

N° d'ordre : 404

50376  
1989  
219

50376  
1989  
219

# THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

option : MICROBIOLOGIE

par

Rabia BOUSLAMTI

## L'ADSORPTION DES PHAGES CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI* : RÔLE DES LIPOPOLYSACCHARIDES



Présentée le 18 Juillet 1989 devant le Jury composé de :

Président :	J.B.	GUILLAUME
Rapporteurs :	H.C.	DUBOURGUIER
	B.	FOURNET
Examineurs :	J.C.	DERIEUX
	G.	PRENSIER



030 024116 8

## R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur J.B. GUILLAUME pour l'accueil qu'il m'a accordé et d'avoir bien voulu être le Président de ce Jury.

Je remercie également Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX pour son aide scientifique durant ces années de Recherche et pour sa participation à la correction de ce Mémoire.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur H.C. DUBOURGUIER, Directeur de Recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique de Villeneuve d'Ascq, qui a bien voulu être le Rapporteur de ce travail et Monsieur G. PRENSIER, Professeur de Microbiologie à l'Université de Clermont-Ferrand, qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer au Jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer à Monsieur le Professeur B. FOURNET ma profonde gratitude pour ses discussions fructueuses qui ont contribué à mener à bien ce travail.

Mes vifs remerciements vont à Monsieur C. DEFIVES pour l'intérêt qu'il a toujours manifesté pour ces travaux, sa sympathie, ses conseils scientifiques et sa grande disponibilité tout au long de cette étude.

Que Monsieur K. OSSARATH soit remercié de son extrême gentillesse et de sa collaboration efficace.

Je ne saurais oublier Madame M. DELECOURT pour la dactylographie de ce Mémoire et sa sympathie.

J'associe à tous ces remerciements, tous les membres du Laboratoire de Microbiologie et Biochimie pour leur coopération, leur amitié et leur sympathie.

# TABLE DES MATIERES

- o o o -

AVANT-PROPOS .....	1
BUT DU TRAVAIL .....	5
GENERALITES	
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES BACTERIOPHAGES .....	6
I. - DECOUVERTE DES BACTERIOPHAGES .....	6
II. - PROPRIETES DES PHAGES ET LEUR CLASSIFICATION	7
A. - <u>Principales propriétés des phages</u> .....	7
B. - <u>Classification des bactériophages</u> .....	7
III. - CYCLE DE MULTIPLICATION DES PHAGES .....	8
A. - <u>Adsorption du bactériophage sur la bactérie</u> .....	8
B. - <u>Injection de l'ADN viral dans le cytoplasme</u> .....	9
C. - <u>Multiplication des phages et lyse bactérienne</u> .....	9
CHAPITRE II : LA PAROI BACTERIENNE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF ET LES SITES RECEPTEURS DES BACTERIOPHAGES .....	13
I. - STRUCTURE MOLECULAIRE .....	13
II. - COMPOSITION CHIMIQUE .....	13
III. - ROLE DE LA PAROI BACTERIENNE .....	15
IV. - NATURE ET LOCALISATION DES SITES RECEPTEURS DES PHAGES .....	15
A. - <u>La membrane externe des bactéries à             Gram négatif</u> .....	15
1 - <u>Structure chimique des lipopolysaccharides                 (LPS)</u> .....	16
2 - <u>Composition</u> .....	18
a) <u>Le lipide A</u> .....	18

b) <u>Le "core" polysaccharidique</u> .....	19
c) <u>La chaîne latérale</u> .....	22
3 - <u>Variabilité des LPS</u> .....	22
4 - <u>Rôle des LPS dans l'adsorption phagique</u> .....	24
a) <u>Récepteurs localisés au niveau du "core" polysaccharidique</u> .....	24
b) <u>Récepteurs localisés dans la chaîne latérale</u> .....	26
B. - <u>Les polysaccharides externes</u> .....	28

## MATERIEL ET METHODES

I. - <u>SOUCHES BACTERIENNES</u> .....	29
II. - <u>SOUCHE DE BACTERIOPHAGE</u> .....	29
III. - <u>MILIEUX DE CULTURE ET TAMPONS</u> .....	30
A. - <u>Milieu Rhizobium complet (RC)</u> .....	30
B. - <u>Tampon de non prolifération (TNP)</u> .....	30
C. - <u>Source de carbone</u> .....	30
D. - <u>Milieu gélosé pour bactériophages</u> .....	31
E. - <u>Tampon P.B.S.</u> .....	31
F. - <u>Tampon phosphate</u> .....	31
G. - <u>Tampon acétate</u> .....	32
IV. - <u>STOCK DE BACTERIOPHAGES</u> .....	32
A. - <u>Croissance bactérienne</u> .....	32
B. - <u>Préparation du stock</u> .....	32
C. - <u>Dosage du stock de phages</u> .....	33
V. - <u>ETUDE DE L'ADSORPTION PHAGIQUE CHEZ R. MELILOTI</u> .....	34
A. - <u>Cinétique de l'adsorption phagique</u> .....	34
B. - <u>Estimation du nombre de phages qui s'adsorbent sur une bactérie</u> .....	34
VI. - <u>METHODES DE DOSAGES</u> .....	35
A. - <u>Acides nucléiques</u> .....	35
B. - <u>Protéines selon la méthode de LOWRY</u> .....	35
C. - <u>Sucre : phénol-sulfurique</u> .....	36
D. - <u>Acide sialique : méthode d'AMINOFF</u> .....	36
VII. - <u>PREPARATION ET CARACTERISATION DES LIPOPOLYSACCHARIDES</u> .....	37
A. - <u>Extraction des lipopolysaccharides</u> .....	37
1 - <u>Technique de WESTPHAL</u> .....	37
2 - <u>Technique de GALANOS</u> .....	38
B. - <u>Purification des lipopolysaccharides</u> .....	39
1 - <u>Traitement à la DNase, RNase et pronase</u> .....	39
2 - <u>Purification de l'extrait phénol/eau par chromatographie de gel filtration</u> .....	40
3 - <u>Chromatographie liquide de haute performance (CLHP)</u> .....	40
C. - <u>Caractérisation des LPS</u> .....	41
1 - <u>Microscopie électronique</u> .....	41
2 - <u>Test de Limulus</u> .....	41

VIII. - ANALYSE DES SUCRES ET DES ACIDES GRAS DU LPS DE <u>R. MELILOTI</u> .....	42
A. - <u>Chromatographie de partage en phase gazeuse</u> <u>(CPG)</u> .....	42
1 - Méthanolyse des LPS .....	42
2 - Détermination des rapports molaires des différents composants du LPS .....	45
B. - <u>Caractérisation des acides sialiques</u> .....	46
1 - Hydrolyse partielle de l'acide sialique par la méthode de VARKI .....	46
2 - Identification des acides sialiques en spectrométrie de masse .....	46
IX. - PREPARATION DU LIPIDE A .....	47
A. - <u>Hydrolyse acétique du LPS</u> .....	47
B. - <u>Saponification du lipide A</u> .....	47
X. - ROLE DES LIPOPOLYSACCHARIDES DANS L'ADSORPTION PHAGIQUE .....	48
A. - <u>Adsorption phagique</u> .....	48
B. - <u>Influence de certains facteurs sur l'adsorption</u> <u>phagique</u> .....	48
1 - EDTA et DOC .....	48
2 - Protéinase K .....	48
3 - Déacétylation des LPS .....	49
4 - Lectines .....	49
5 - Sialidase phagique .....	50

## RESULTATS

I. - ETUDE DE L'ADSORPTION PHAGIQUE CHEZ <u>R. MELILOTI</u> .....	51
A. - <u>Relation phage-bactérie</u> .....	51
1 - Cinétique d'adsorption du phage $\Phi 4$ .M11S .....	51
2 - Calcul de la constante d'adsorption .....	51
3 - Détermination théorique et expérimentale du nombre de phages adsorbés .....	53
a) <u>Calcul théorique</u> .....	53
b) <u>Calcul expérimental</u> .....	54
B. - <u>Mise en évidence de l'adsorption phagique</u> <u>sur les LPS</u> .....	54
1 - Choix du modèle expérimental .....	54
2 - Effets de certains facteurs sur l'adsorption phagique .....	57
a) <u>Influence de la concentration en LPS</u> .....	57
b) <u>Influence des protéines pariétales</u> .....	57
c) <u>Effets de DOC et EDTA</u> .....	59
II. - ETUDE DES LPS DE <u>R. MELILOTI</u> M11S .....	60
A. - <u>Purification après extraction</u> .....	60
1 - DNase, RNase et pronase .....	60
2 - Séphadex G50 .....	60
B. - <u>Caractérisation des LPS</u> .....	62
C. - <u>Analyse des LPS</u> .....	63
D. - <u>Analyse du lipide A</u> .....	69

III. - RECHERCHE DU SITE RECEPTEUR DU PHAGE	
$\phi$ 4 DE R. MELILOTI M11S .....	69
A. - <u>Adsorption phagique</u> .....	69
B. - <u>Utilisation des lectines</u> .....	71
C. - <u>Analyse des LPS de souches de R. meliloti</u> <u>résistantes au phage <math>\phi</math>4</u> .....	73
D. - <u>Déacétylation des LPS</u> .....	73
E. - <u>Recherche d'une sialidase phagique</u> .....	74
 DISCUSSION .....	 75
 CONCLUSION .....	 81
 BIBLIOGRAPHIE .....	 84

## A B R E V I A T I O N S

- o O o -

BSTFA	:	Bis-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide.
$\beta$ -OH C14	:	acide $\beta$ -hydroxymyristique.
C16	:	acide palmitique.
C18	:	acide stéarique.
C20	:	acide arachidique.
CPG	:	chromatographie en phase gazeuse.
DNase	:	désoxyribonucléase.
DOC	:	désoxycholate de sodium.
DO	:	densité optique.
EDTA	:	acide éthylène diamine tétraacétique.
IC	:	ionisation chimique.
IE	:	ionisation électronique.
K	:	constante d'adsorption phagique.
KDO	:	2-céto-3-désoxyoctonate.
LPS	:	lipopolysaccharides.
R-LPS	:	lipopolysaccharides de forme Rough.
S-LPS	:	lipopolysaccharides de forme Smooth.
min	:	minute.
m.o.i.	:	multiplicité d'infection.
RNase	:	ribonucléase.
TNP	:	tampon de non prolifération.

## R E S U M E

L'adsorption d'un bactériophage sur **Rhizobium meliloti** M11S a été étudiée et les récepteurs identifiés.

La détermination de la constante d'adsorption et de la quantité de phages adsorbables par bactérie sont en faveur de sites très accessibles. Les lipopolysaccharides (LPS) sont les récepteurs.

Après extraction par la méthode au phénol-eau et purification, l'analyse des LPS par chromatographie en phase gazeuse a montré l'existence d'une partie lipidique renfermant les acides  $\beta$ -hydroxymyristique, palmitique, stéarique et arachidique et d'un polysaccharide contenant glucose, galactose, glucosamine, 2 céto-désoxy-octonate et une forte proportion d'acides sialiques dont la présence est inhabituelle dans les LPS bactériens.

La spectrométrie de masse a permis l'identification des acides N-acétyl-neuraminique et N-acétyl-9-O-acétyl-neuraminique. La neutralisation des récepteurs phagiques par la lectine spécifique de l'acide N-acétyl-neuraminique et par la déacétylation alcaline du LPS met en évidence l'importance des groupements acétylés des acides sialiques dans l'adsorption du phage.



## A V A N T - P R O P O S

- o O o -

Certains microorganismes ont la capacité de s'associer avec d'autres organismes que l'on qualifiera d'hôtes. Ainsi on parlera :

- de symbiose si un avantage mutuel résulte de l'association entre les 2 partenaires engagés,
- de commensalisme si l'avantage profite à l'un des deux sans désavantage pour l'autre,
- de parasitisme quand le microorganisme possède un pouvoir d'agression vis-à-vis de l'hôte.

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

L'association **Rhizobium**/Légumineuse est le type de symbiose le plus connu, qui offre sur le plan technique et agricole, les plus grandes possibilités d'exploitation. Les bactéries du genre **Rhizobium** induisent sur les racines de certaines Légumineuses la formation de nodules très visibles, qui renferment un complexe enzymatique comprenant la nitrogénase.

