 ¹³	35	0,58	1,3830	1,52212
Φ ₄ Φ _{5t} Φ ₆	M ₁₃ S	4,5.10 ¹³	1,5.10 ¹³	33	0,68	1,3838	1,53081
		9.10 ¹²	4.10 ¹²	45	0,52	1,3842	1,53515
		3.10 ¹³	10 ¹³	35	0,71	1,3850	1,54381
Φ ₁₃	M ₁₄ S	1,9.10 ¹³	6,5.10 ¹²	34	0,55	1,3845	1,53841
Φ ₁₆	M ₁₈ S	6.10 ¹³	1,5.10 ¹³	25	0,58	1,3842	1,53515
Φ ₂₀	M ₁₂ S	5,8.10 ¹³	1,3.10 ¹³	22	0,61	1,3850	1,54381

TABLEAU 9 : Pourcentages de phages recouverts et leur densité relative après purification et concentration.

Nous pouvons constater que la densité relative des phages de la première série (Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20}) est presque la même. Ceci apporte une preuve de plus que ces phages sont très semblables sinon identiques.

Les résultats de HASSANI (27) donnent également des précisions quant à la parenté qui existe entre les phages. En effet, le profil électrophorétique de leurs protéines constitutives montre une similitude nette.

Les phages Φ_4 et Φ_{5t} ont des densités proches l'une de l'autre mais étant morphologiquement différents, ils ne peuvent pas, bien sûr, être apparentés.

CHAPITRE III - L'ADN PHAGIQUE

Dans le chapitre précédent, nous avons déterminé grâce aux paramètres de lyse, qu'il existait une certaine parenté entre les phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} .

Il nous a paru intéressant de poursuivre l'étude comparative de nos phages en nous penchant sur les caractéristiques de leur ADN.

C'est ainsi que nous avons apprécié le contenu en G + C, le profil de restriction (ou pattern) et le poids moléculaire de l'ADN phagique.

Les trois méthodes d'extraction de l'ADN phagique ont été appliquées dans notre travail à titre de comparaison.

L'utilisation du perchlorate de sodium n'a pas donné de résultats concluants, l'élimination totale des résidus étant difficile.

Afin d'uniformiser nos résultats, nous avons extrait les ADN phagiques par la méthode de A. BEGUE modifiée. Toutes nos expériences ont été réalisées sur l'ADN ainsi extrait ; ensuite, à titre de vérification, nous avons utilisé la technique d'extraction rapide et comparé les résultats obtenus.

Nous avons constaté que la méthode d'extraction rapide de l'ADN n'est pas applicable à certains phages de notre collection.

1) Estimation du contenu en G + C de l'ADN des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20}

L'analyse des ADN phagiques en gradient de CsCl, en présence de témoins commercialisés d'ADN de Micrococcus et de poly d(A-T), nous a permis de conforter l'idée de parenté et de similitude entre les phages considérés.

Les gradients formés après centrifugation sont passés dans un fractionneur ISCO 185 couplé à un enregistreur ISCO UA5 et à un collecteur de fractions ISCO 1200 PUP. La vitesse de déroulement du papier enregistreur est de 60 cm par heure, le débit d'écoulement du gradient de 0,750 ml par minute et le temps de fractionnement de 0,4 min.

Les expériences ont été réalisées par rapport à l'ADN du phage λ dont la densité est $\rho = 1,709 - 1,710$, ce qui correspond, d'après la formule de SCHILDKRAUT à 50 - 51 p. 100 de G + C

Nous constatons que la densité de flottaison des ADN de nos phages a une valeur moyenne $\rho = 1,715 - 1,716$ (FIGURES 20 à 24), ce qui équivaut à 56 - 57 p. 100 de G + C.

Il est donc évident, d'après les valeurs, que les phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} constituent soit le même phage, soit des phages très proches les uns des autres.

Nous avons ensuite calculé, dans les mêmes conditions, la densité de flottaison, donc la valeur du contenu en G + C des phages Φ_{5t} et Φ_6 (FIGURES 25 et 26).

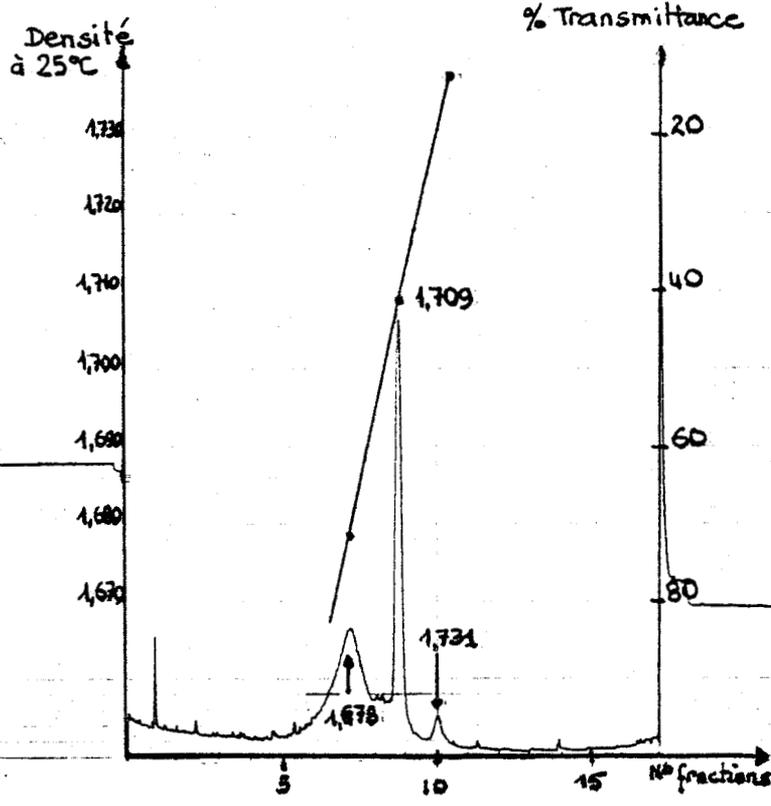


Fig. 19

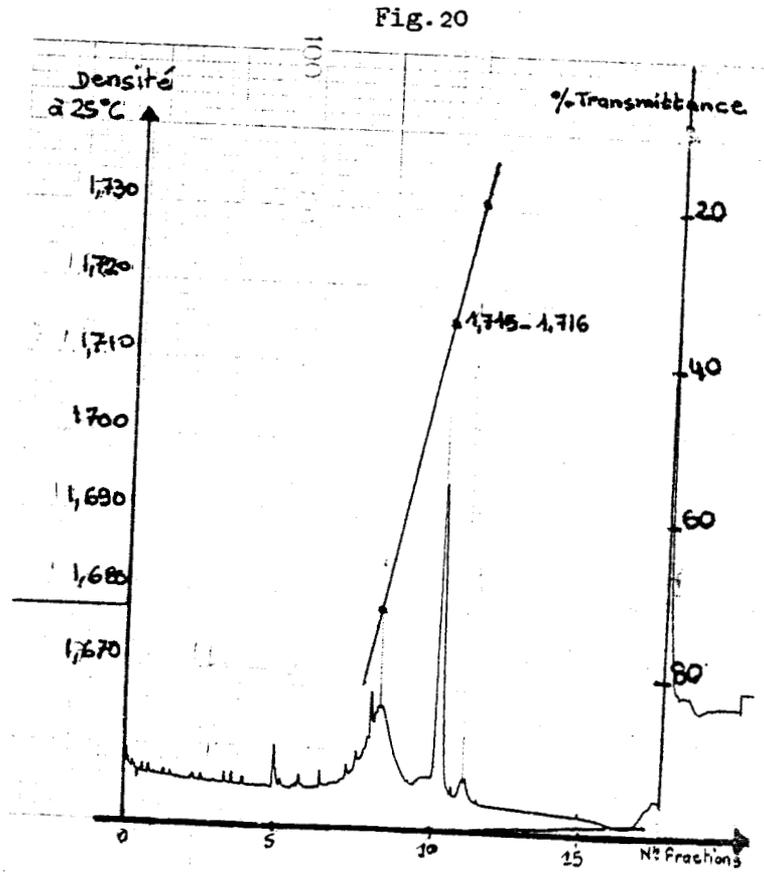


Fig. 20

FIGURES 19 et 20 : Détermination de la densité des ADN des phages λ et $\Phi_{1/M45}$. Chaque fraction est analysée automatiquement en transmittance.

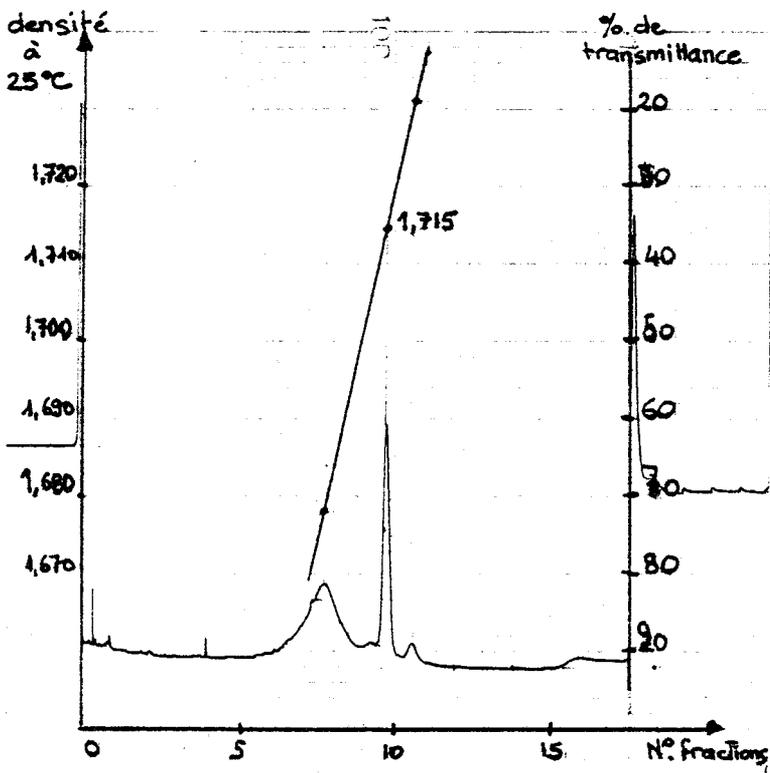


Fig. 21

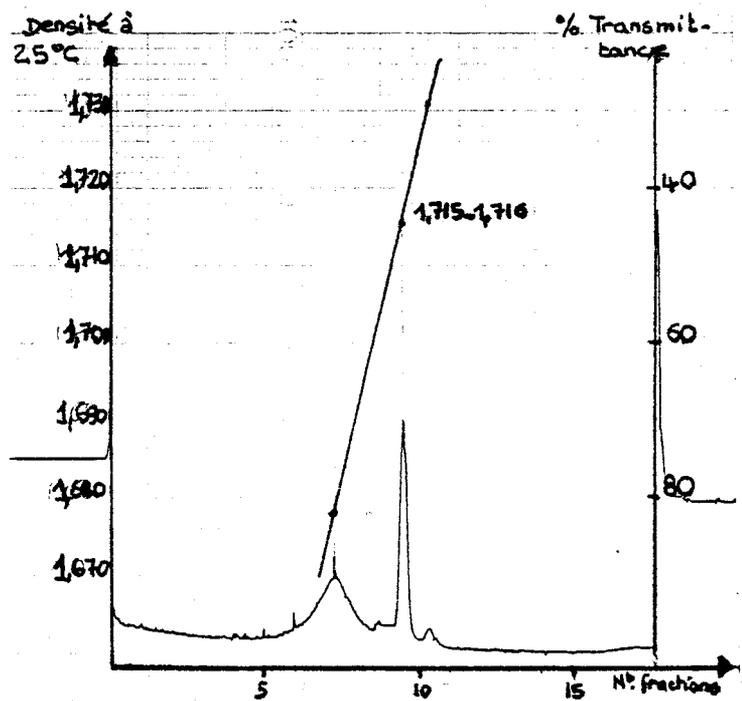


Fig. 22

FIGURES 21 et 22 : Détermination de la densité des ADN des phages $\Phi_2/M95$ et $\Phi_3/M95$. Chaque fraction est analysée automatiquement en transmittance.