Sous le double contrôle végétal et bactérien, de nombreuses molécules sont synthétisées par le nodule. Parmi elles, les leghémoglobines dont la globine est produite par la plante et l'hème par **Rhizobium**. Ces substances se combinent à l'oxygène et assurent le maintien d'une pression partielle en oxygène qui n'inactive pas la nitrogénase. Celle-ci réduit l'azote atmosphérique en ion ammonium qui entre dans le métabolisme végétal par l'intermédiaire du

glutamate. En effet, la glutamine synthétase le modifie en glutamine qui sera ensuite utilisée à la synthèse des composés directement assimilables par la plante (76).

La fixation de l'azote atmosphérique représente ainsi près de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (7). La plante dispose ainsi de substances azotés renouvelables, économiques et non polluantes, contrairement aux engrais chimiques dont l'utilisation intensive présente de nombreux inconvénients :

- coût élevé de fabrication,
- pollution des nappes phréatiques par les engrais eux-mêmes et par leurs produits de décomposition,
- dégradation de la structure du sol par épuisement de la matière organique (non renouvellement du complexe argilo-humique).

Les Légumineuses présentent un triple intérêt agricole : elles laissent dans le sol une grande quantité d'azote, améliorent considérablement la structure du sol et constituent une source alimentaire riche en protéines.

A chaque groupe de Légumineuses correspond une espèce de **Rhizobium** capable de l'infecter, il existe donc une reconnaissance stricte qui constitue la spécificité d'hôte. Elle serait due vraisemblablement à une différence dans la structure des composés chimiques de surface. Les bactéries impliquées portent sur leurs membranes externes des lipopolysaccharides (93). Ces composés auraient des affinités spécifiques avec les lectines présentes à la surface des racines. Il se formerait une liaison qui rendrait possible l'infection.

Ces notions ont permis la classification des **Rhizobium** en 7 groupes d'inoculation (tab. 1) (103).

Plante-hôte	Espèce de <b>Rhizobium</b>	Abréviation	Croissance
Soja	<b>R. japonicum</b>	J	lente
Lupin	<b>R. lupini</b>	K	"
"Cowpea group"	<b>R. cowpea</b>	V	"
Pois	<b>R. leguminosarum</b>	L	rapide
Luzerne	<b>R. meliloti</b>	M	"
Haricot	<b>R. phaseoli</b>	P	"
Trèfle	<b>R. trifolii</b>	T	"

Tableau 1 - Les différents groupes d'inoculation **Rhizobium**-Légumineuses.

La mise en évidence de tous les facteurs qui interviennent dans la fixation de l'azote a fait l'objet de nombreux travaux tant dans le domaine de la génétique et du génie biologique. Ces travaux portent essentiellement sur :

- 1°) l'infection des non légumineuses par des bactéries fixatrices d'azote, telles que des **Rhizobium** ;
- 2°) le transfert des gènes de la fixation d'azote (gènes Nif) au sein des bactéries qui en sont dépourvues et qui peuvent normalement infecter des non légumineuses ;
- 3°) le transfert direct des gènes Nif des bactéries fixatrices dans les cellules des plantes non légumineuses qui les rendraient ainsi aptes à fixer l'azote à condition que l'expression des gènes Nif puisse s'y faire.

Les bactéries du genre **Rhizobium** sont des germes du sol. A ce titre, elles dépendent d'une écologie spécifique car la terre renferme des millions de microorganismes luttant les uns contre les autres.

Les populations de **Rhizobium** sont souvent un mélange de souches. Il est donc à craindre qu'il existe une compétition entre elles pour coloniser une plante donnée.

Il est donc important de connaître les mécanismes intervenant dans cette sélection, même si les recherches actuelles n'apportent pas encore des résultats significatifs.

Les bactériophages capables d'infecter les **Rhizobium** jouent probablement un rôle important dans la nature même si les recherches actuelles (105) ne donnent pas des résultats absolument significatifs.

La relation **Rhizobium**-rhizobiophages ne se limite pas à cet aspect purement sélectif. Elle a été utilisée pour tenter l'identification de souches de **Rhizobium** dans la rhizosphère. Le typage phagique a été suggéré en 1945 par CONN et coll. (19) et plus tard, en 1970, par STANIEWSKI (92).

Les rhizobiophages sont capables de distinguer **R. meliloti** de **R. leguminosarum**, de **R. phaseoli** ou **R. trifolii**. Certains auteurs arrivent à subdiviser 71 souches de **R. meliloti** en 10 groupes par l'utilisation de 7 phages (58).

On voit donc l'intérêt que présente les bactériophages dans la sélection des souches qui vont effectuer la symbiose.

Pour cela, il est intéressant d'étudier la relation phage-bactérie qui finalement peut agir sur le phénomène de la reconnaissance plante-bactérie.

## B U T D U T R A V A I L

- o O o -

Dans notre travail, nous avons étudié l'adsorption des phages chez **Rhizobium**. Cette étape, très importante, conditionne la suite des évènements (le cycle lytique). Cette adsorption est rendue possible par la présence des récepteurs pariétaux bactériens où se fixent les phages grâce à leur plaque terminale et fibres caudales.

Dans un premier temps, nous avons montré que les LPS de **R. meliloti** M115 étaient les récepteurs du phage  $\Phi 4$ . Nous avons précisé quelques facteurs pouvant influencer cette adsorption.

Dans un second temps, nous avons étudié la composition de ces LPS et tenté de situer plus précisément le site d'adsorption.

# GENERALITES

## C H A P I T R E I

### GENERALITES SUR LES BACTERIOPHAGES

- o O o -

#### I. - DECOUVERTE DES BACTERIOPHAGES

Ce sont des virus parasites des bactéries décelables seulement au microscope électronique.

Leur existence a été révélée en 1915 (99) par TWORT qui décrivait, pour la première fois, la transformation vitreuse de certaines colonies de microcoques ; l'infection pouvait être transmise par simple contact de colonie à colonie.

Simultanément, D'HERELLE en 1917 (24), à l'Institut Pasteur de Paris, a découvert un agent infectieux de même type capable de lyser spécifiquement des cultures de **Shigella dysenteriae**. L'agent responsable de cette lyse transmissible est nommé bactériophage.

En 1932, LAIRD (57) démontre qu'il n'est possible de conclure à la présence d'un bactériophage que lorsque l'on est capable de le reproduire indéfiniment sur sa bactérie hôte.

Quelques années plus tard, en 1945 (51) KLECKZKOWSKA 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**.

Chez **Rhizobium trifolii**, MARSHALL en 1956 (65) a mis en évidence le phénomène de la lysogénie. Ce phénomène avait déjà été décrit par E. et E. WOLLMAN en 1933 (109), ils avaient remarqué que dans certaines conditions des bactéries peuvent produire des bactériophages capables de lyser d'autres bactéries, les phages sont alors dits phages tempérés ou prophages.

Les bactériophages ont été également utilisés pour la taxonomie du genre **Rhizobium**. En effet, grâce à la sensibilité des bactéries aux phages spécifiques, de nombreux chercheurs ont pu établir une classification valable de ces bactéries.

En 1980 (89), SIK et coll. ont pu établir la carte génétique d'une souche de **R. meliloti** grâce à la capacité du  $\Phi 11$  de transduire plusieurs gènes à la fois.

## II. - PROPRIETES DES PHAGES ET LEUR CLASSIFICATION

### A. - Principales propriétés des phages

Les bactériophages ont une taille beaucoup plus petite que celle des bactéries. Ce sont des particules visibles uniquement au microscope électronique grâce à l'utilisation de la coloration négative.

Ils sont constitués le plus souvent d'une tête appelée capsid et d'une queue, la capsid renferme un seul type d'acide nucléique, soit ribonucléique (ARN), soit désoxyribonucléique (ADN).

Les bactériophages ne se multiplient pas sur des milieux de culture (aussi riches qu'ils soient), ils ne parviennent à se développer qu'à l'intérieur de la cellule en détournant à leur usage les systèmes enzymatiques préexistants. Ils utilisent aussi pour la synthèse de leurs propres protéines, les ribosomes et les acides nucléiques de transfert de la cellule qu'ils infectent. Le phage manifeste un parasitisme absolu.

### B. - Classification des bactériophages

Les bactériophages sont classés d'après leur morphologie, leurs propriétés physico-chimiques comprenant la vitesse de sédimentation, la densité du phage et la nature de son acide nucléique.

BRADLEY (13) avait classé les phages en six groupes morphologiques (A, B, C, ...) présentant les caractéristiques suivantes (fig. 1) :



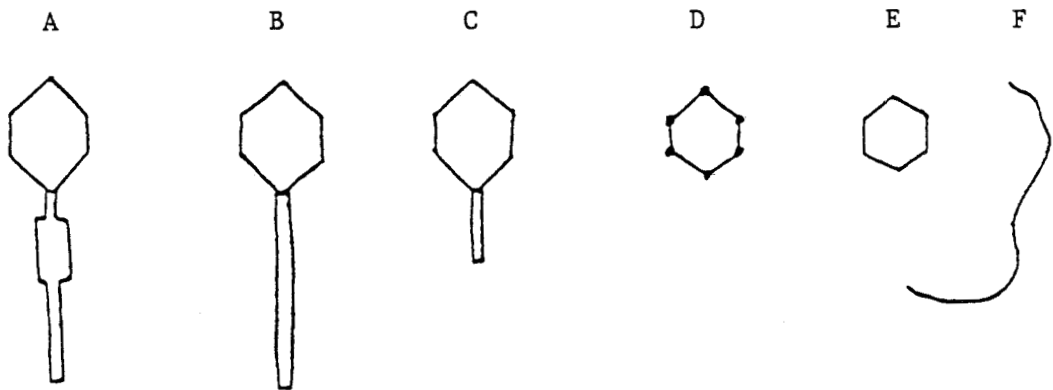


Figure 1 - Les six groupes morphologiques de BRADLEY (13).

- groupe A : tête allongée, queue contractile ;
- B : tête allongée, queue non contractile ;
- C : queue courte non contractile ;
- D : sans queue, à grands capsomères ;
- E : sans queue, à petits capsomères ;
- F : sous forme de filament allongé.

Mais, actuellement, on peut distinguer 12 groupes ou types morphologiques : quatre groupes ont une symétrie hélicoïdale ou cubique, les autres à symétrie binaire correspondent aux phages caudés.

### III. - CYCLE DE MULTIPLICATION DES PHAGES

Pour les phages à ADN, notamment les phages T du groupe A, le cycle de multiplication des phages comprend 3 étapes essentielles.

#### A. - Adsorption du bactériophage sur la bactérie

L'infection par les bactériophages commence par la reconnaissance des récepteurs pariétaux bactériens spécifiques à la plaque basale et fibres caudales du phage.

Ce phénomène d'adsorption présente une certaine spécificité. En effet, un phage ne s'adsorbe pas sur n'importe quelle bactérie.

BAYER (9) suggère que l'attachement des plaques basales se fait au niveau d'une zone de fusion où les membranes externes et internes de la bactérie, adhèrent l'une sur l'autre. L'avantage de ces sites pour les phages est l'absence d'espace périplasmique qui contient généralement des composés toxiques pour le phage.

Dès que le phage est adsorbé d'une façon irréversible sur la bactérie, le lysozyme, situé au niveau de la queue du phage, dépolymérise le mucocomplexe de la paroi bactérienne en coupant les liaisons glycosidiques, ce qui entraîne une diminution de la rigidité de la paroi bactérienne. A ce moment, la gaine du phage se contracte, les fibres caudales se plient et le tube central pénètre dans l'enveloppe bactérienne (fig. 2).

### **B. - Injection de l'ADN viral dans le cytoplasme**

L'injection de l'acide nucléique du phage nécessite la présence d'ATP au niveau de la membrane (73), l'ADN peut ensuite suivre l'une des voies suivantes :

- a) s'intégrer dans le chromosome bactérien. L'ADN phagique se réplique de façon synchrone avec le chromosome bactérien, il s'agit du phénomène de lysogénisation, le bactériophage devient alors un prophage et la bactérie est dite lysogène (fig. 3) ;
- b) être dilué lors de la croissance bactérienne ;
- c) être dégradé par les endonucléases de restriction de la bactérie ;
- d) déclencher le cycle lytique et par conséquent la lyse de la bactérie (fig. 3).

### **C. - Multiplication des phages et lyse bactérienne**

Après injection de l'ADN phagique dans le cytoplasme bactérien, l'information génétique de la bactérie s'arrête : le chromosome bactérien est détruit par une désoxyribonucléase, mais les autres structures cellulaires restent intactes et fonctionnelles, elles vont servir aux synthèses des nouveaux virions.

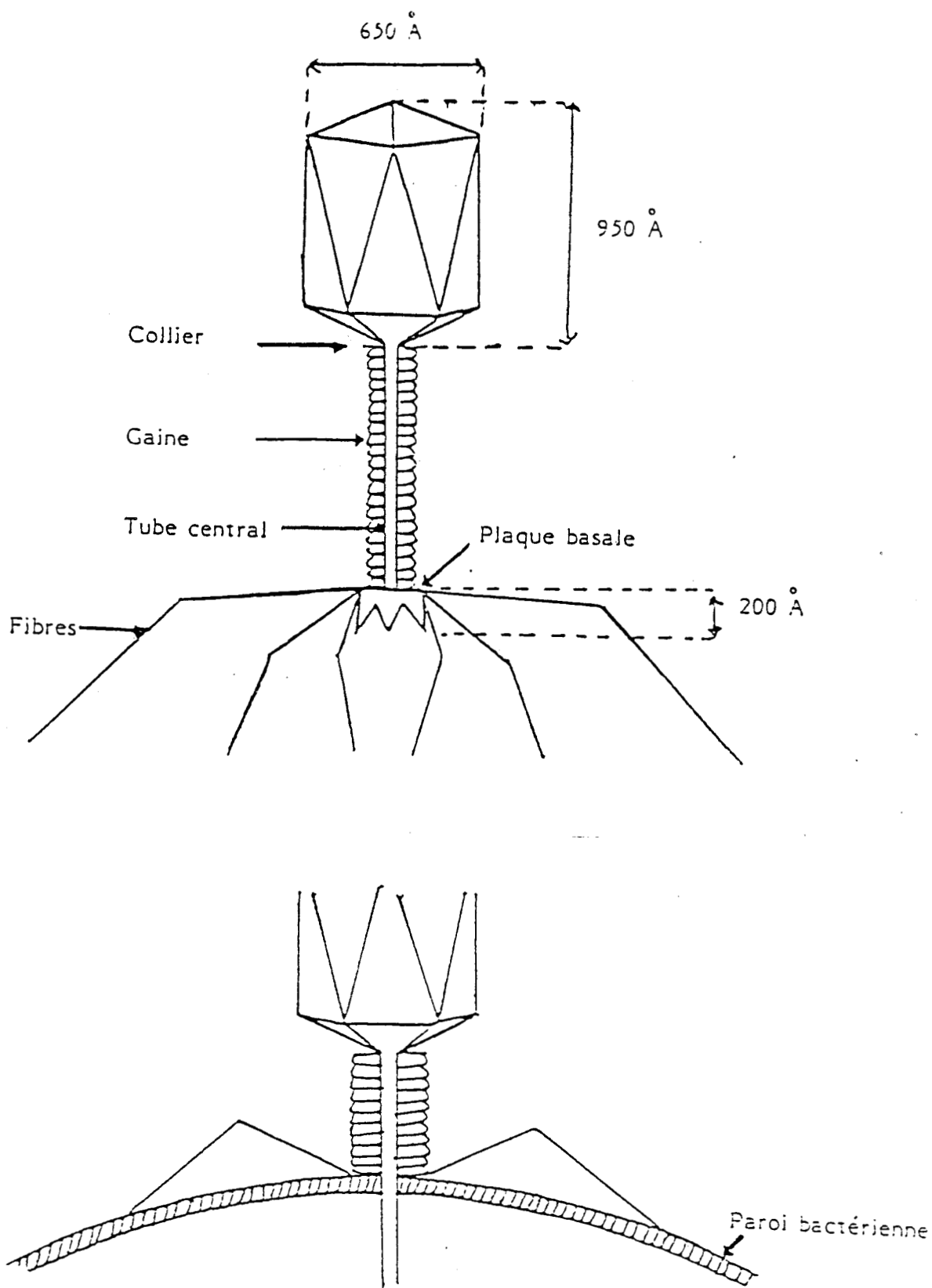


Figure 2 - Représentation schématique du bactériophage T4 chez *E. coli* (94).

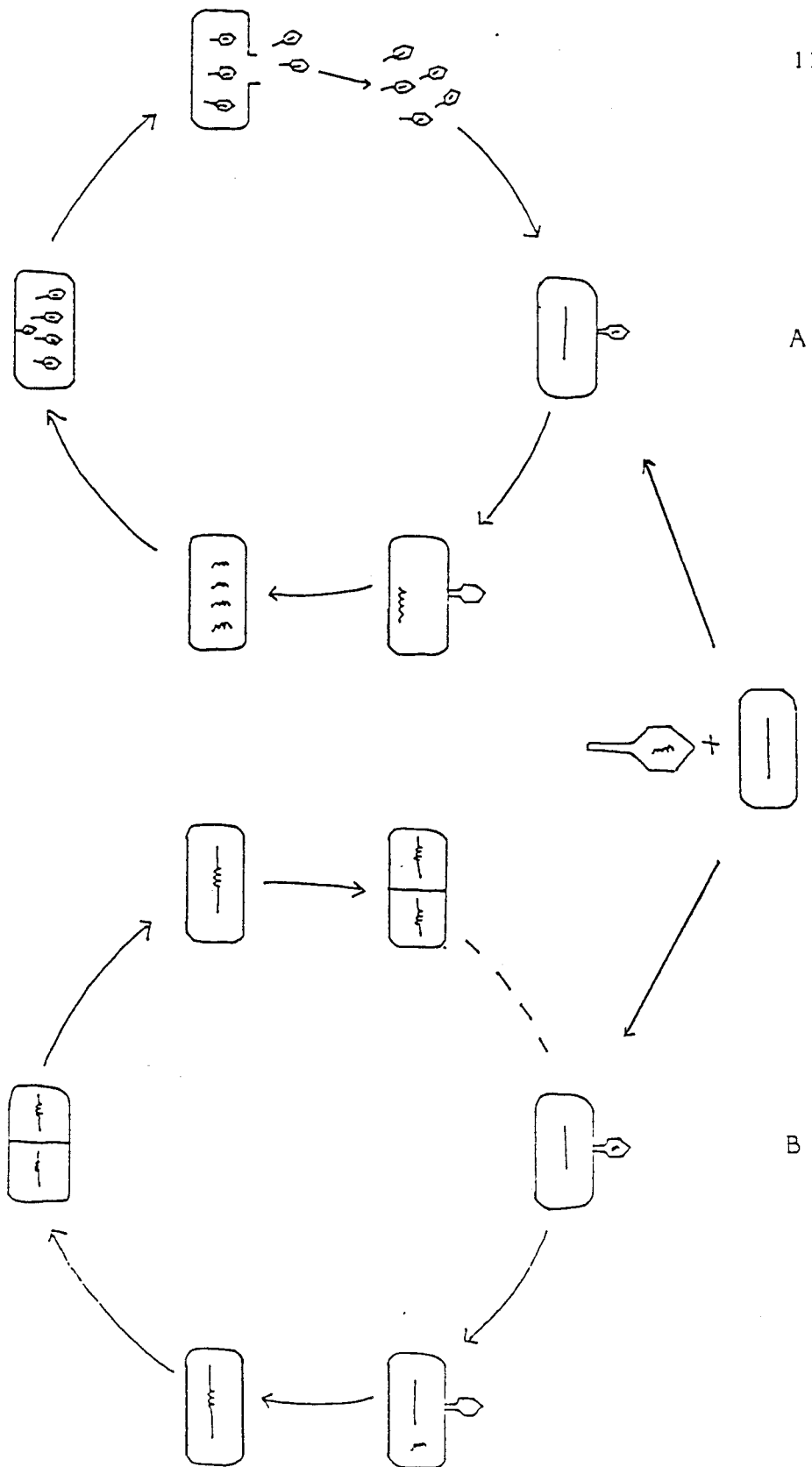


Figure 3 - A : cycle lytique d'un phage virulent.  
B : phénomène de lyogénisation.