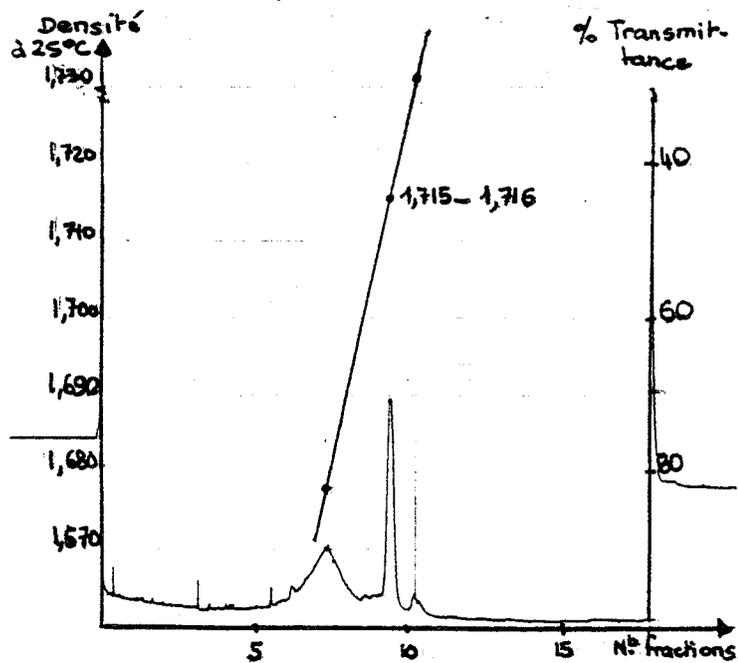


Fig. 24

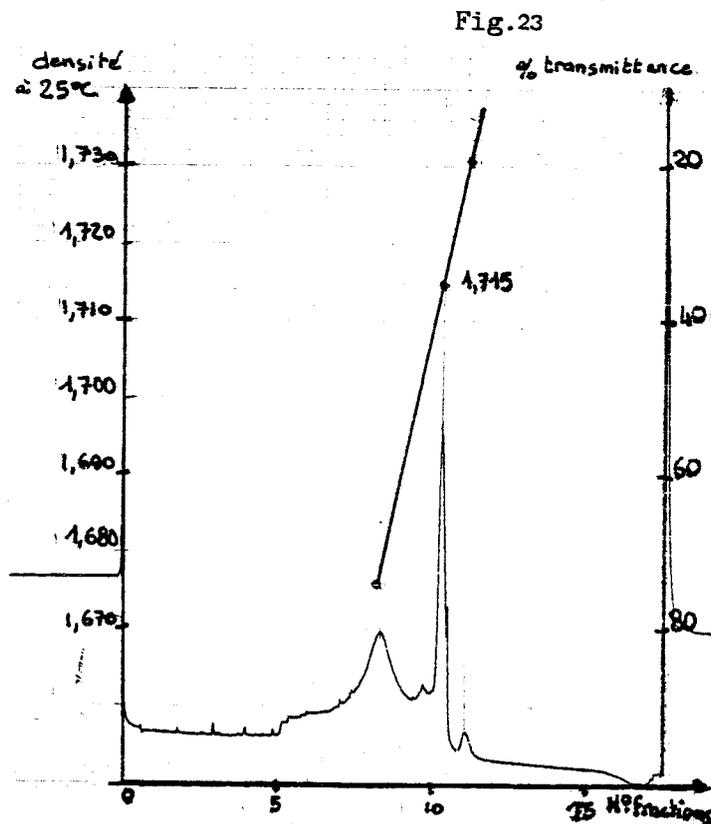


Fig. 23

FIGURES 23 et 24 : Détermination de la densité des ADN des phages $\Phi_{L9}/M95$ et $\Phi_{M20}/M95$. Chaque fraction est analysée automatiquement en transmittance.

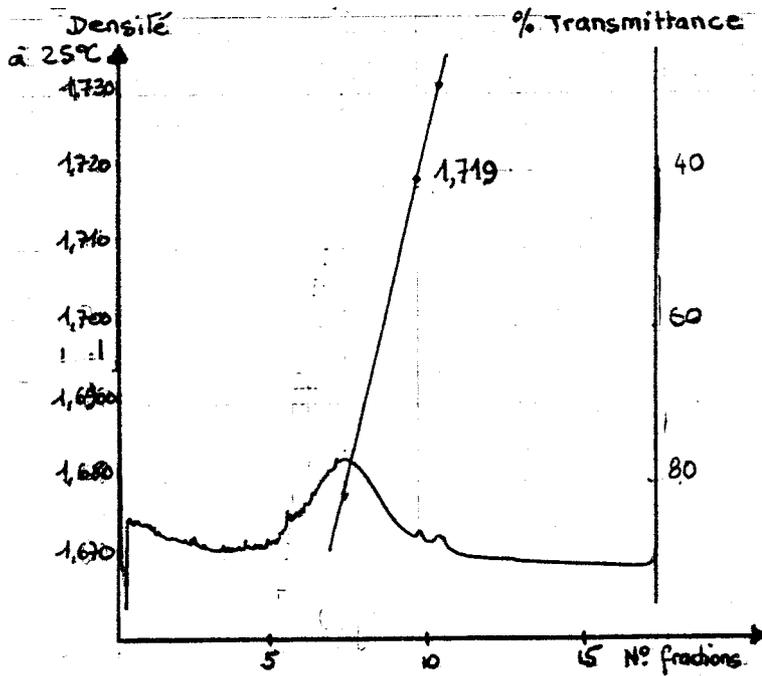
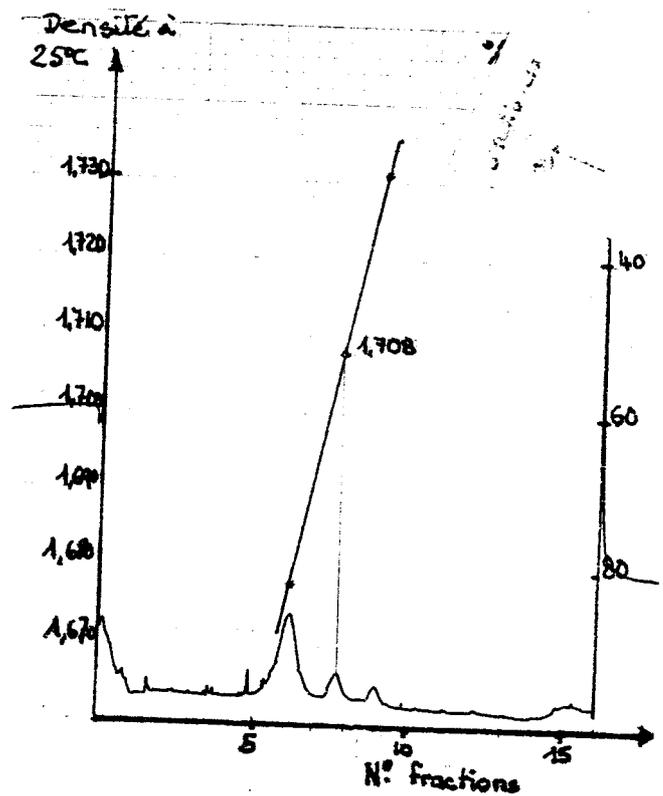


Fig. 25

Fig. 26



FIGURES 25 et 26 : Détermination de la densité des ADN des phages $\Phi_{5t}/M135$ et $\Phi_6/M135$. Chaque fraction est analysée automatiquement en transmittance.

Nous avons trouvé respectivement $\rho = 1,719$ et $\rho = 1,708$, ce qui correspond à 60,2 p. 100 (G + C) pour le phage Φ_{5t} et 48,9 p. 100 (G + C) pour le phage Φ_6 .

Ces valeurs, différentes de celles trouvées pour les cinq phages précédemment étudiés, indiquent une non appartenance au même groupe.

Dans leurs travaux, SCHILDKRAUT et coll. (56) ont déterminé ces valeurs pour quelques phages d'E. coli.

Ils ont ainsi évalué à 53 p. 100 le contenu en G + C de l'ADN du phage T_3 , à 51 p. 100 celui du phage T_7 .

Toujours par le calcul de la densité de flottaison de l'ADN d'un phage noté gh - 1 de Pseudomonas putida, LEE et coll. (39) déduisent qu'il contient 57 p. 100 de G + C.

De même PINA M. et coll. (54) ont conclu que cette valeur varie de 49 à 61 p. 100 chez les Adenovirus du type 1 au type 28.

Ces quelques travaux cités parmi tant d'autres nous permettent de constater que le pourcentage en G + C contenu dans l'ADN de nos phages se situe dans le même ordre de grandeur que celui d'autres phages d'origines différentes.

Après l'étude du contenu en G + C des ADN de nos phages, nous les avons soumis à des enzymes de restriction afin d'étudier les fragments obtenus au cours de l'électrophorèse en gel d'agarose.

2) Etude comparative des profils de restriction des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20}

L'utilisation des endonucléases de restriction exige une purification très poussée de l'ADN à étudier.

Ce degré de pureté est mesuré par les rapports $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ et $\frac{A_{260}}{A_{230}}$

qui doivent être compris entre 1,8 et 2,0.