— : ADN de la bactérie.  
~~~~~ : ADN du bactériophage.

L'ADN phagique se multiplie à l'intérieur de la bactérie en détournant à son profit tous les débris de l'ADN bactérien et des métabolites présents dans le milieu. Il en est de même pour la synthèse des protéines qui interviennent dans la composition de la tête et de la queue du bactériophage.

Une fois que les nouveaux virions sont synthétisés, la bactérie est lysée pour les libérer. Cette lyse résulte de la destruction de la paroi bactérienne par le lysozyme (29).

Etant donné que la première étape du cycle lytique, à savoir la reconnaissance des sites récepteurs bactériens par le bactériophage, joue un rôle primordial, cette étape a attiré plus particulièrement notre attention. Pour cela, il nous semble nécessaire de donner quelques renseignements sur la paroi bactérienne et d'étudier plus particulièrement les sites récepteurs du bactériophage.

## C H A P I T R E   I I

### LA PAROI BACTERIENNE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF ET LES SITES RECEPTEURS DES BACTERIOPHAGES

- o O o -

**Rhizobium meliloti** étant une bactérie à Gram négatif, nous nous limiterons à l'étude de la paroi de ce type.

#### I. - STRUCTURE MOLECULAIRE

Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi présente une structure stratifiée et hétérogène (fig. 4) comprenant :

- une membrane externe : LPS, protéine et phospholipides ;
- une paroi constituée d'un peptidoglycane dénommé muréine ou mucocomplexe ;
- un espace périplasmique.

#### II. - COMPOSITION CHIMIQUE

La paroi représente 20 % du poids sec de la cellule bactérienne. On y rencontre des éléments diversement représentés selon les espèces. Le tableau 2 résume la composition chimique globale de la paroi chez les bactéries Gram négatif.

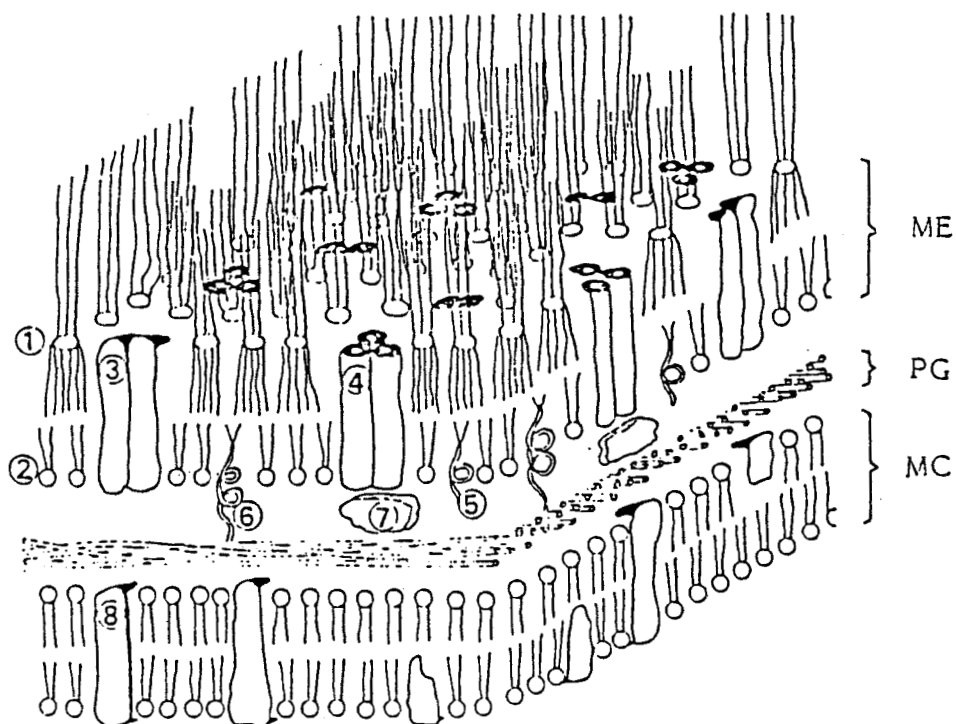


Figure 4 - Schéma des enveloppes cellulaires chez les bacilles à Gram négatif (12).

1 : LPS, 2 : phospholipides, 3-4-7-8 : protéines diverses, 5-6 : lipoprotéines, ME : membrane externe, PG : peptidoglycane, MC : membrane cytoplasmique.

|                             | Bactéries<br>Gram -            |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 1 - Osamines                | +                              |
| 2 - Acides aminés<br>nombre | 50 %<br>16 - 17                |
| acide diamino-<br>pimélique | +<br>n'exclut pas<br>la lysine |
| 3 - Acide teichoïque        | -                              |
| 4 - Oses                    | 20 - 60 %                      |
| 5 - Lipides                 | 10 - 22 %                      |

Tableau 2 - Composition chimique globale de la paroi chez les bactéries Gram négatif selon C. SENEZ (86).

### III. - ROLE DE LA PAROI BACTERIENNE

Après une étude de la composition chimique de la paroi bactérienne, d'autres recherches ont été faites pour connaître son rôle. Ces travaux ont montré que :

- la paroi joue un rôle dans la forme de la cellule et la résistance à la pression interne de la bactérie ;
- certains constituants de la paroi possèdent des propriétés antigéniques tels que les acides teichoïques chez les bactéries à Gram positif et le polysaccharide des LPS chez les bactéries à Gram négatif ;
- enfin, certains sites récepteurs des bactériophages se trouvent localisés au niveau de la paroi bactérienne.

### IV. - NATURE ET LOCALISATION DES SITES RECEPTEURS DES PHAGES

#### A. - La membrane externe des bactéries à Gram négatif

La membrane externe de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif contient des lipopolysaccharides, des phospholipides et des protéines. Ces derniers jouent un rôle important dans l'adsorption des bactériophages notamment chez *Escherichia coli* et *S. typhimurium*.



Le tableau 3, ci-après, rassemble les différentes protéines de la membrane externe et leurs phages correspondants.

Mais les sites récepteurs qui nous concernent le plus sont des lipopolysaccharides.

### 1 - Structure chimique des lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS se trouvent au niveau de la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif. Isolés, ils apparaissent sous forme de rubans en microscopie électronique.

Il existe deux types de LPS (fig. 5) :

- les S-LPS qui sont composés de 3 fractions :
  - . lipide A,
  - . "core" polysaccharidique,
  - . chaînes latérales antigéniques constituées d'unités polysaccharidiques répétitives ;
- les R-LPS ne possédant pas de chaînes latérales et sont donc réduits au core et au lipide A. Ils correspondent à des mutations affectant la biosynthèse du LPS.

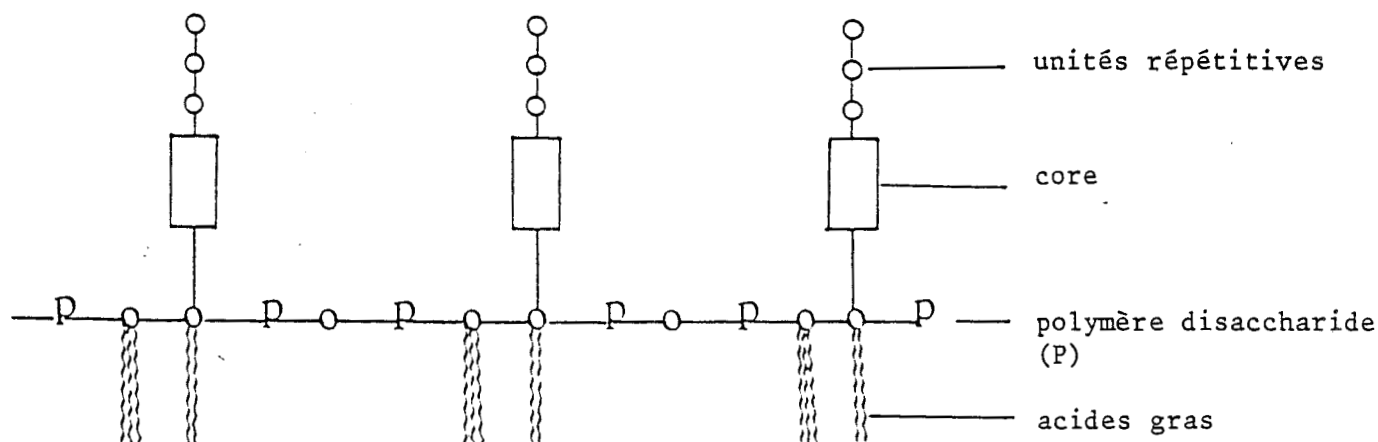


Figure 5 - Les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif (66).

| <b>E. coli</b> |                                                  | <b>S. typhimurium</b> |                           |
|----------------|--------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Protéines      | Phages                                           | Protéines             | Phages                    |
| OmpA           | TuII, K3                                         |                       |                           |
| OmpC           | PA-2, TuIb, 434,<br>MeI, T4 (+ LPS),<br>TP2, SS1 | 36K                   | P221, PH105, PH42         |
| OmpF           | TuIa, TP1, TP2,<br>T2 (+ LPS)                    |                       |                           |
| NumpA          | TC45, TC23<br>K3                                 | 34K                   | PH31, PH51, PH41,<br>PH42 |
| LamB           | $\lambda$ , K10, Tp1, SS1                        |                       |                           |
| TonA           | T1, T5, $\phi$ 80,<br>UC1                        | Si                    | ES18                      |
| BtuB           | BF23                                             | Bfe                   | BF23                      |
| Tsx            | T6 (+ LPS)                                       |                       |                           |

Tableau 3 - Les protéines de la membrane externe et leurs phages correspondants chez *E. coli* et *S. typhimurium* (12).

## 2 - Composition

Les LPS des bactéries à Gram négatif sont également connus sous le nom d'endotoxine, le lipide A est le support de la toxicité et le polysaccharide responsable de la spécificité antigénique du complexe.

### a) Le lipide A

C'est en fait un glycophospholipide. C'est un polymère composé d'unités disaccharidiques de glucosamine reliées entre elles par des ponts pyrophosphates (et) auxquelles sont rattachées de longues chaînes d'acides gras.

En effet, WILKINSON et GALBRAITH (108) ont montré que le lipide A de *P. aeruginosa* contient un disaccharide de glycosamine lié aux acides gras, des traces d'alanine et de galactosamine ont été également détectées chez cette même espèce.

Dans le lipide A, on note la présence constante d'un acide gras en C14 : c'est l'acide  $\beta$ -hydroxymyristique, spécifique et caractéristique de ce lipide A.

Il faut signaler la présence d'autres acides gras en C10 - C12 - C13 - C14 - C15 chez *Pseudomonas*. Ces acides gras peuvent être sous forme hydroxylée ou insaturée. Leur présence et leur taux changent d'une souche de *Pseudomonas* à l'autre (108).

Chez *Rhizobium*, le lipide A contient en plus de l'acide  $\beta$ -hydroxymyristique, des acides myristique, palmitique et stéarique (117).

RUSSA et LORKIEWICZ, en 1974, ont montré que les acides  $\beta$ -hydroxymyristique et  $\beta$ -hydroxy-palmitique sont les principaux acides gras des LPS de *R. trifolii*, avec la présence d'un taux faible de C16 et C18 (80).

PLANQUE *et al.*, en 1979, signalent la présence d'un acide gras principal B-OH C14 et un taux faible d'acide B-OH palmitique et B-OH stéarique dans les LPS des bactéries et bactéroïdes chez *R. leguminosarum* (71).

En 1983, la structure du lipide A des LPS de *S. typhimurium* a été étudiée par TAKAYAMA et coll. (95). La plupart des acides gras sont saturés mais il existe des acides gras sous forme 3-hydroxy. Quelques uns sont liés au groupe 3-hydroxy d'un autre acide gras (fig. 6).

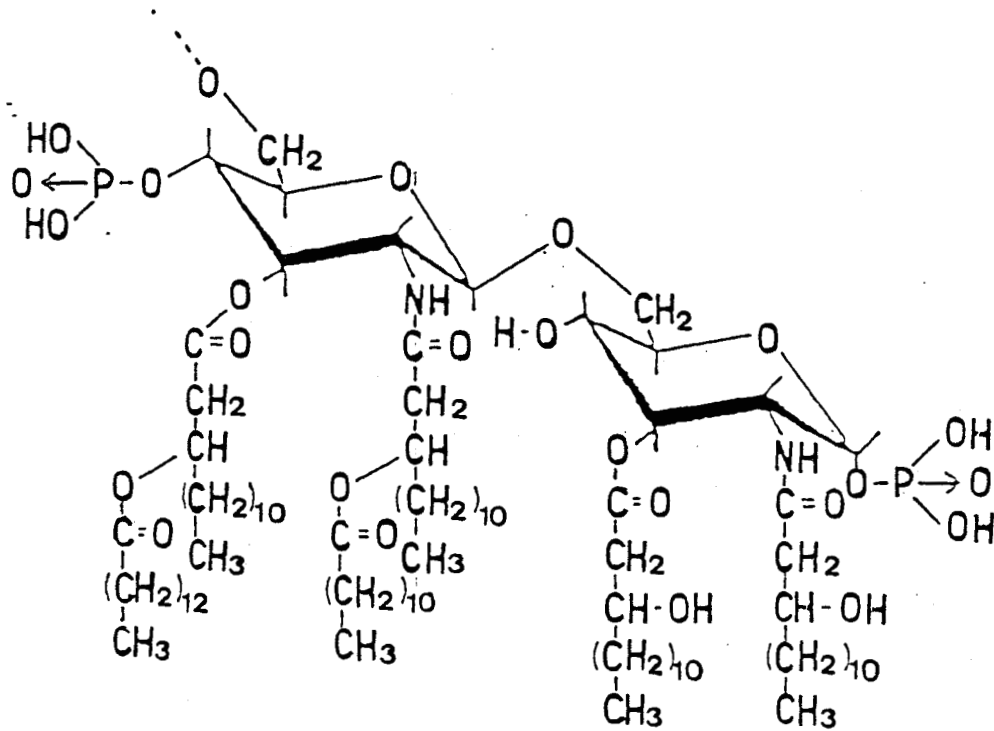


Figure 6 - Structure du lipide A de *S. typhimurium*.

#### b) Le "core" polysaccharidique

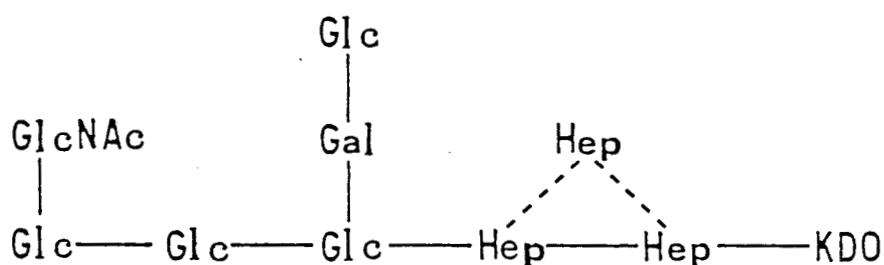
Il est commun à toutes les bactéries à Gram négatif mais sa composition varie sensiblement selon les espèces.

En général, chez *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella*, le core du LPS comprend :

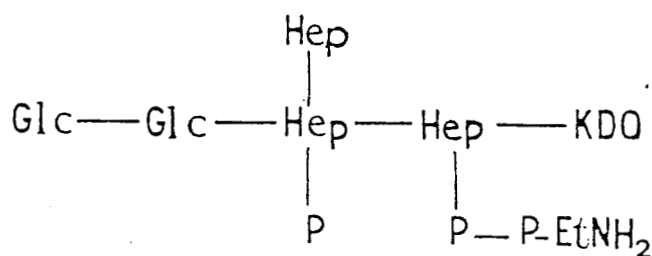
- les oses très divers :
  - . hexoses tels que glucose, galactose, ...
  - . heptose,
  - . osamine tel que N-acétyl-glucosamine ;
- du KDO : 2 céto-3-désoxyoctonate qui relie le lipide A au core.

Chez *E. coli*, plusieurs types de LPS ont été caractérisés et la structure de leur core polysaccharidique dépend de la souche.

HAMMERLING et al. (35) ont proposé pour le core polysaccharidique de la souche 0100 d'*E. coli* la structure suivante :



Une autre souche, celle d'*E. coli* B, a été étudiée par PREHM et al. (72) ; la structure du core polysaccharidique est la suivante :



Le core du LPS de *S. typhimurium* est schématisé ci-dessous (fig. 7).

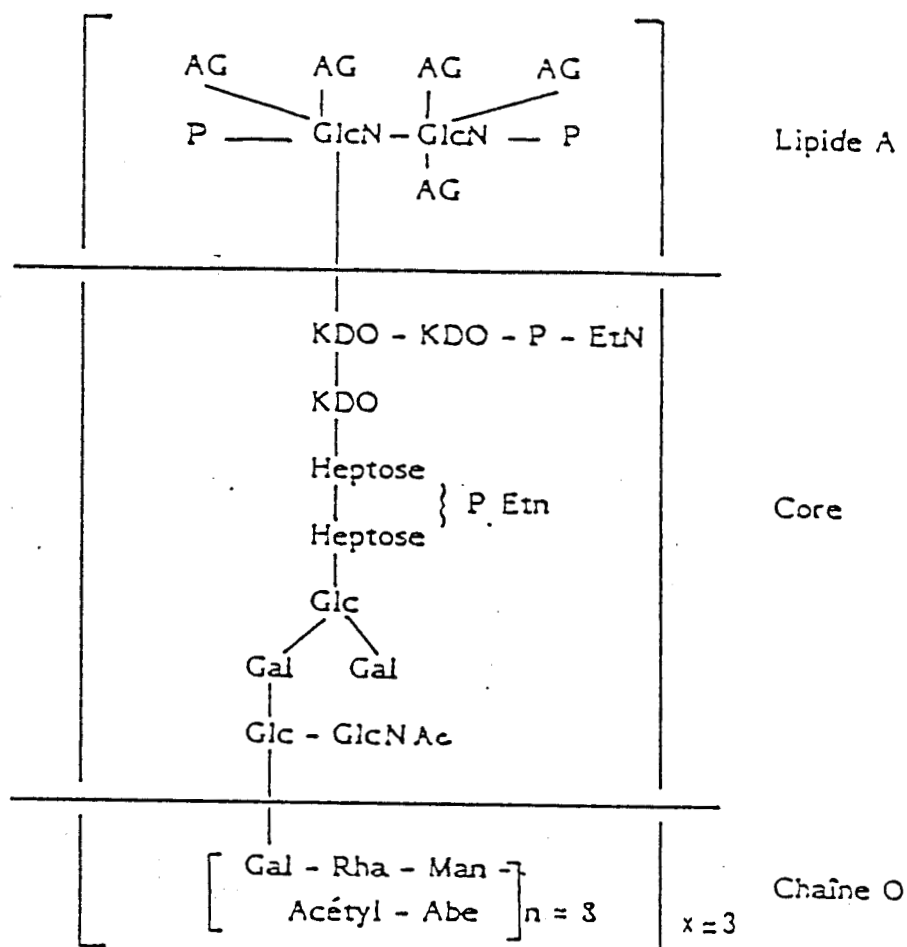


Figure 7 - Représentation schématique de la structure des LPS de *S. typhimurium* d'après LUDERITZ (64), GMEINER et coll. (33), DROGE et coll. (25) et ROMEO et coll. (78).

### c) La chaîne latérale

Chaque chaîne latérale contient les mêmes séquences répétitives constituées de tri, tétra ou pentasaccharides.

Chez les entérobactéries, particulièrement bien étudiées, la chaîne latérale appelée polysaccharide O pour la distinguer du "core" polysaccharidique, comprend en général quatre hexoses : galactose, glucose, rhamnose et mannose ainsi qu'un ou plusieurs sucres inhabituels : les didésoxyhexoses tels que abéquose, colitose, paratose, tyvélose.

La présence, selon les espèces et les souches, de fucosamine et quinovosamine est caractéristique de la chaîne latérale.

Ces chaînes sont plus ou moins longues même à l'intérieur du même microorganisme et peuvent contenir jusqu'à 40 unités répétitives.

Chez *P. aeruginosa* PAO, la chaîne latérale contient du glucose, du rhamnose et de la fucosamine (56).

### 3 - Variabilité des LPS

Dans toutes les espèces, on note une grande variabilité de la composition chimique des LPS. Ainsi, par exemple, le polysaccharide des LPS obtenu à partir de 5 espèces de *Pseudomonas* a été fractionné sur G50 et la composition chimique a été effectuée sur les fractions récupérées à savoir le core et la chaîne latérale (tab. 4) (107).