D'autre part, en tenant compte du fait qu'à $A_{260} = 20$ correspond 1 mg/ml d'ADN, nous avons porté sur le TABLEAU 10 les concentrations finales en ADN obtenues pour environ 10^{13} particules phagiques à l'issue de la lyse bactérienne en fermenteur.

phages	$\mu\text{g d'ADN/ml}$
Φ_1	88
Φ_2	125
Φ_3	130
Φ_{L9}	184
Φ_{M20}	160

TABLEAU 10 : Concentration finale en ADN après extraction au phénol.

Notons dès-à-présent que parmi les enzymes de restriction que nous avons utilisées, Pst I, Sst II, Bgl II et Sma I ne coupent aucun des cinq phages étudiés.

Dans un premier temps, nous avons suivi l'action de l'endonucléase Hind III sur l'ADN de nos phages (PHOTO).

↓ Cette enzyme qui reconnaît la séquence nucléotidique A A G C T T, coupe l'ADN du phage λ en 8 fragments de poids moléculaires connus.



PHOTO 1 : Digestion enzymatique des ADN des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 et Φ_{L9} et du phage λ (témoin) par Hind III (12 unités d'enzyme par microgramme d'ADN, une nuit de digestion).

Electrophorèse verticale en gel d'agarose à 1 %.

Tampon TBE 5 heures - 80 volts

Alvéoles 1, 4, 7, 10, 13 : 1 μg d'ADN des phages λ , Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9}
(sans enzyme)

2, 3, 16	: ADN du phage λ + Hind III (6 fragments visibles)	} + Hind III
5, 6	: 0,5 et 1 μg d'ADN du Φ_1	
8, 9	: 0,5 et 1 μg d'ADN du Φ_2	
11, 12	: 0,5 et 1 μg d'ADN du Φ_3	
14, 15	: 0,5 et 1 μg d'ADN du Φ_{L9}	

La PHOTO nous indique une similitude entre les profils des ADN des quatre phages. Ils sont coupés en 7 points, donnant 8 fragments (dont un doublet visible par son épaisseur plus importante).

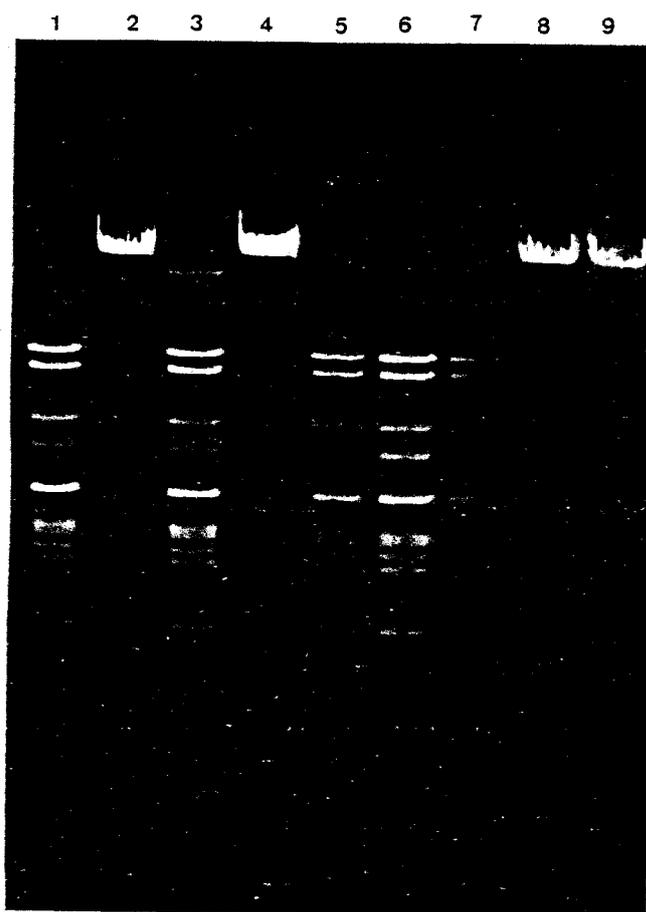


PHOTO 2 : Profil de restriction des ADN des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} par Eco RI (10 U/ μ g d'ADN - 1 nuit de réaction).

Electrophorèse verticale en gel d'agarose à 1 %.

Tampon TBE 5 heures - 80 volts

- Alvéoles 1 : ADN Φ_{M20} /Eco RI
 2 : ADN Φ_{M20}
 3 : ADN Φ_{L9} /Eco RI
 4 : ADN Φ_{L9}
 5 : ADN Φ_3 /Eco RI
 6 : ADN Φ_2 : Eco RI
 7 : ADN Φ_1 / Eco RI
 8 : ADN Φ_1
 9 : ADN Φ_{λ} /Eco RI

Eco RI, qui reconnaît la séquence G \downarrow A A T T C, coupe l'ADN des phages en une vingtaine de points.

Le nombre de fragments étant trop important, cette enzyme ne sera plus utilisée dans la suite de nos expériences ; cependant, elle nous permet, une fois de plus, de constater la similitude entre les cinq profils.

Il en est de même pour Bam HI (PHOTO 3) et Ava I (PHOTO 4).

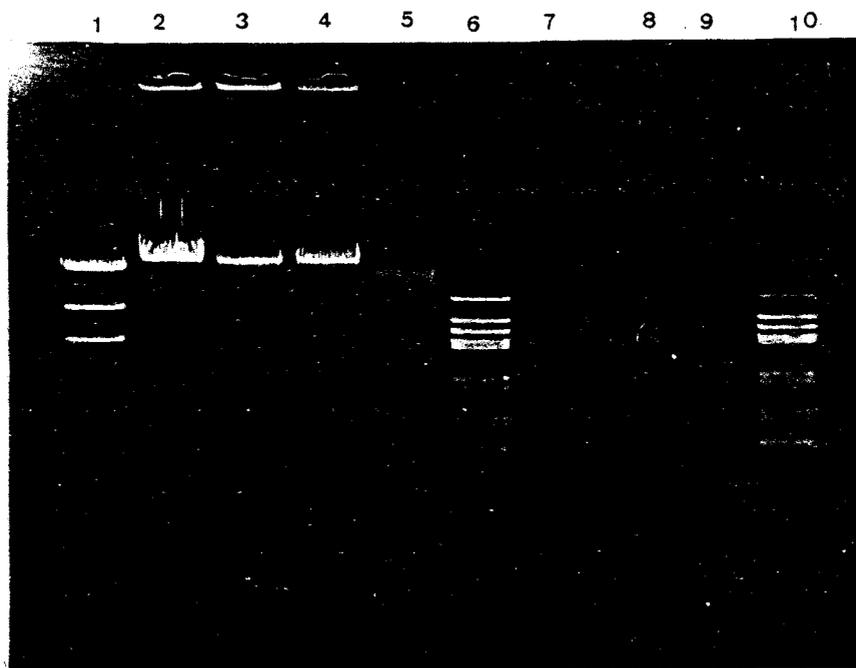


PHOTO 3 : Digestion par Bam HI (2 heures de réaction, 14 U d'enzyme/ μ g ADN)
Electrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1,2 %.
Tampon TBE 3 heures - 130 volts.

Alvéoles 1 : Témoin λ /Hind III
2, 3, 4, 5 : 1 μ g ADN Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9}
6, 7, 8, 9, 10 : 1 μ g ADN (Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} , Φ_{M20}) + Bam HI

Bam HI, qui reconnaît la séquence G \downarrow G A T T C coupe les ADN en une dizaine de points. Le nombre de fragments est encore trop élevé pour l'établissement de la carte de restriction.

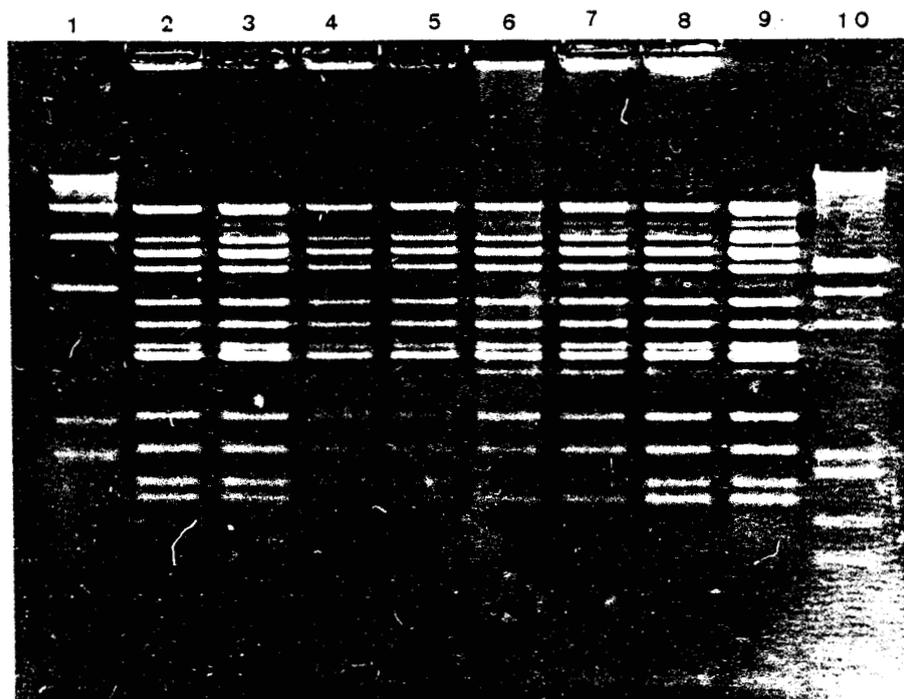


PHOTO 4 : Digestion des ADN des phages par Ava I (2 unités d'enzyme par microgramme d'ADN).

Electrophorèse en gel d'agarose à 1,2 %.

Tampon TBE 3 heures - 130 volts

Alvéoles	ADN de	Enzymes
1	λ	Hind III
2	Φ_1	} Ava I
3	Φ_{M20}	
4, 5	Φ_2	
6, 7	Φ_3	
8, 9	Φ_{L9}	
10	λ	Eco RI/Hind III

Cette PHOTO nous montre une légère différence en ce qui concerne les phages Φ_3 et Φ_{L9} . Il apparait en effet un fragment supplémentaire alors que les autres correspondent exactement à ceux des autres phages. Nous étudierons ultérieurement, à l'aide d'autres enzymes, ce qu'il en est exactement.

Les quatre PHOTOS précédentes apportent une preuve de l'identité des cinq phages. Serait-ce le même phage ou des phages très proches les uns des autres, provenant du Φ_{M20} ?