CHESTER et MEADOW (18) ont mis en évidence l'importance des conditions de culture dans la variabilité des LPS chez *P. aeruginosa*.

Pour les *Rhizobium* à croissance rapide, les LPS ont une composition qui varie autant entre les souches d'une même espèce qu'entre les espèces elles-mêmes [CARLSON et coll. (15), ZEVENHUIZEN et coll. (117), CARLSON (16)].

Les *Rhizobium* à croissance lente n'ont pas encore fait l'objet de telles remarques.

| Espèces               | Chaîne latérale                   | Core polysaccharidique                                                      |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>P. diminuta</b>    | mannose                           | glucose - heptose - KDO                                                     |
| <b>P. pavonacea</b>   | -                                 | glucose - galactose -<br>acide aspartique -<br>KDO                          |
| <b>P. rubescens T</b> | -                                 | glucose - galactose -<br>heptose - EtN                                      |
| <b>P. stutzeri</b>    | quinovosamine<br>galactosamine    | rhamnose - heptose -<br>KDO - glucose ? -<br>glucosamine -<br>galactosamine |
| <b>P. syncyanea</b>   | rhamnose, ribose<br>quinovosamine | glucose - heptose -<br>KDO - alanine -<br>glucosamine -<br>galactosamine    |

Tableau 4 - Composition chimique de la chaîne latérale et du core polysaccharidique de cinq espèces de **Pseudomonas**.



Par ailleurs, chez **R. trifolii**, RUSSA et coll. (81) ont remarqué que l'élimination d'un plasmide entraîne une modification de la composition des LPS.

#### 4 - Rôle des LPS dans l'adsorption phagique

##### a) Récepteurs localisés au niveau du core polysaccharidique

Le core des LPS chez **E. coli**, **Salmonella** et **Shigella** est le plus étudié, de même que les LPS de leurs souches mutantes qui présentent un core polysaccharidique plus ou moins incomplet.

Chez **Salmonella**, le  $\phi$  F0 lyse aussi bien les souches S que les souches R possédant un core complet avec la présence de N-acétyl-glucosamine en position terminale liée en  $\alpha$  (1-2) [LINDBERG (59), LINDBERG et HELLERQUIST (60)]. Pourtant, des souches de **Shigella flexneri** 4bR et 5bR ainsi qu'**E. coli** K12 présentent un core polysaccharidique contenant de la N-acétyl-glucosamine en position terminale mais avec d'autres types de liaisons et le  $\phi$  F0 ne s'adsorbe sur aucune de ces souches (12).

D'autres études ont été faites dans ce domaine par FEIGE et STIRM (28) sur **E. coli** ; ils ont montré que le  $\phi$  X174 lyse la souche **E. coli** C dont le core polysaccharidique contient un résidu terminal de glucose. Mais la structure du core polysaccharidique d'**E. coli**, qui sert de récepteur pour le  $\phi$  X174, diffère de celle qui sert de récepteur pour ce même phage chez **Salmonella**. Ceci montre que ce n'est pas le sucre terminal qui est responsable de la spécificité de l'attachement du phage à la bactérie mais la configuration autour de la liaison terminale glycosidique ; dans ce cas, il s'agit d'un hexose terminal lié en 1-2.

Le core polysaccharidique contenant un résidu de glucose lié à un heptose est le site d'adsorption du  $\phi$  C21 chez trois genres différents : **S. typhimurium** (61), **Shigella flexneri** (36) et chez **E. coli** B et K12 (74). Il en est de même pour le  $\phi$  P2 chez **S. flexneri** (36).

LINDBERG, en 1973 (61), a montré que le site d'adsorption du  $\phi$  P2 chez **E. coli** B, C et K12 contient du glucose et de l'heptose.

Chez *Pseudomonas*, peu de travaux ont été effectués dans ce domaine. Si l'on sait que plusieurs phages [  $\Phi$  PL51, E79, 16, 44, 109, F8, PBI, A7 et 12P (42, 43, 55)] s'accrochent sur les LPS de *P. aeruginosa*, la structure de leurs sites d'adsorption reste encore inconnue.

En 1981, JARRELL et KROPINSKI (44, 45) proposent une structure du core polysaccharidique de la souche PAO chez *Pseudomonas aeruginosa* et celle probable des souches mutantes (fig. 8).

Ainsi, le  $\Phi$  PLS27 s'adsorbe sur les LPS des mutants AK44, AK1012 et AK24 et non sur celui de AK128, montrant l'importance du résidu galactosamine dans l'adsorption de ce phage.

Par contre, le  $\Phi$  T7 s'adsorbe sur les LPS de toutes les souches mutantes, il se peut donc que le site d'adsorption du  $\Phi$  T7 est la région de l'heptose des LPS chez *P. aeruginosa*.

#### Chaîne latérale

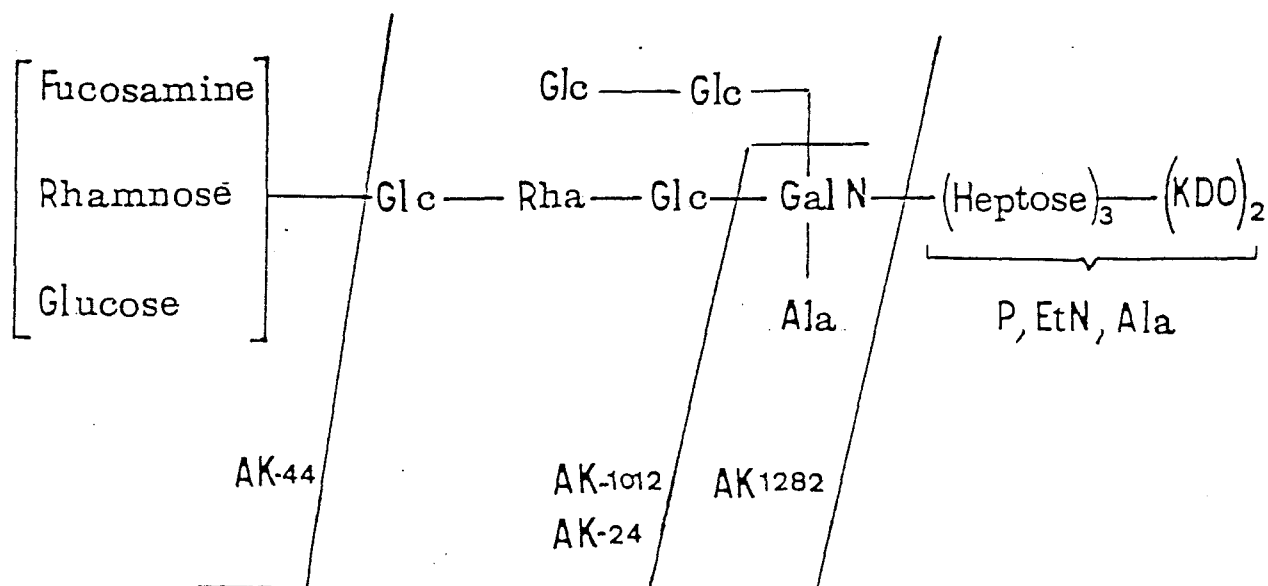


Figure 8 - Structure du core polysaccharidique de la souche PAO chez *P. aeruginosa* et celle des souches mutantes (44, 45).

## b) Récepteurs localisés dans la chaîne latérale

La plupart des phages s'adsorbant sur la chaîne latérale appartiennent au groupe C de la classification de BRADLEY (13).

Pour les phages de **R. trifolii**, BARNET et VINCENT situent l'adsorption dans la chaîne latérale, de même pour le phage F20 de **R. meliloti** (101). Ce site pourrait être sous le contrôle de plasmides. Ainsi, CORRALL et coll. (20) ont montré que la sensibilité aux phages chez **R. meliloti** pourrait être due à la présence d'un plasmide. Un autre aspect de ce phénomène a été étudié par SAHIM (82).

Plusieurs souches de **R. meliloti** ont été utilisées : une souche sauvage possédant deux plasmides et deux variantes de cette souche (l'une n'a qu'un plasmide, l'autre a perdu les deux plasmides). Les trois souches ont été mises en présence du même phage. Il a été observé que dans tous les cas où les clones de **R. meliloti** ont perdu un ou deux plasmides, l'efficacité du phage est devenue nulle. Les résultats ainsi obtenus sont en corrélation avec une adsorption qui ne s'effectue pas.

L'adsorption sur l'antigène O est souvent suivie d'une hydrolyse enzymatique de la chaîne polysaccharidique.

Ainsi, KANEGASAKI et coll. (48) ont montré que le  $\Phi\epsilon 15$  s'adsorbe sur la chaîne latérale de **Salmonella anatum** et possède une activité enzymatique hydrolysant la liaison Rha  $1 \xrightarrow{\alpha} 3$  Gal, de même que le  $\Phi P22$  chez **S. typhimurium** (37, 39).

Le  $\Phi\epsilon 34$  hydrolyse la liaison Gal  $1 \xrightarrow{\beta} 6$  Man de la chaîne latérale chez **S. newington** [IWASHITA et KANEGASAKI (38)].

Le  $\phi 1$  (40) possède aussi une activité enzymatique de type 1-3 N-acétyl-galactosaminidase chez **S. johannesburg** (17, 32).

D'autres phages possèdent aussi une activité enzymatique chez **Salmonella**, **E. coli** et **Shigella**. Le tableau 5 résume la structure chimique de la chaîne latérale de leurs LPS et le site d'action de leurs enzymes phagiques correspondants.

| Phage           | Espèce                                   | Site d'action de l'enzyme phagique (†)                                                                                                                                                                                                                                 | Réf.   |
|-----------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| $\epsilon 15$   | <i>S. anatum</i> (E)                     | $  \begin{array}{c}  \text{OAc} \\    \\  6 \\    \\  6\text{-Man-1} \xrightarrow{\beta} 4\text{-Rha-1} \xrightarrow{\alpha} 3\text{-Gal-1} \xrightarrow{\alpha} 6 \\  \uparrow  \end{array}  $                                                                        | 48     |
| P22             | <i>S. typhimurium</i> (B)                | $  \begin{array}{c}  \text{D)H} \\    \\  1 \\    \\  \alpha \\    \\  3 \\    \\  2\text{-Man-1} \xrightarrow{\alpha} 4\text{-Rha-1} \xrightarrow{\alpha} 3\text{-Gal-1} \xrightarrow{\alpha} 6 \\  \uparrow  \end{array}  $                                          | 37,39  |
| $\epsilon 34$   | <i>S. newington</i> (E)                  | $  \begin{array}{c}  6 \\    \\  6\text{-Man-1} \xrightarrow{\beta} 4\text{-Rha-1} \xrightarrow{\alpha} 3\text{-Gal-1} \xrightarrow{\beta} 6 \\  \uparrow  \end{array}  $                                                                                              | 38     |
| c341            | <i>S. anatum</i> (E)                     | $  \begin{array}{c}  \text{OAc} \\    \\  6 \\    \\  6\text{-Man-1} \xrightarrow{\beta} 4\text{-Rha-1} \xrightarrow{\alpha} 3\text{-Gal-1} \xrightarrow{\alpha} 6 \\  \uparrow  \end{array}  $                                                                        | 40     |
| $\varphi 1(40)$ | <i>S. johannesburg</i> (R <sup>-</sup> ) | $  \begin{array}{c}  \text{GlcNAc} \\    \\  1 \\    \\  \beta \\    \\  3 \\    \\  4\text{-GalNAc-1} \xrightarrow{\alpha} 3\text{-Man-1} \xrightarrow{\alpha} 4\text{-Glc-1} \xrightarrow{\alpha} 6 \\  \uparrow \\    \\  6 \\    \\  \text{GalNAc}  \end{array}  $ | 17, 32 |
| $\Omega 8$      | <i>E. coli</i> (O8)                      | $  \begin{array}{c}  3 \\    \\  3\text{-Man-1} \xrightarrow{\alpha} 2\text{-Man-1} \xrightarrow{\alpha} 2\text{-Man-1} \xrightarrow{\alpha} 3 \\  \uparrow  \end{array}  $                                                                                            | 75     |
| S16             | <i>S. flexneri</i> (Y)                   | $  \begin{array}{c}  3 \\    \\  3\text{-GlcNAc-1} \xrightarrow{\beta} 2\text{-Rha-1} \xrightarrow{\alpha} 2\text{-Rha-1} \xrightarrow{\alpha} 3\text{-Rha-1} \xrightarrow{\alpha} 6 \\  \uparrow  \end{array}  $                                                      | 31     |

Tableau 5 - Structure de la chaîne antigénique O des LPS chez *Salmonella*, *E. coli* et *Shigella*, et le site d'action de leurs enzymes phagiques.

## B. - Les polysaccharides externes

De nombreuses bactéries sont entourées d'une couche externe dite capsule : cette capsule entre en interaction avec des bactériophages.

En général, cette interaction est suivie d'une dégradation du polysaccharide capsulaire. Ceci a été montré chez de nombreuses espèces.

Le  $\phi$  63 (groupe C) dépolymérise l'exopolysaccharide de **Klebsiella** K63 (27) et chez **R. japonicum**, le  $\phi$  M-1 a une action endoglycanhydrolase sur les exopolysaccharides capsulaires de cette bactérie (22). Toutefois, la capsule peut également masquer les sites récepteurs de certains bactériophages (11).

D'autres bactéries possèdent des pili (appendices filamenteux) qui ont été observés en microscopie électronique. Plusieurs phages du groupe B s'adsorbent sur les pili (14, 69, 70, 85). Cette interaction a été observée en microscopie électronique avec le phage M6 chez **Pseudomonas aeruginosa** (14) et le phage  $\phi$  6 chez **Caulobacter vibrioides** (85).

Les flagelles peuvent aussi être les sites récepteurs des bactériophages, tel est le cas des phages suivants :  $\phi\lambda$  chez **Salmonella** (61),  $\phi$ AcM4 et  $\phi$ AcS2 chez **Asticcacaulis biprosthecum** (69).

MATERIEL ET METHODES

## I. - SOUCHES BACTERIENNES

Le tableau 6 représente les souches bactériennes utilisées.

| Espèce             | Souche | Origine  |
|--------------------|--------|----------|
| <b>R. meliloti</b> | M11S   | U.S.T.L. |
|                    | M5N1   | "        |
|                    | M9S    | "        |
|                    | M2S    | "        |
|                    | M3S    | "        |

Tableau 6 - Souches bactériennes utilisées.

U.S.T.L. : Université des Sciences et Techniques de Lille

Les souches de **R. meliloti** sont cultivées dans un milieu RC fructosé à 1 %, sous agitation à 30°C pendant 15 à 18 h.

Elles sont conservées à - 20°C dans un milieu RC fructosé à 1 % et glycérolé à 20 %.

## II. - SOUCHE DE BACTERIOPHAGE

Le phage  $\Phi$  4 utilisé, de la famille **Siphoviridae**, correspond au groupe morphologique B de la classification de BRADLEY (13). La tête est icosaédrale avec un diamètre de 64 nm. La queue non contractile a une longueur de 111 nm et un diamètre de 8 nm. Il est aussi dénommé  $\Phi$  NM8 et appartient à la collection du laboratoire.

ARBER et LINN (5) ont suggéré une notation des phages selon la souche sur laquelle ils ont été cultivés. Le  $\Phi$  4 cultivé sur **R. meliloti** M11S, par exemple, sera noté  $\Phi$  4.M11S. Les suspensions bactériophagiques sont conservées à + 4°C dans un milieu RC fructosé à 1 %.

### III. - MILIEUX DE CULTURE ET TAMPONS

#### A. - Milieu Rhizobium complet (RC)

C'est un milieu mis au point par DELATTRE (23).

|                                             |     |   |
|---------------------------------------------|-----|---|
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O ..... | 0,2 | g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....       | 1   | g |
| Extrait de levure .....                     | 1   | g |
| Eau distillée q.s.p. ....                   | 1   | l |

Le pH est ajusté entre 7,2 et 7,5

La stérilisation est effectuée à 120°C pendant 20 min. Le milieu RC gélosé (RCG) est obtenu par addition de 15 g d'agar Difco par litre.

Les milieux RC et RCG sont utilisés pour cultiver des souches de **Rhizobium**.

#### B. - Tampon de non prolifération (TNP)

|                                             |     |   |
|---------------------------------------------|-----|---|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....       | 1   | g |
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O ..... | 0,2 | g |
| Eau distillée q.s.p. ....                   | 1   | l |

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

#### C. - Source de carbone

Le fructose a été choisi comme source de carbone à 1 % en concentration finale dans les milieux de culture. Il constitue une source de carbone intéressante car sa dégradation métabolique par **R. meliloti** ne provoque pas, contrairement au glucose, une acidification du milieu. Cette acidification serait préjudiciable à la croissance bactérienne.

La stérilisation est effectuée à 105°C pendant 30 min.



**D. - Milieu gélosé pour bactériophages**

|                                                             |        |
|-------------------------------------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O ..... | 0,45 g |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10H <sub>2</sub> O .....  | 0,06 g |
| KNO <sub>3</sub> .....                                      | 0,06 g |
| FeCl <sub>3</sub> (1 ml d'une solution à 1 %) .....         | 0,01 g |
| CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O .....                 | 0,06 g |
| MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O .....                 | 0,1 g  |
| Mannitol .....                                              | 10 g   |
| Agar .....                                                  | 7,5 g  |
| Eau distillée q.s.p. ....                                   | 1 l    |

Après ébullition, le milieu est réparti en flacons par dose de 100 ml. La stérilisation s'effectue à 105°C pendant 30 min.

Ce milieu est utilisé pour multiplier les bactériophages.

**E. - Tampon P.B.S.**

|                                             |        |
|---------------------------------------------|--------|
| NaCl .....                                  | 8 g    |
| KCl .....                                   | 0,2 g  |
| Na <sub>2</sub> HB <sub>4</sub> .....       | 1,15 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....       | 0,2 g  |
| CaCl <sub>2</sub> .....                     | 0,1 g  |
| MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O ..... | 0,1 g  |
| Eau distillée q.s.p. ....                   | 1 l    |

**F. - Tampon phosphate**

- x ml de phosphate monosodique 0,02 M (2,78 g dans 1 000 ml) ;
- y ml de phosphate dissodique 0,02 M (5,36 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O ou 7,17 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O dans 1 000 ml) ;
- q.s.p. 200 ml.

Pour pH = 7, on mélange 39 ml de phosphate monosodique et 61 ml de phosphate disodique.

### G. - Tampon acétate

- x ml d'acide acétique 0,04 M (3,10 ml dans 1 000 ml) ;
- y ml d'acétate de sodium 0,04 M (3,28 g de  $C_2H_3O_2Na$  ou 5,44 g de  $C_2H_3O_2Na, 3H_2O$  dans 1 000 ml) ;
- q.s.p. 100 ml.

Pour pH = 5, on mélange 14,8 ml d'acide acétique et 35,2 ml d'acétate de sodium.

## IV. - STOCK DE BACTERIOPHAGES

Pour préparer un stock de bactériophages, il faut utiliser des bactéries sensibles aux phages que l'on désire multiplier.

### A. - Croissance bactérienne

Les tubes contenant les souches bactériennes glycérolées sont décongelés à la température ambiante. On ensemence généralement le milieu RC fructosé par un inoculum de sorte que la dilution soit d'environ 1 %.

L'incubation a lieu à 30°C pendant 15 à 18 h.

Une agitation des tubes permet une oxygénation du milieu et favorise ainsi la croissance bactérienne.

### B. - Préparation du stock

La technique utilisée est celle de ADAMS (2).

- 0,3 ml d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance est ajouté à 0,1 ml d'une suspension phagique pure. Le témoin est réalisé en ajoutant 0,3 ml d'une culture bactérienne à 0,1 ml de RC fructosé à 1 %.

- Après 20 min de contact, sans agitation, à la température ambiante afin que les phages puissent s'adsorber sur les bactéries, on ajoute 3 ml de gélose bactériophage maintenue liquide à 45°C.
- Après incubation à 25°C pendant 18 heures, la lyse est complète et la gélose bactériophage dans laquelle se sont multipliés les phages est récupérée dans des pots de centrifugation, éventuellement additionnée de RC fructosé. Après homogénéisation, on laisse reposer pendant 15 min à la température ambiante.
- Une centrifugation est faite à 10 000 tours/min pendant 20 min, le surnageant contenant les phages est récupéré et définitivement débarrassé des débris bactériens par filtration sur membrane Millipore de porosité 0,22 µm.

### **C. - Dosage du stock de phages**

Des dilutions de la suspension phagique de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  ont été réalisées.

- 0,1 ml de chaque dilution est ajouté à 0,3 ml d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Le témoin comprend 0,3 ml d'une culture bactérienne et 0,1 ml de RC fructosé.
- Après 20 min de contact à la température ambiante, on ajoute 3 ml de gélose bactériophage, le tout est coulé à la surface de RCG fructosé dans des boîtes de Petri.
- L'incubation a lieu à 25°C pendant 24 à 48 h.
- La lyse des bactéries par les bactériophages entraîne la formation d'une zone claire appelée plage de lyse. Un seul bactériophage est à l'origine d'une plage de lyse.
- Les plages de lyse sont comptées et le titre de la suspension phagique peut être obtenu en multipliant le nombre des plages formées par le facteur de dilution. Ce titre est ramené au nombre de phages par millilitre.

## V. - ETUDE DE L'ADSORPTION PHAGIQUE CHEZ R. MELILOTI

### A. - Cinétique de l'adsorption phagique

Le phage  $\Phi 4.M11S$  est mis en présence des souches de **R. meliloti** M11S et M5N1. Des prélèvements de 0,1 ml, effectués à différents temps, sont placés dans une solution contenant 9,5 ml de RC et 0,4 ml de chloroforme maintenue à + 4°C pour arrêter l'adsorption.

Après centrifugation à 10 000 tours/min pendant 15 min, les phages libres non adsorbés restent dans le surnageant et sont dénombrés sur la souche indicatrice (M11S).

Le calcul du pourcentage de phages adsorbés se fait de la façon suivante :

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

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

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

### B. - Estimation du nombre de phages qui s'adsorbent sur une bactérie

- 100 ml de RC fructosé à 1 % sont inoculés par 1 ml d'échantillon congelé de **R. meliloti** M11S et incubés sous agitation à 30°C pendant 18 h.
- Après centrifugation à 5 000 tours/min pendant 20 min, le culot est remis en suspension dans du TNP puis recentrifugé.
- Le culot est dilué dans du RC fructosé de façon à obtenir une densité optique (DO) à 600 nm de 0,01 correspondant à 10<sup>7</sup> bactéries/ml.
- Dans différents tubes, on met en contact les bactéries avec les phages de telle sorte que la multiplicité d'infection (m.o.i.) soit différente d'un tube à l'autre (la m.o.i. représente le nombre de phages utilisés par bactérie).

- Après 20 min de contact, le volume final est complété à 1 ml puis centrifugé à 10 000 tours/min pendant 15 min.
- Les phages non adsorbés sont dosés dans le surnageant.

## VI. - METHODES DE DOSAGES

### A. - Acides nucléiques

On mesure la DO à une longueur d'onde de 260 nm d'une solution de LPS de concentration connue. Sachant que DO égale à 1 correspond à 50 µg d'acides nucléiques, on pourra déduire la quantité d'acides nucléiques contenus dans la solution des LPS de *R. meliloti* M11S.

### B. - Protéines selon la méthode de LOWRY (63)

#### Réactifs

|           |   |                                       |     |    |
|-----------|---|---------------------------------------|-----|----|
| Réactif 1 | : | NaOH .....                            | 8   | g  |
|           |   | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ..... | 21  | g  |