Dans nos travaux antérieurs, nous avons montré que les phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} sont fortement inhibés par l'immunsérum du phage Φ_{L9} (parenté antigénique), que leur période de latence, déterminée par la méthode de la multiplication phagique en une seule étape en fonction du temps ou "single step growth experiment" (4), est comprise entre 2 heures et 2 heures 40 min. et que le nombre de phages libérés par bactérie est en moyenne de 20.

HASSANI (28) a montré que le phage Φ_{M20} est également inhibé par l'immunsérum du Φ_{L9} .

Nous avons également effectué une digestion enzymatique de l'ADN du phage Φ_{5t} n'appartenant pas au même groupe que les phages précédemment étudiés. La photographie suivante montre les résultats obtenus.

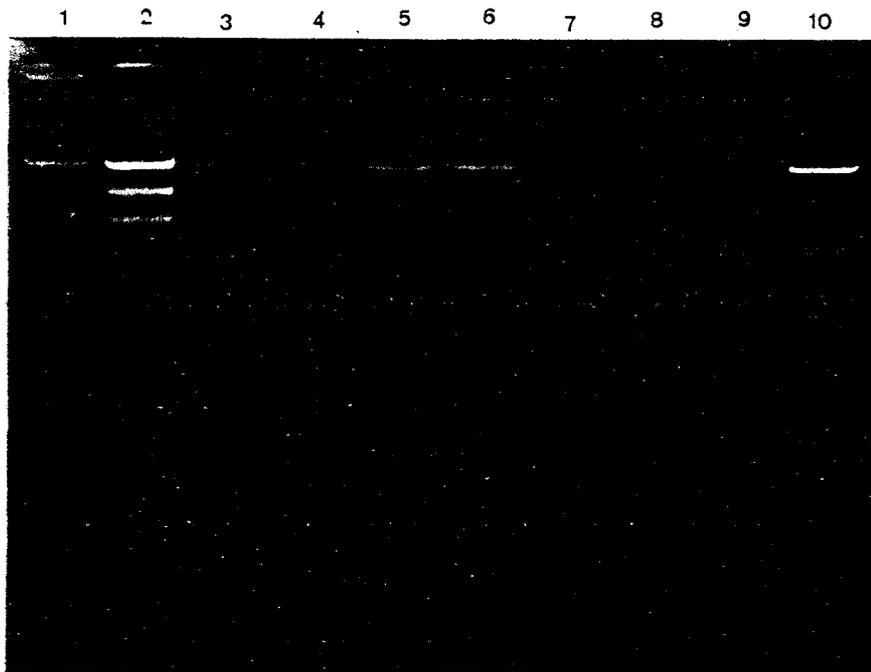


PHOTO 5 : Digestion enzymatique de l'ADN du phage Φ_{5t} / $M_{13}S$
 Electrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1 %.
 Tampon TBE 3 heures - 130 volts

Alvéoles	ADN de
1	Φ_{5t}
2	λ /Hind III
3	Φ_{5t} + Eco RI
4	Φ_{5t} + Eco RI/Xba I
5	Φ_{5t} + Xba I (4 U/ μ g d'ADN)
6	Φ_{5t} + Hind III
7	Φ_{5t} + Hind III/Eco RI
8	Φ_{5t} + Hind III/Xba I
9	Φ_{5t} + Bam HI
10	λ /Eco RI/ Hind III

Nous constatons que le profil de restriction de l'ADN du Φ_{5t} par les mêmes enzymes (sauf Xba), est bien différent de celui des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} .

Nous avons donc montré, grâce à l'action de quelques enzymes de restriction que les ADN des cinq phages étudiés étaient très proches les uns des autres (exception faite d'un fragment supplémentaire lors de la digestion de l'ADN des phages Φ_3 et Φ_{L9} par Ava I).

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes intéressée à l'ADN des seuls Φ_3 et Φ_{M20} pour lesquels nous allons établir la carte de restriction.

3) Etude de l'ADN des phages Φ_3 et Φ_{M20} . Digestions simples et multiples par d'autres endonucléases et établissement de la carte de restriction

Ces deux phages sont tout d'abord soumis à l'action des enzymes Hind III, Xba I, Sma I, Sal I et Sac I avec, comme témoin, l'ADN du phage λ digéré par EcoRI/Bam HI dont la taille des fragments (en kilobases = Kb), est respectivement de 15,8 - 9 - (5,5) - 4,7 - (3,7 x 2) - 3,3 - 2,8 - 2,6 - 1,9 et 1,1.

La PHOTO 6 montre les résultats des digestions.

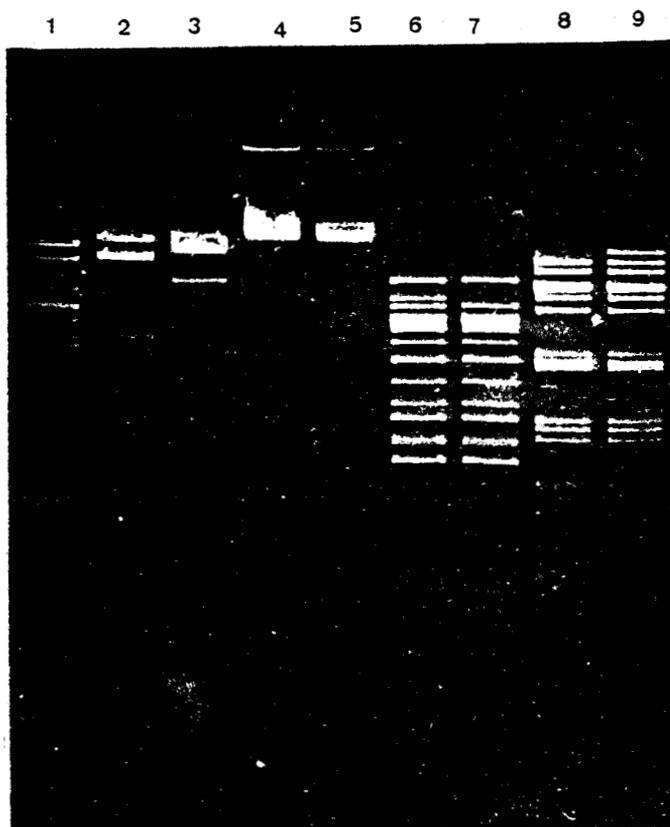


PHOTO 6 : Comparaison des profils de digestion des ADN des phages Φ_3 et Φ_{M20} .
 Electrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1 %.
 Tampon TBE 3 heures - 130 volts

Alvéoles	ADN de
1	λ Eco RI/Bam HI (témoin)
2	Φ_{M20} + Hind III
3	Φ_{M20} + Xba I (4 U/ μ g d'ADN)
4	Φ_3 + Sma I (3 U/ μ g d'ADN)
5	Φ_{M20} + Sma I
6	Φ_3 + Sal I (2 U/ μ g d'ADN)
7	Φ_{M20} + Sal I
8	Φ_3 + Sac I (2 U/ μ g d'ADN)
9	Φ_{M20} + Sac I

Nous constatons sur cette PHOTO que l'enzyme Sma I ne coupe pas la molécule d'ADN, comme il a été affirmé précédemment.

Par contre, Sal I et Sac I donnent un nombre considérable de fragments.

Notons une fois de plus l'existence d'un fragment supplémentaire sur l'ADN du Φ_3 (Sal I) et sur celui du Φ_{M20} (Sac I). Nous expliquerons ultérieurement à quoi est dûe cette différence.

En ce qui concerne les enzymes Hind III et XbaI, nous voyons que la digestion est incomplète, ne permettant ni de voir le nombre de sites de clivage (Xba), ni de déterminer approximativement le poids moléculaire des fragments.

Ainsi, pour mieux visualiser les fragments obtenus avec Xba (en augmentant le nombre d'unités) et pour avoir une idée globale sur nos phages, nous les avons soumis séparément à une série de simples et doubles digestions (PHOTOS 7 et 8).

Dans ces cas, nous avons pris comme témoin l'ADN du phage λ coupé par Hind III dont on connaît la taille (en Kb) et le poids moléculaire (en Megadaltons) des fragments qui sont respectivement de :

(en Kb)	23,6	-	9,6	-	6,6	-	4,3	-	2,2	-	1,98	-	0,56	-	0,14
(en Mdal)	15,58	-	6,36	-	4,38	-	2,86	-	1,49	-	1,31	-	0,37	-	0,092

Dans nos conditions d'expérimentation, en appliquant la relation $\log MM = A \log MR + B$, nous n'avons pas pu vérifier le poids moléculaire du premier fragment de λ /Hind III.

Il ne nous a donc pas été possible de déterminer de façon exacte le poids moléculaire de l'ADN phagique total à cause de l'incertitude du poids des gros fragments.

Nous voyons cependant que Xba I coupe nos ADN en 4 points, donnant 5 fragments.

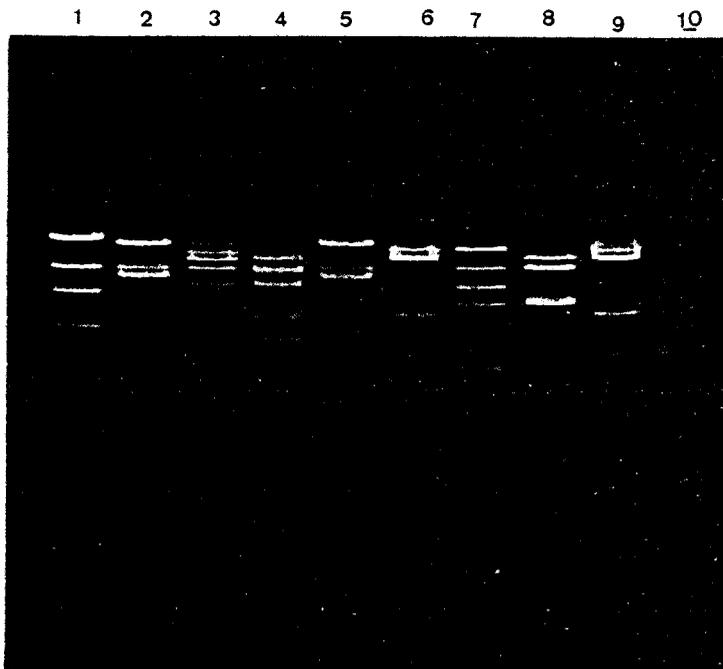


PHOTO 7 : Digestion enzymatique de l'ADN du Φ_3 .
 Electrophorèse en gel d'agarose à 1 %.
 Tampon TBE 4 heures - 130 volts