|           |   | Eau distillée q.s.p. ....             | 1   | l  |
| Réactif 2 | : | CuSO <sub>4</sub> .....               | 1   | g  |
|           |   | Eau distillée q.s.p. ....             | 500 | ml |
| Réactif 3 | : | Tartrate double Na et K .....         | 2   | g  |
|           |   | Eau distillée .....                   | 500 | ml |

#### Réalisation du dosage

- 0,5 ml de solution à doser.
- 0,5 ml de réactif 2 ; 0,5 ml de réactif 3.
- Agiter.
- 4 ml de réactif 1.
- 1 ml de réactif de Folin dilué au 1/3.
- 10 min à l'obscurité et lecture à 750 nm.

Une gamme étalon a été faite en utilisant une solution-mère de sérum albumine à 40 mg/ml que l'on dilue au 1/100ème (solution utilisée : 400 µg/ml).

### C. - Sucre : phénol-sulfurique (26)

- 1 ml de solution à doser.
- 1 ml de solution aqueuse de phénol à 5 %.
- Agiter.
- 5 ml d' $H_2SO_4$  pur, agiter.
- 5 min à 100°C.
- 30 min à l'obscurité.
- Lecture à 492 nm.

### D. - Acide sialique : méthode d'AMINOFF (4)

Cette technique permet de doser les acides sialiques libres. Une hydrolyse éventuelle du produit se fait avec l'acide sulfurique 0,01 N à 100°C pendant 3 h.

#### Réactifs

- Solution d'acide périodique 25 mM dans l'acide sulfurique 0,125 N ajustée à pH = 1,2
- Solution d'arsénite de Na à 2 % dans l'acide chlorhydrique 0,5 N.
- Solution d'acide thiobarbiturique 0,1 M dans l'eau bidistillée ajustée à pH = 9 avec de la soude. Le réactif est stable pendant un mois à + 4°C à l'obscurité.
- Solution de n-butanol contenant 5 % d'acide chlorhydrique concentré.

#### Développement de la coloration

- Dans des tubes est introduit 0,5 ml de la solution à doser renfermant de 5 à 40 µg d'acides sialiques et 0,25 ml de la solution périodique.

- Les tubes sont agités et placés 30 min à 37°C.
- L'excès de périodate est éliminé par addition de 0,2 ml de la solution d'arsénite de Na. Dès que la coloration jaune disparaît, on ajoute 0,2 ml de réactif à l'acide thiobarbiturique.
- Les tubes bouchés, sont placés au bain-marie bouillant pendant 7,5 min. Ils sont ensuite refroidis dans un bain d'eau glacée.
- La coloration est extraite avec 5 ml de n-butanol chlorhydrique.
- La phase alcoolique est séparée par centrifugation et les mesures d'absorbance sont effectuées à 549 nm. Les valeurs restent constantes malgré une décoloration progressive de la solution.

## VII. - PREPARATION ET CARACTERISATION DES LIPOPOLYSACCHARIDES

### A. - Extraction des lipopolysaccharides

#### 1 - Technique de WESTPHAL (106)

- Dans une fiole à toxine contenant un litre de milieu RC fructosé à 1 %, on ajoute une préculture de la souche bactérienne de **R. meliloti**.
- Incubation, sous agitation à 30°C, pendant 18 h.
- Centrifugation à 5 000 tours/min pendant 20 min, le culot est dissous dans du TNP puis centrifugé.
- Le culot est remis en suspension dans 5 ml d'eau distillée auxquels on ajoute 5 ml d'eau phénolée (90 ml de phénol plus 10 ml d'eau distillée). Le tout est porté au bain-marie à 70°C pendant 30 min.
- Après centrifugation, on récupère la phase aqueuse ; une deuxième extraction est réalisée sur la phase insoluble (résidu).

- Une nouvelle centrifugation rassemble les différentes fractions et on laisse décanter une dizaine d'heures à + 4°C (phase phénolique - phase aqueuse et le résidu).
- Pour éliminer les acides nucléiques et les exopolysaccharides (EPS), la phase aqueuse est additionnée de 2 volumes d'éthanol, puis centrifugée à 5 000 tours/min pendant 15 min. Le surnageant est additionné de 4 volumes d'éthanol et de 6 ml d'éthanol saturé en acétate de sodium, les LPS sont récupérés par centrifugation.
- Le culot (LPS) est remis en suspension dans 2 ml d'eau distillée.
- La fraction phénolique, le résidu et les LPS sont dialysés contre l'eau distillée à + 4°C pendant 24 h.

## 2 - Technique de GALANOS (30)

- Les bactéries sont cultivées de la même façon que précédemment.
- Après centrifugation, le culot est lavé successivement avec de l'éthanol, de l'acétone et de l'éther. Il est ensuite séché dans un dessiccateur en présence de  $\text{CaCl}_2$  jusqu'à l'obtention d'un poids constant.
- 50 g de poids sec bactérien sont additionnés à 200 ml d'un mélange d'extraction : phénol (90 g plus 11 ml d'eau distillée)/chloroforme/éther de pétrole (2/5/8 en volume).
- Homogénéisation pendant 2 min à une température comprise entre 5°C et 20°C jusqu'à l'obtention d'une suspension fine.

Si la suspension reste visqueuse, on ajoute à nouveau du mélange d'extraction.

- Centrifugation à 5 000 tours/min pendant 15 min.
- Le surnageant contenant les LPS est filtré à travers un papier filtre. L'extraction est répétée 3 fois sur le culot.
- On rassemble les différents surnageants ainsi obtenus.



- L'éther de pétrole et le chloroforme sont éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif (30 à 40°C).
- La solution est récupérée dans un récipient et on ajoute de l'eau distillée jusqu'à obtention d'un précipité (LPS).
- Centrifugation à 3 000 tours/min pendant 10 min.
- Les LPS sont dissous dans de l'eau distillée et dégazés sous vide.
- Centrifugation à 100 000 g pendant 4 h, le culot est récupéré.

## **B. - Purification des lipopolysaccharides (68)**

### **1 - Traitement à la DNase, RNase et pronase**

Les LPS de **R. meliloti** M11S préparés par la technique de WESTPHAL (106) subissent les traitements suivants :

#### Etape 1 : traitement à la DNase

Les LPS sont concentrés sous vide au 1/5 du volume à une température comprise entre 40°C et 45°C. Ils sont ensuite mis dans le tampon phosphate 0,01 M (pH = 7) contenant  $MgCl_2$  0,01 M auquel on ajoute la DNase à la concentration finale de 10 µg/ml. Le mélange est laissé à 37°C pendant 1 h. La solution est centrifugée à 3 500 g pendant 5 min. Le surnageant est dialysé contre 20 volumes d'EDTA 2 mM pendant une nuit.

#### Etape 2 : traitement à la RNase

Le dialysat est mis dans le tampon acétate 0,02 M, la RNase est additionnée à une concentration finale de 10 µg/ml. Le tout est laissé à 37°C pendant 3 h. Le mélange est centrifugé à 78 000 g pendant 4 h. Le culot est remis en suspension dans l'eau distillée.

### Etape 3 : Digestion de la pronase

La solution ainsi obtenue à l'étape précédente est mise en incubation à 30°C pendant 2 h après avoir ajouté le tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane-HCl 0,1 M (pH = 7,8) et la pronase E (0,5 mg/ml). Le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 5 min. On garde le surnageant.

### Etape 4 : Ultracentrifugations

Le surnageant ainsi récupéré est centrifugé à 78 000 g pendant 4 h. Le culot est remis en suspension dans l'eau distillée et centrifugé une deuxième fois dans les mêmes conditions. Le culot final est dissous dans l'eau distillée puis lyophilisé.

#### **2 - Purification de l'extrait phénol/eau par chromatographie de gel de filtration**

L'extrait phénol/eau de **R. meliloti** M11S, traité à la DNase, RNase et pronase, est purifié sur Sephadex G50 (1,5 x 130 cm) ; éluant : eau distillée, débit : 10 ml/h, fraction de 2 ml/tube. Repérage du matériel glucidique par le réactif au phénol-sulfurique.

#### **3 - Chromatographie liquide de haute performance (CLHP)**

La chromatographie liquide de haute performance est réalisée à l'aide d'un chromatographe liquide de haute pression (Spectra Physic Apparatus) sur une colonne d'échange anionique (250 x 4,6 mm D.I) (Brownlee Labs Inc., Santa Clara, CA, USA).

- La fraction contenant les LPS (2,5 mg) dissous dans 1 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 6,5 est injectée en CLHP.
- La colonne est lavée avec le même tampon pendant 10 min puis un gradient linéaire de NaCl de 0 à 500 mM est appliqué pendant 15 min suivi d'une élution isocratique avec le même tampon pendant 20 min.
- Le débit est de 1 ml/min.

- La détection des pics se fait à 206 nm.
- Les fractions sont récupérées et analysées en CPG après méthanolyse et trifluoroacétylation.

### **C. - Caractérisation des LPS**

#### **1 - Microscopie électronique**

- Les LPS sont mis en solution dans l'eau distillée à une concentration de 1 mg/ml.
- Les grilles ont été préparées selon la technique suivante :
  - . utiliser des grilles recouvertes d'une membrane de Parlodion carbonée ;
  - . déposer une goutte de la solution des LPS sur la grille et laisser sédimenter environ 2 min ;
  - . absorber la goutte avec du papier filtre ;
  - . déposer la grille pendant 1 min sur la solution aqueuse d'acétate d'uranyle (2 %) ;
  - . absorber l'excès de colorant.
- Les grilles sont séchées à la température ambiante, ensuite elles sont observées au microscope électronique à transmission JEOL 120 CX sous une tension de 80 kv.

#### **2 - Test de Limulus**

Le test de Limulus Amebocyte Lysate (LAL) est un test quantitatif pour les endotoxines des bactéries à Gram négatif.

Après incubation, en présence d'endotoxines, un gel apparaît, en absence d'endotoxines, aucun gel ne se forme.

Réactifs : Coffret ACCU-GEL (M.A. Bioproducts, Walkersville, MD 21793, USA)

- Lysat : (LAL) préparé à partir d'améboocytes circulants du crabe **Limulus polyphemus** standardisé pour détecter au moins 0,25 ng/ml d'endotoxine. Le lysat est présenté sous forme lyophilisé.
- Contrôle d'inhibition : lysat préparé comme précédemment additionné d'1 mg/ml d'endotoxine **E. coli** 0111:B4.
- Contrôle positif : endotoxine d'**E. coli** 0111:B4 contenant 3 % de sérum de boeuf apyrogène.
- Eau apyrogène.
- LPS de **R. meliloti** M11S : (échantillon) dilué de façon à obtenir une concentration de 1 mg/ml.

Les tableaux 7 et 8 résument respectivement le protocole expérimental suivi et les résultats obtenus.

## VIII. - ANALYSE DES SUCRES ET DES ACIDES GRAS DU LPS DE R. MELILOTI M11S

### A. - Chromatographie de partage en phase gazeuse (CPG) [méthode de ZANETTA et coll. (116)]

#### 1 - Méthanolyse des LPS

Un mélange de 1 mg de LPS de **R. meliloti** M11S et 1 ml d'une solution aqueuse de mésoinositol à 100 µg/ml (témoin interne) sont lyophilisés. Le lyophilisat subit ensuite les traitements suivants :

- addition de 1 ml de méthanol/HCl 0,5 N ;
- 24 h au four à 80°C ;