Alvéoles

ADN de

1	λ - + Hind III
2	Φ_3 + Hind III
3	Φ_3 + Bst EII (2U/ μ g ADN)
4	Φ_3 + Hind III / Bst EII
5	Φ_3 + Hind III
6	Φ_3 + Xba I (8U/ μ g ADN)
7	Φ_3 + Hind III / Xba I
8	Φ_3 + Bst EII / Xba I
9	Φ_3 + Xba I
10	-

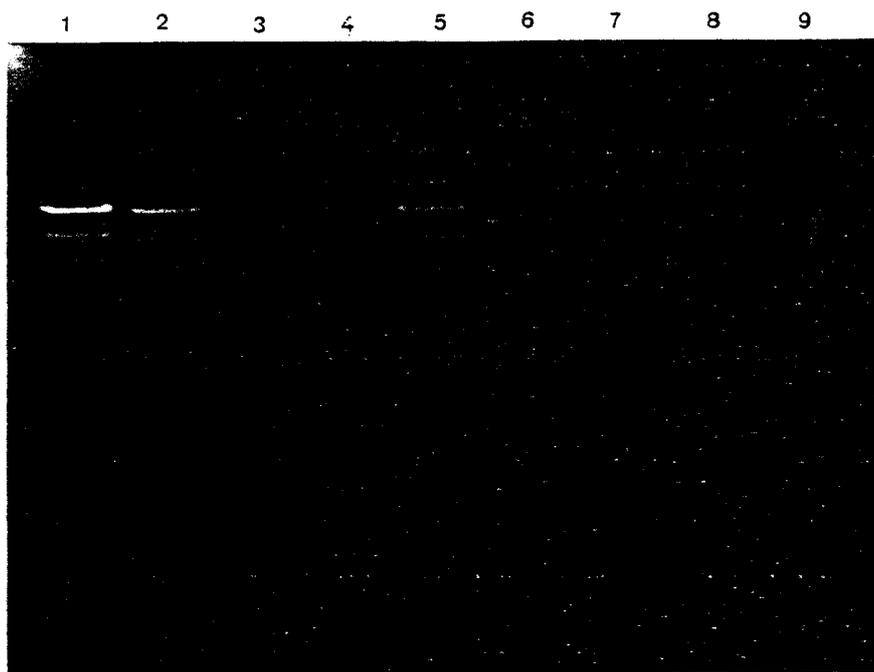


PHOTO 8 : Digestion enzymatique de l'ADN du Φ_{M20}
 Electrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1,2 %
 Tampon TBE 4 heures - 130 volts

Alvéoles	ADN de
1	λ + Hind III
2	Φ_{M20} + Hind III
3	Φ_{M20} + Bst EII (2U/ μ g ADN)
4	Φ_{M20} + Hind III/Bst EII
5	Φ_{M20} + Hind III
6	Φ_{M20} + Xba I (8 U/ μ g ADN)
7	Φ_{M20} + Hind III/Xba I
8	Φ_{M20} + Bst EII/Xba I
9	Φ_{M20} + Xba I

Notons que l'enzyme Bst EII est également intéressante puisqu'elle coupe l'ADN du Φ_{M20} en six fragments.

Les photographies 7 et 8 nous indiquent que les coupures par Hind III, Xba I et la double digestion Hind III/Xba I donnent respectivement les mêmes fragments sur les deux ADN.

Si l'on revient à l'apparition du fragment supplémentaire, lors de la digestion de l'ADN du Φ_3 par Ava I et Sal I et également lors de la digestion de l'ADN du Φ_{M20} par Sac I, deux hypothèses peuvent être émises :

- soit que ces enzymes reconnaissent un site supplémentaire sur l'un et l'autre des deux ADN, auquel cas nos 5 phages ne seraient pas tellement identiques ;

- soit que des phénomènes d'appariements d'extrémités cohésives complémentaires des brins d'ADN aient eu lieu.

La première hypothèse n'a pas été retenue car, en tenant compte du fait que, par exemple Ava I ne coupe pas l'ADN lorsque la déoxycytosine est méthylée, il est tout de même difficile de penser à une telle méthylation localisée sur un seul site dans le cas des ADN des phages Φ_1 , Φ_2 et Φ_{M20} .

Nous avons donc pensé plutôt à l'existence d'extrémités cohésives complémentaires sur les ADN considérés. Pour en être sûr, nous les avons soumis à l'action de la T_4 DNA ligase avant de les couper par Hind III et Xba I.

Nous pouvons observer les résultats sur la PHOTO 9

Nous avons également représenté schématiquement cette photo sur les FIGURES 27 et 28 .

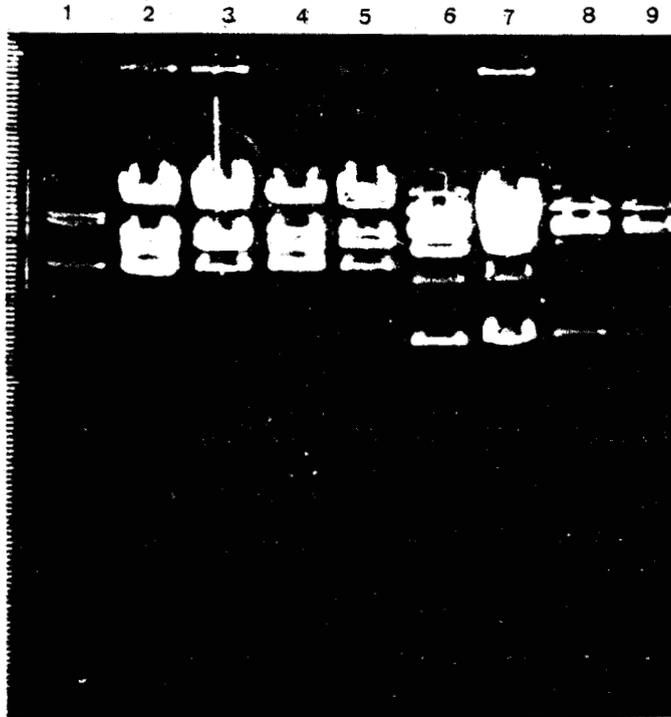


PHOTO 9 : Digestion enzymatique de Φ_3 et Φ_{M20} par Hind III et Xba I préalablement ou non soumis à la ligase.
Electrophorèse horizontale en gel d'agarose à 0,8 %.
Tampon phosphate une nuit - 25 volts.

Alvéoles

ADN de

1	λ Eco RI/Bam HI
2	Φ_3 + Hind III
3	Φ_3 + ligase + Hind III
4	Φ_{M20} + Hind III
5	Φ_{M20} + ligase + Hind III
6	Φ_3 + Xba I
7	Φ_3 + ligase + Xba I
8	Φ_{M20} + Xba I
9	Φ_{M20} + ligase + Xba I

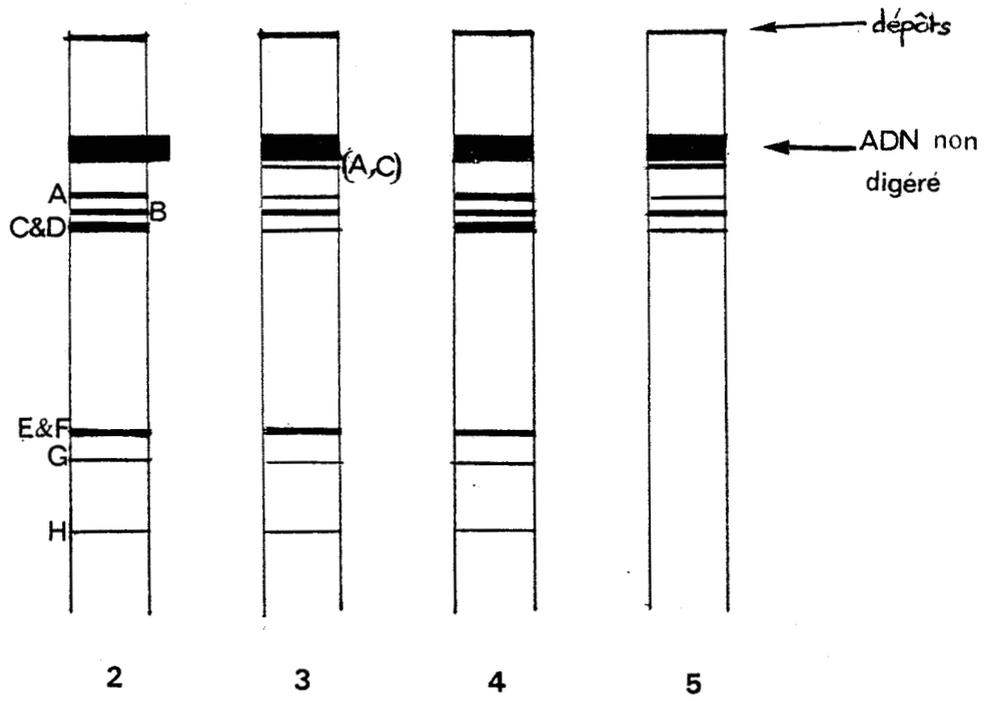


FIGURE 27 : Représentation schématique des alvéoles 2 à 5 du gel de la PHOTO 9 .

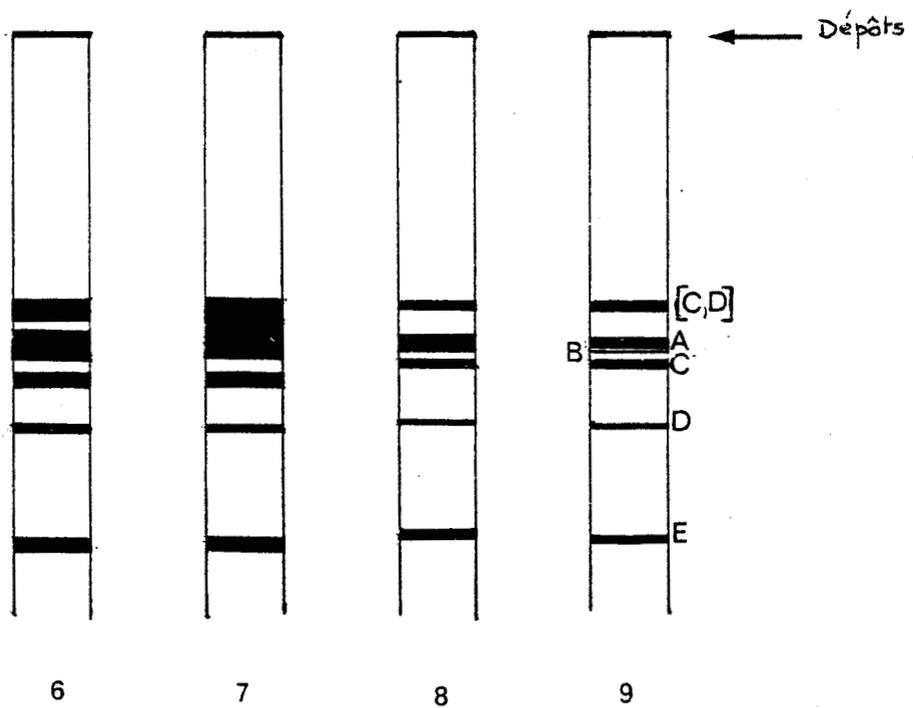


FIGURE 28 : Représentation schématique des alvéoles 6 à 9 du gel de la PHOTO 9 .

Ici encore, nous avons la confirmation de l'identité des fragments obtenus par digestion des deux ADN par la même enzyme, avec ou sans action de la ligase. D'autre part, en considérant les alvéoles 2 à 5 de la FIGURE 27, nous constatons que lorsque les ADN sont soumis directement à l'action de Hind III sans ligation préalable (alvéoles 2 et 4), on distingue quatre fragments notés A B C et D (C et D migrent ensemble) dans la partie supérieure du gel, et quatre autres notés E F G et H (E et F constituent un doublet) dans la partie inférieure.

Après action de la ligase, puis digestion par Hind III (alvéoles 3 et 5), trois phénomènes importants sont à noter dans les deux cas : apparition d'un fragment noté [A, C] de poids moléculaire assez élevé, disparition d'un élément du doublet C - D et diminution de l'intensité du fragment A.

Notons que la disparition des bandes E F G H dans le cas de l'alvéole 5 est due au fait que le gel n'a pas été trop chargé afin de bien voir la séparation des gros fragments.

L'analyse des fragments nous indique qu'il existe bien des extrémités cohésives complémentaires sur les ADN considérés. Ces extrémités, constituées par les bandes A et C (ou D), s'appariaient spontanément, ce qui est fort possible si l'on tient compte de la concentration élevée en ADN (respectivement de 130 et 160 $\mu\text{g/ml}$ pour les phages Φ_3 et Φ_{M20}).

Dans le cas de la digestion par Hind III qui, notons le, est souvent partielle, les fragments distaux appariés ne sont visibles qu'après ligation préalable. Il semble qu'il y ait donc un site Hind III dans les extrémités cohésives.

En ce qui concerne les alvéoles 6 à 9 de la FIGURE 28 il apparaît nettement qu'avec ou sans ligation préalable, les fragments distaux C et D se soudent en donnant le fragment [C,D] lors de

la digestion par Xba I.

Grâce à la mise en évidence de ces extrémités cohésives, nous pouvons expliquer la présence du fragment supplémentaire lors de la digestion de l'ADN des phages Φ_3 et Φ_{L9} par Ava I (PHOTO n° 4, de la page 79).

Nous avons schématisé sur la FIGURE 29 la migration des fragments des ADN du Φ_1 , Φ_2 et Φ_3 soumis à Ava I.

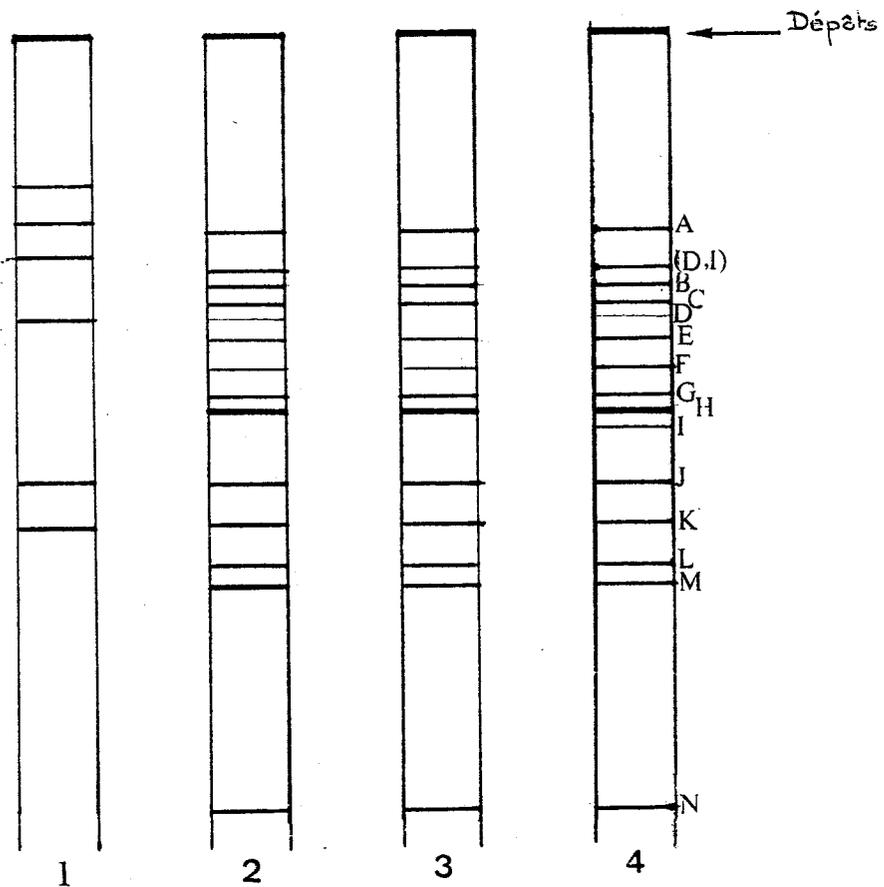


FIGURE 29 : Représentation schématique de la digestion des ADN par Ava I.

- 1 : Témoin ADN λ /Hind III
- 2 : ADN Φ_1 / Ava I
- 3 : ADN Φ_2 / Ava I
- 4 : ADN Φ_3 / Ava I

D'après nos observations sur plusieurs électrophorèses, nous avons constaté que la bande notée D n'est pas toujours visible à chaque manipulation du même phage. D'autre part, l'intensité de la bande notée (D,I) varie elle aussi d'un ADN à l'autre et d'une expérience à l'autre pour le même ADN. La bande I, elle, est absente sur les ADN des phages Φ_1 , Φ_2 et Φ_{M20} .

Ces fluctuations au niveau des fragments de restriction ne peuvent s'expliquer que par des appariements entre eux. En évaluant approximativement la taille des fragments, nous avons déduit que la somme des tailles des fragments D et I est équivalente à celle de (D,I), ce qui prouve bien que ces fragments, situés à l'extrémité de l'ADN, présentent des bouts cohésifs et s'apparient. Cet appariement, se faisant spontanément, est plus stable dans le cas de l'ADN des phages Φ_1 , Φ_2 et Φ_{M20} malgré leur concentration plus faible par rapport à celle des phages Φ_3 et Φ_{L9} . C'est pour cela que dans ces trois cas, le fragment (D,I) est toujours présent, même si son intensité fluctue elle-aussi.

La différence qui a été notée lors de la digestion de nos cinq ADN par Ava I provient donc de phénomènes d'appariements plus ou moins stables de bouts cohésifs de l'ADN. Il en est de même pour les digestions par Sal I et Sac I. Les fragments supplémentaires sont dûs à la soudure d'autres fragments mineurs plus ou moins visibles.

Ces résultats nous permettent de conclure une fois de plus que les ADN considérés sont identiques ou du moins, apparentés.

Nous avons donc poursuivi nos expériences en vue de l'établissement de la carte de restriction du phage Φ_3 ou Φ_{M20} . Pour cela, il nous faut déterminer exactement le poids moléculaire des fragments de restriction. Pour une meilleure migration des bandes, nous avons utilisé une concentration en agarose de 0,5 % et une tension de 25 volts.

La PHOTO 10 illustre cette expérience.



PHOTO 10 : Simple et double digestion des ADN de Φ_3 et Φ_{M20}
Par Hind III et Xba I.

Electrophorèse horizontale en gel d'agarose à 0,5 %.

Tampon phosphate une nuit - 25 volts.

Alvéoles

ADN de

1	Φ_3 + Xba I
2	Φ_3 + Hind III/Xba I
3	Φ_3 + Hind III
5	Φ_{M20} + Xba I
6	Φ_{M20} + Hind III/Xba I
7	Φ_{M20} + Hind III
8	λ Eco RI/Bam HI

Dans le cas des digestions simples, les fragments externes sont très nets car ils sont soudés. Ils ont approximativement pour taille 19 Kb (avec Xba I) et 23 à 24 Kb (avec Hind III). Ils se voient également en double digestion mais ici les fragments partiels sont très nombreux.

Le TABLEAU 11 nous donne les valeurs de la taille des fragments de restriction qui nous permettront d'établir la carte de restriction du même phage Φ_3 et Φ_{M20} .

fragments	Taille des fragments en Kb		
	Hind III	Xba I	Hind/Xba
A	14,5*	15,8	10,5
B	11,5	14,5	9,3
C	9,3	10,6*	8,3
D	9,3*	8,3*	6,2
E	2,8	5,6	5,5
F	2,8	-	3,6
G	2,5	-	2,8
H	1,9	-	2,5
I			1,9
J			1,5
K			1,45
L			1,25
TOTAL	54,6	54,8	54,8

TABLEAU 11 : Taille des fragments de restriction de l'ADN du Φ_3 (ou Φ_{M20}) produits par Hind III et Xba I.

* : fragments distaux.

D'après ces valeurs, l'ADN du phage Φ_3 (ou Φ_{M20}) a pour taille 54,8 Kb soit environ 36,2 Mdal.

A l'aide des digestions, nous en avons établi la carte de restriction que nous avons reportée sur la FIGURE 30 .

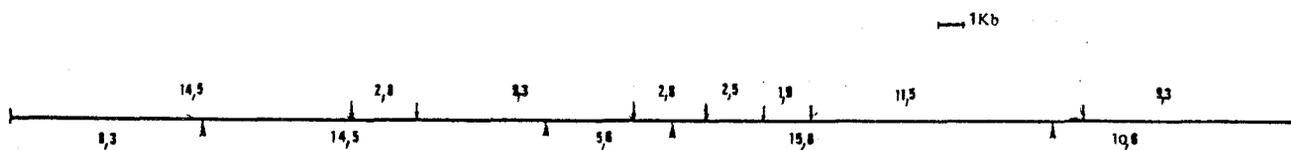


FIGURE 30 : Carte de restriction du phage Φ_3 (ou du phage Φ_{M20}).

- ▲ = sites Xba I
- ↓ = sites Hind III

Après toutes les expériences qui nous ont permis de montrer l'identité des phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} , nous pouvons dire que la carte de restriction de l'ADN étudié pour les endonucléases Hind III et Xba I est la seule valable et unique pour ces cinq phages.

Nous avons eu quelques difficultés pour l'établissement de cette carte à cause de la digestion partielle de l'ADN par Hind III. En supposant que ceci soit dû à une méthylation au niveau de l'adénine (et non de la cytosine sinon Xba I serait a priori inactivée) on pourrait procéder à un sous clonage dans E. coli afin d'éliminer ces problèmes de digestion partielle.

Il suffirait de trouver un vecteur ayant des sites reconnus par Xba I, d'y insérer des fragments de l'ADN phagique coupé par cette enzyme et de faire amplifier ce vecteur dans E. coli. On procéderait ensuite à la digestion enzymatique de l'ADN ainsi obtenu, par Hind III.

D'autre part, ayant établi la parenté étroite entre les cinq phages, la lysogénéisation de la souche M₉S par ces phages nous fait penser qu'ils possèdent des represseurs apparentés.

Notons cependant que le pourcentage de lysogénéisation est très faible dans le cas du phage Φ_2 . Il aurait donc subi une mutation au niveau du site d'attachement de son represseur. Cette mutation pourrait être visible en soumettant son ADN à d'autres enzymes de restriction. Ceci est toutefois très difficile en cas de mutation ponctuelle.

La confection d'hétéroduplexes entre le phage Φ_2 et le Φ_{M20} donnerait beaucoup plus d'informations sur la localisation et la taille des "portions" mutées, donc sur le pouvoir de lysogénéisation.

La taille des ADN considérés, leur pourcentage en G + C, l'existence d'extrémités cohésives complémentaires, nous rapprochent des résultats obtenus par d'autres auteurs travaillant également sur d'autres phages de Rhizobium.

En effet, LURZ et coll., en 1975, (42) ont établi que le poids moléculaire de l'ADN du phage 16 - 6 - 12 de R. lupini est de $29,70 \pm 0,59$ Mdal, qu'il a des extrémités cohésives courtes le rendant capable de se circulariser in vitro.

Chez Rhizobium meliloti, DALLMANN et coll., en 1979, (17) ont étudié le phage tempéré 16 - 3, du point de vue de la restriction enzymatique. En utilisant des mutants (par déletion),

ils ont pu établir une carte génétique simplifiée du phage, ainsi que la carte de restriction. Ils ont également déduit que la taille de l'ADN de ce phage est de 61,57 Kb (d'après les fragments produits par Hind III), et que la molécule est linéaire avec, à chaque extrémité, des séquences complémentaires (bouts cohésifs). Ceci permet à la molécule de se circulariser.

Comme pour nos phages, dont la concentration en ADN très élevée permet une ligation spontanée, les solutions d'ADN du phage 16 - 3 sont très visqueuses et le collage des fragments séparés par la chaleur se fait rapidement.

Toujours chez Rhizobium meliloti, MINK et coll., en 1982, (52) ont étudié la parenté entre le phage 11 et le phage 16 - 3. Leur ADN ont approximativement 40 Mdal comme poids moléculaire et une taille de $59 \pm 1,12$ Kb.

Ils ont également mis en évidence, par électrophorèse, l'existence d'extrémités cohésives, ce qui a été confirmé par observation au microscope électronique.

Grâce à l'étude du mutant A₅ et à la confection d'hétéroduplexes, ils ont pu localiser la délétion au niveau du phage 11, expliquant ainsi son faible pouvoir de lysogénisation.

Enfin, en tenant compte des travaux de LEY et coll., en 1972, (41), ainsi que ceux de MAYER et coll., en 1973, (50) nous pouvons constater que les valeurs que nous avons trouvées pour le poids moléculaire, ainsi que le pourcentage en G + C des ADN de nos phages concordent avec leurs résultats.

En effet, ils ont classé le poids moléculaire de l'ADN de différents bactériophages de Rhizobium entre 27,3 et 50,5 Mdal, et le pourcentage GC entre 53,4 et 61,9 %.

CONCLUSION GENERALE

Notre travail a consisté à comparer les caractéristiques de quelques phages de notre collection.

Afin de disposer d'une quantité suffisante de matériel, nous avons, dans un premier temps, établi les conditions d'obtention maximale des phages. Ainsi, grâce à la mise au point d'une technique de production de phages en fermenteur, qui nous a permis d'obtenir plus de trois litres de suspension phagique titrant environ 10^9 à 10^{10} p.f.u par millilitre, nous avons pu, en suivant l'évolution du pourcentage d'oxygène dissous, comparer plusieurs paramètres caractéristiques de chaque phage.

L'allure générale de la courbe de l'évolution du pourcentage d'oxygène dissous en fonction du temps, le facteur de multiplication des phages, leur période de latence et la durée de la lyse bactérienne ont permis de montrer une parenté entre les phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} . Elle avait été d'ailleurs pressentie sur la base d'autres critères au cours de nos recherches antérieures.

En ce qui concerne les autres phages étudiés (Φ_4 , Φ_{5t} , Φ_6 , Φ_{13} , Φ_{16} et Φ_{20}), nous avons montré qu'ils étaient différents les uns des autres.

Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressée aux cinq phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} . Après concentration et purification en gradient de ClCs, nous avons déterminé que la densité de flottaison de leur ADN était de l'ordre de 1,715 - 1,716. Ces valeurs correspondent, d'après la formule de SCHILDKRAUT, à un pourcentage de 56 à 57 p. 100 de (G + C) dans la molécule d'ADN.



Là encore, leur parenté est évidente.

Enfin, nous avons soumis les ADN de ces phages à l'action de quelques enzymes de restriction.

Nous avons ainsi constaté que les ADN de ces cinq phages ne possèdent pas de sites spécifiques pour les enzymes Bgl II, Pst I, Sma I et Sst II. Par contre, ils sont clivés au moins en dix points par Eco RI, Bam HI, Ava I, Sal I et Sac I.

L'emploi de ces enzymes est intéressant dans la mesure où l'on peut comparer les profils de restriction des ADN. Cependant, le nombre important de fragments rend difficile l'appréciation de leur taille.

Ainsi, grâce à ces enzymes, nous avons pu établir que les profils électrophorétiques des ADN des cinq phages sont en général semblables ; toutefois, un fragment supplémentaire est apparu lors de la digestion de l'ADN du Φ_3 par Ava I et par Sal I.

Pour élucider ce problème, étant donné la similitude entre les cinq ADN, nous avons choisi d'étudier plus particulièrement l'ADN des phages Φ_3 et Φ_{M20} .

Nous avons donc comparé le comportement de ces deux ADN, préalablement soumis ou non à l'action de la T_4 DNA ligase puis digérés par Hind III d'une part, Xba I d'autre part.

La digestion avec Hind III s'est avérée incomplète mais, dans l'un et l'autre cas, nous avons pu démontrer que les profils sont identiques, les ADN étant donc semblables et, qu'en outre, ils présentent des extrémités cohésives complémentaires qui s'appariement plus ou moins facilement, spontanément même sans action de la ligase. Le fragment supplémentaire cité plus haut provient donc de l'appariement de ces bouts distaux cohésifs.

En double digestion, les légères différences sont dues aux digestions partielles avec Hind III.

Ces expériences nous ont permis de conclure que ces deux ADN sont pratiquement semblables. Nous en avons donc déterminé la taille des fragments de restriction, puis celle de l'ADN entier, ce qui nous a donné 54,8 Kb soit un poids moléculaire de 36,1 Mdaltons. Grâce à ces résultats, nous avons pu établir la carte de restriction du phage Φ_3 ou Φ_{M20} , donc valable pour les cinq phages.

Cependant, nous avons noté que le phage Φ_2 présente un taux de lysogénisation vis-à-vis de la souche M_9S , différent des quatre autres phages. Il pourrait s'agir d'une légère mutation que les seules enzymes de restriction en notre possession n'ont pas permis de révéler.

Pour mettre en évidence cette petite différence au niveau de l'ADN du phage Φ_2 , plusieurs techniques peuvent être utilisées, parmi lesquelles on peut citer :

- la digestion de l'ADN par d'autres enzymes de restriction mais, dans ce cas, le résultat n'est pas assuré, car il faut que la mutation soit importante pour pouvoir être visualisée.

- la formation d'hétéroduplexes entre les ADN des phages Φ_2 et Φ_{M20} . Dans ce cas, s'il n'y a pas de portions d'ADN non appariées, il faudra :

- . rechercher un mutant du Φ_{M20} dont la mutation porte uniquement sur l'incapacité de lysogéniser la souche M_9S ;

- . déterminer chez ce mutant, grâce aux enzymes de restriction, la position du fragment qui, chez le phage témoin Φ_{M20} porte les gènes codant pour la lysogénisation ;

- . observer au microscope électronique les hétéroduplexes formés entre l'ADN de ce mutant et celui du phage Φ_2 et entre les fragments d'ADN des phages Φ_2 et Φ_{M20} portant les gènes codant pour la lysogénisation. Dans ce dernier cas, on peut alors espérer observer une boucle d'ADN non apparié .

MINK et coll. (52) ont également établi la parenté entre les phages 16 - 3 et 11 de R. meliloti 41 ; ces phages se distinguent par le fait qu'ils assurent respectivement une transduction spécialisée (phage 16 - 3) et une transduction généralisée (phage 11). Cette différence a été mise en évidence par la confection d'hétéroduplexes.

En ce qui nous concerne, la parenté entre les phages Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} a été bien établie.

Des expériences ultérieures démontreront si les phages Φ_1 , Φ_3 , Φ_{L9} et Φ_{M20} constituent ou non un même et unique phage le phage Φ_2 présentant des caractéristiques légèrement différentes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ADAMS M.H. (1956)
Bacteriophages.
Interscience publishers, New-York - London.
- 2 - ACKERMANN H.W. (1969)
Bacteriophages. Propriétés et premières étapes d'une classification.
Path. Biol., vol. 17, n° 21-22, p. 1003-1024.
- 3 - ACKERMANN H.W. (1978)
La classification des phages d'Agrobacterium et Rhizobium.
Path. Biol., 26, N° 8, 507-512.
- 4 - ANDRIANTSIMIAVONA R.M. (1981)
Etude de la multiplication phagique chez Rhizobium meliloti
à l'aide de procédés sérologiques.
D.E.A. - Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 5 - ARBER W., D.DUSSOIX (1962)
Host specificity of DNA produced by Escherichia coli I. Host
control modification of bacteriophage
J. Mol. Biol., 5, 18-36.
- 6 - ARBER W. (1974)
DNA modification and restriction.
Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol., 14 : 1-37.
- 7 - BALASSA G. (1963)
Genetic transformation in Rhizobium.
Bact. Rev., 27, 228-241.
- 8 - BENDICH A. (1957)
Methods for characterization of nucleic acids by base composition.
In Methods in Enzymology, part. III. pp 715-723, N.Y. - Academic Press.
- 9 - BOUSSINGAULT (1973)
Symbiose 15 : 610-613
Encyclopaediae Universalis.
- 10 - BOYER H. (1964)
Genetic control of Restriction Modification in Escherichia coli.
J. Bact., 88, 1652-1660.

- 11 - BRADLEY D.E. (1967)
Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins.
Bact. Rev., 31, 230-314.
- 12 - BRON S., E. LUXEN (1980)
Restriction and modification in Bacillus subtilis.
Mol. Gen. Genet., 101, 191.
- 13 - BUCHANAN-WOLLASTON V. (1979)
Generalized transduction in Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 112, 135-142.
- 14 - CASSE F., C. BOUCHER, J.S. JULLIOT, M. MICHEL et J. DENARIE (1979)
Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis.
J. Gen. Microbiol., 113, 229-242.
- 15 - CHARGAFF E., C.H. CRAMPTON, R. LIPSHITZ (1953)
Separation of calf thymus deoxyribonucleic acid into fractions of different composition.
Nature, 172, 289-292.
- 16 - CHATTORAJ D.K, Y.K. OBEROI and G. BERTANI (1977)
Restriction of bacteriophage P₂ by the E. coli RI plasmid and in vitro cleavage of its DNA by the Eco RI endonuclease.
Virology, 81, N° 2, 460-470.
- 17 - DALLMANN G., L. OROSZ, B. SAIN (1979)
Restriction mapping of DNA of temperate Rhizobium meliloti phage 16-3. Comparison of genetic and physical maps indicates a long, genetically silent chromosomal arm.
Mol. Gen. Genet., 176, 439-448.
- 18 - DELATTRE J.M. (1971)
Introduction à une étude génétique du genre Rhizobium.
Thèse de Docteur Ingénieur, N° 121, USTL.

- 19 - DE LEY J. (1967)
The quick approximation of DNA base composition from absorbancy ratios.
Antonie Van Leeuwenhoek, 33, 203-208.
- 20- DE LEY J. (1970)
Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of DNA.
J. Bact., 101, 738-754.
- 21 - DOVE W.F., N. DAVIDSON (1962)
Cations effects on the denaturation of DNA.
J. Mol. Biol., 5, 467-478.
- 22 - DUCKWORTH D.H. (1976)
Who discovered bacteriophages ?
Bact. Rev., 40, N° 4, 793-802.
- 23 - FREDERICQ E., A. OTH, F. FONTAINE (1961)
The ultraviolet spectrum of DNAs and their constituents
J. Mol. Biol., 3, 11-17.
- 24 - FREIFELDER D. (1967)
The use of NaCl O₄ to isolate bacteriophage nucleic acid.
In Methods in Enzymology (L. GROSSMAN & K. MOLDAVE, 12, part A - 550 - 554)
Acad. Press. New York & London.
- 25 - GERRETSEN F.C., A. GRIJNS, J. SACH & N.L. SOHUGEN (1923)
Centrakbl F. Bakt, 60, Abt II, 311-316.
- 26 - GRAHAM P.H. (1964)
The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes.
J. Gen. Microbiol., 35, 511-517.

- 27 - HASSANI L. (1981)
Etude des protéines de bactériophages de Rhizobium meliloti
par électrophorèse en gel de polyacrylamide -SDS.
D.E.A. - Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 28 - HASSANI L. (1983)
La lysogénie chez Rhizobium meliloti : étude de quelques exem-
ples de transduction.
Thèse de Docteur de 3e cycle, N° 1059, U.S.T.L.
- 29 - HERSHEY A.D. (1955)
Virology 1 : 108
- 30 - HIGASHI S. (1967)
Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium
phaseoli as mediated by an episomic factor.
J. of Gen. Appl. Microbiol., 13, 391-403.
- 31 - HOFNUNG M. (1975)
Restriction-Modification. Dans "Bactérie et bactériophages".
Cours de l'Institut Pasteur, Microbiologie Générale, Vol. 1,
Ediscience / MC GRAW - HILL, Paris.
- 32 - IFFT J.B., D.H. VOET, and J. VINOGRAD (1961)
The determination of density distribution and density gradient
in binary solutions at equilibrium in the ultra centrifuge.
J. Phys. Chem, 65, 1138-1144.
- 33 - JACOBY G.A. & L. SUTON (1982)
Restriction - Modification systems determined by Pseudomonas
plasmids.
Plasmid, 8, 141-147.
- 34 - KLECZKOWSKA J. (1945)
The production of plaques by Rhizobium bacteriophages in poured
plates and its value as a counting method.
J. Bact., 50, 71-80.

- 3⁵ - KOWALSKI M. (1967)
Transduction in Rhizobium meliloti.
Acta Microbiol. polon., 16, 7-12.
- 36 - KOWALSKI M. & J. DENARIE (1972)
Génétique microbienne : Transduction d'un gène contrôlant l'ex-
pression de la fixation de l'azote chez R. meliloti.
C. R. Acad. Sci., D 275, 141-144.
- 37 - KRSMANOVIC-SIMIC & M. WERQUIN (1973)
Etude des bactériophages de Rhizobium meliloti.
C. R. Acad. Sci. (Paris), D 276, 2745-2748.
- 38 - LEDERBERG J. & TATUM E.L. (1946)
Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of
bacteria.
Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol, 11, 113-114.
- 39 - LEE L.F., J.A. BOEZI (1966)
Characterization of bacteriophage gh-1 for Pseudomonas putida.
J. Bact., 92, 1821-1827.
- 40 - LESLEY S.M. (1982)
A bacteriophage typing system for R. meliloti.
Canad. J. Microbiol., 28, 180-189.
- 41 - LEY A.N., H.R. WARNER & P.L. KAHN (1972)
Virulent bacteriophage infection of R. leguminosarum.
Canad. J. Microbiol., 18, 375-384.
- 42 - LURZ R. & F. MAYER (1975)
Electron microscopic characterization of Rhizobium bacteriophage
16 - 6 - 12 and its isolated DNA.
Arch - Microbiol, 104, 171-178.

- 43 - MANDEL M., J. MARMUR (1968)
Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine + cytosine content of DNA.
In Methods in enzymology (L. GROSSMAN & K. MOLDAVE), 12, part B 195 - 206, Acad. Press, New-York - London.
- 44 - MANIATIS T., E.F. FRITSCH & J. SAMBROOK (1982)
Molecular cloning : a laboratory manual.
Ed. Cold. Spring Harbor Laboratory, 545 p.
- 45 - MANNASSE R.J., R.C. STAPLES, R.R. GRANADOS & E.G. BARNES (1972)
Morphological, biological and physical properties of Agrobacterium tumefaciens bacteriophages.
Virology, 47, 375-384.
- 46 - MARMUR J., DOTY P. (1962)
Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature.
J. Mol. Biol., 5, 109-118.
- 47 - MARMUR J., R. ROWND, C.L. SCHILDKRAUT (1963)
Denaturation and renaturation of DNA.
In Progress in Nucleic Acid Research (J.N. DAVIDSON, W.E. COHN)
1. 230-300, Acad. Press, New-York - London.
- 48 - MARSCHALL K.C. & J.M. VINCENT (1954)
Relationship between the somatic antigens of R. trifolii and susceptibility to bacteriophage.
Aust. J. Sci., 17, 68-69.
- 49 - MARSHALL K.C. (1956)
A lysogenic strain of Rhizobium trifolii.
Nature, 177, 92.
- 50 - MAYER F., W. LOTZ, D. LANG (1973)
Electron microscope study and partial denaturation of Rhizobium bacteriophage DNA.
J. Virol., 11, 946-952.

- 51 - MESELSON N., F.W. STAHL & J. VINOGRAD (1957)
Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients.
Proc. Nat. Acad. Sci., 43, 581-588.
- 52 - MINK M., L. OROSZ & T. SIK (1982)
Specialized and generalized transducing rhizobiophage 16-3
and 11 are closely related.
FEMS Microbiology letters, 13, 383-387.
- 53 - PATEL J.J. (1976)
Morphology and host range of virulent phages of Lotus Rhizobia
Canad. J. Microbiol., 22, 204-212.
- 54 - PINA, M. & M. GREEN (1965)
Biochemical studies on Adenovirus multiplication.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 54, 547-551.
- 55 - ROLFE R. & MESELSON M. (1959)
The relative homogeneity of microbial DNA
Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 1039-1043.
- 56 - SCHILDKRAUT C.L., J. MARMUR, P. DOTY (1962)
Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid
from its buoyant density in CsCl.
J. Mol. Biol., 4, 430-443.
- 57 - SIK T., J. HORWATH & S. CHATTERJEE (1980)
Generalized transduction in Rhizobium meliloti.
Molec. Gen. genet., 178, 511-516.
- 58 - STANIEWSKI R. (1970)
Typing of Rhizobium by phages
Canad J. Microbiol., 16, 1003-1009.
- 59 - STANIEWSKI R., Z. LORKIEWICZ & Z. CHOMICKA (1971)
Transfection of Rhizobium meliloti.
Acta Microbiol. polon., 2, 183-186.

- 60 - STANIEWSKI R. & KOWALSKA (1974)
Typing of Rhizobium meliloti by means of phages.
Acta Microbiol polon., 2, 183-186.
- 6.1 - SUEOKA N. (1959)
A statistical analysis of DNA distribution in density gradient centrifugation.
Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 1480-1490.
- 6.2 - SUEOKA N., MARMUR J. & P. DOTY (1959)
Heterogeneity in DNAs. II Dependence of the density of DNAs on guanine-cytosine content.
Nature, 183, 1429-1431.
- 6.3 - VINCENT J.M. (1962)
Australian studies of the root nodule bacteria.
A review Proc. Linn. Soc. NSW, 87, 8-38.
- 6.4 - WATSON J.D. (1968)
Biologie moléculaire du gène.
Ediscience S.A., Paris.
- 6.5 - WEBER K & M. OSBORN (1969)
The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis.
J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
- 6.6 - WERQUIN M., TAHAR BEN BRAHIM M. & D. KRSMANOVIC-SIMIC (1977)
Etude des bacteriophages de Rhizobium meliloti.
C.R. Acad. Sci. (Paris), T 284, Série D - 1851.
- 6.7 - WERQUIN M., C. DEFIVES, L. HASSANI & M. ANDRIANTSIMIAVONA-OTONIA (1984)
Large scale preparation of Rhizobium meliloti bacteriophages by fermenter culture.
J. Virol. Methods, 8, 155-160.

68 - WOLLMAN E. & E. WOLLMAN (1983)

Bacteriophage et lyse secondaire.

C.R. Soc. Biol., 112, 164-165.

69 - YAMAMOTO K. & B. ALBERTS (1970)

Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethy-
lenglycol and its application to large scale virus purification.

Virology, 40, 734-744.