| Contrôle positif                                                                                                                                                                                                                                                      | Contrôle négatif                                                                | Echantillon                                                                                | Contrôle d'inhibition                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>flacon d'endotoxine d'<b>E. coli</b> 0111:B4<br/>+ 1 ml d'eau apyrogène</p> <p>↓</p> <p>mélanger pendant plusieurs min<br/>laisser à la température ambiante</p> <p>↓</p> <p>transférer 200 µl de solution<br/>d'endotoxine dans un flacon de<br/>lysate (LAL)</p> | <p>transférer 200 µl d'eau<br/>apyrogène dans un flacon<br/>de lysate (LAL)</p> | <p>transférer 200 µl<br/>de l'échantillon (LP5)<br/>dans un flacon de lysate<br/>(LAL)</p> | <p>transférer 200 µl<br/>de l'échantillon dans<br/>un flacon de contrôle<br/>d'inhibition (endotoxine<br/>+ LAL)</p> |
| <p>↓</p> <p>boucher les flacons et mélanger doucement jusqu'à dissolution</p>                                                                                                                                                                                         |                                                                                 |                                                                                            |                                                                                                                      |
| <p>↓</p> <p>incuber à 37°C pendant 1 h</p>                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                 |                                                                                            |                                                                                                                      |

Tableau 7 - Protocole expérimental du test LAL

| Echantillon |            | Résultat du test (formation du gel) |                  |                  |                       | Test acceptable             |
|-------------|------------|-------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Endotoxine  | Inhibiteur | Echantillon                         | Contrôle négatif | Contrôle positif | Contrôle d'inhibition |                             |
| +           | -          | +                                   | -                | +                | +                     | oui                         |
| -           | -          | -                                   | -                | +                | +                     | oui                         |
| -           | +          | -                                   | -                | +                | -                     | présence d'inhibiteur       |
| +           | +          | -                                   | -                | +                | -                     | non (présence d'inhibiteur) |
| +           | +          | +                                   | -                | +                | -                     | non (présence d'inhibiteur) |

Tableau 8 - Résultats *pouvant être obtenus à l'aide du test LAL*

- extraction à l'heptane, on obtient deux fractions : méthanolique (mono-saccharides) et heptanique (méthylester d'acides gras) ;
- évaporation sous un courant d'azote des deux phases ainsi obtenues.

1°) A la fraction méthanolique contenant les sucres :

- ajouter un mélange de dichlorométhane/anhydride trifluoroacétique (v/v),
- injecter en CPG sur une colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 %, sur Chromosorb W-HP 80 à 100 mesh., la température est programmée de 100 à 220°C (2°C/min).  
Le débit du gaz vecteur (hélium) est de 7,5 ml/min.
- La détection s'effectue par ionisation de flamme.

2°) A la fraction heptanique contenant les méthylesters d'acides gras :

- ajouter 200 µl d'heptane et 10 µg d'un méthylester d'acides gras à C19 (témoin),
- injecter en CPG sur une colonne à capillaire CP-Sil 5CB (25 m x 0,32 mm).  
La température est programmée de 100 à 240°C (2°C/min). Pression du gaz vecteur (hélium) : 0,4 bar.

Les méthylglycosides trifluoroacétylés et les méthylesters d'acides gras sont détectés par ionisation de flamme à la sortie de la colonne.

## 2 - Détermination des rapports molaires des différents composants du LPS

Les résultats sont souvent exprimés en rapports molaires.

Afin de déterminer le nombre de micromoles de chaque ose contenu dans l'échantillon, on utilise la formule suivante :

$$\text{nombre de } \mu\text{moles en sucre S} = \frac{H \text{ pic S} \times QT}{H \text{ pic T} \times cf \times PMS}$$

H pic S = hauteur du pic sucre S

H pic T = hauteur du pic témoin T (mésoinositol)

QT = quantité de témoin utilisée

- cf = coefficient propre à chaque sucre, déterminé à l'aide d'une gamme étalon
- PMS = poids moléculaire du sucre S

Les rapports molaires sont obtenus en divisant le nombre de micromoles de chaque ose par le nombre de micromoles de glucose.

Concernant les acides gras, les rapports molaires sont calculés de la même façon en considérant la surface du pic au lieu de sa hauteur. Le coefficient propre à chaque acide gras est égal à 1.

## **B. - Caractérisation des acides sialiques**

### **1 - Hydrolyse partielle de l'acide sialique par la méthode de VARKI (102)**

- Les LPS sont soumis à une hydrolyse par l'acide acétique 2 M à 80°C pendant 3 h afin de libérer les acides sialiques.
- Les acides gras sont extraits par le chloroforme et la phase aqueuse est séchée sous azote.

### **2 - Identification des acides sialiques en spectrométrie de masse**

- La phase aqueuse ainsi obtenue est triméthylsilylée par l'addition de pyridine et BSTFA (v/v).
- Après 2 h à la température ambiante, le produit est analysé par couplage CPG-SM :
  - sur une colonne à capillaire CP-SIL 5CB (50 m x 0,32 mm) à la température programmée de 150 à 280°C (5°C/min) ;
  - spectre de masse Riber-Mag 10-10 : ionisation par impact électronique (IE) (potentiel d'ionisation 70 ev) et/ou par ionisation chimique à l'aide de l'ammoniaque.

L'ionisation électronique (IE) permet d'obtenir des fragments qui conduisent à l'identification de la molécule.



L'ionisation chimique (IC) permet d'obtenir préférentiellement l'ion moléculaire permettant de déterminer la masse moléculaire du produit analysé.

Les monosaccharides libérés par méthanolyse ont également été analysés après leur méthylsilylation (pyridine, BSTFA V/V) par couplage CPG-SM par ionisation chimique comme précédemment décrit.

## **IX. - PREPARATION DU LIPIDE A**

### **A. - Hydrolyse acétique du LPS**

- Les LPS (40 mg) sont hydrolysés par l'acide acétique à 1 % (6 ml) pendant 90 min à 100°C.
- Le culot contenant le lipide A est récupéré par centrifugation puis lavé par l'eau distillée.
- Le surnageant contenant le polysaccharide du LPS ("side chain" + "core"), de même que le lipide A, sont lyophilisés.

### **B. - Saponification du lipide A**

- Au lipide A (1 mg), on ajoute 1 ml de NaOH 4N.
- Mettre à l'étuve à 100°C pendant 5 h.
- Neutraliser par HCl 4N.
- Extraire la phase heptanique par l'heptane et sécher sous azote, puis ajouter 1 ml d'eau distillée et lyophiliser.
- Le lyophilisat, ainsi que le lipide A obtenu précédemment, subissent la méthanolyse (méthanol/HCl 0,5 N, 80°C - 24 h).
- Les méthylesters d'acides gras sont analysés en CPG comme précédemment décrit (VIII, A - 1).

## X. - ROLE DES LIPOPOLYSACCHARIDES DANS L'ADSORPTION PHAGIQUE

### A. - Adsorption phagique

- Additionner 0,1 ml d'une solution polysaccharidique à 0,1 ml du  $\Phi$  4.M11S contenant  $10^5$   $\Phi$ /ml, de façon à obtenir des concentrations finales en LPS de 5 - 2,5 - 2 - 1 - 0,5 - 0,1 et 0,05 mg/ml.
- Laisser en contact 1 h.
- Compléter à 1 ml avec du RC fructosé.
- Centrifuger à 10 000 tours/min pendant 15 min.
- Doser les phages contenus dans le surnageant (phages non adsorbés).

### B. - Influence de certains facteurs sur l'adsorption phagique

#### 1 - EDTA et DOC

- Les LPS (5 mg/ml) de **R. meliloti** M11S sont mis en présence d'EDTA 5 mM ou de DOC 5 mM pendant 5 min.
- Le  $\Phi$ 4.M11S est ensuite ajouté à raison de  $10^5$   $\Phi$ /ml.
- Un dosage de phages non adsorbés est effectué comme précédemment.
- Un témoin est réalisé en mettant le phage en contact avec l'EDTA et le DOC.

#### 2 - Protéinase K

- Une solution à 5 mg/ml de LPS de **R. meliloti** M11S est additionnée de protéinase K (10  $\mu$ g/ml).
- Après 2 h de contact à 45°C, le  $\Phi$ 4.M11S est ajouté ( $10^5$   $\Phi$  /ml).

- On dose les phages non adsorbés.
- Un témoin (phages plus protéinase K) est réalisé et laissé en contact pendant 1 h à 25°C.

### 3 - Déacétylation des LPS

- Les LPS (5 mg) sont traités par une solution aqueuse de NaOH 0,25 N (1 ml) à 56°C pendant 1 h.
- Après neutralisation de la solution par HCL 0,25 N, elle est dialysée contre l'eau distillée puis lyophilisée.
- Le lyophilisat est dissous dans du TNP.
- Le phage  $\phi$ 4.M11S est ajouté à raison de  $10^5$   $\phi$  /ml et les phages non adsorbés sont dosés.

### 4 - Lectines

Les lectines utilisées sont récapitulées dans le tableau 9.

| Abréviation | Affinités                                              | Origine                     |
|-------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------|
| ConA        | $\alpha$ -D-Man > $\alpha$ -D-Glc > $\alpha$ -D-GlcNac | <b>Canavalia ensiformis</b> |
| RCA         | $\beta$ -D-Gal-(1→4)-D-GlcNac                          | <b>Ricinus communis</b>     |
| SBA         | Gal-GalNac                                             | <b>Glycine max</b>          |
| LPA         | NANA                                                   | <b>Limulus polyphemus</b>   |

Tableau 9 - Les lectines utilisées.

Man : mannose, Glc : glucose, GlcNac : N-acétylglucosamine, Gal : galactose, GalNac : N-acétylgalactosamine, NANA : acide N-acétyl-neuraminique.

- La souche M11S de **R. meliloti** est cultivée sur milieu RC fructosé à 1 %.
- Les bactéries sont récupérées en phase exponentielle de croissance (la DO de la culture à 600 nm est d'environ 1) et lavées avec du TNP ; elles sont ensuite mises en suspension dans du TNP (DO à 600 nm égale à 1).
- Différentes solutions aqueuses de lectines sont préparées dans du TNP et additionnées aux suspensions bactériennes de façon à obtenir des concentrations finales en lectine de 5 - 2 - 1 - 0,5 et 0,25 mg/ml.
- On laisse en incubation 5 min à 37°C.
- Le  $\phi 4$ .M11S est ajouté à raison de  $10^5$   $\phi$  /ml.
- On dose les phages non adsorbés.

#### 5 - Sialidase phagique

- Le lysat phagique est dialysé contre le tampon PBS pendant 4 jours puis filtré sur membrane Millipore (porosité 0,2  $\mu$ m).
- 1,5 ml de LPS de **R. meliloti** M11S à 1 mg/ml est mis en présence de 1,5 ml de  $\phi 4$ .M11S ( $8 \cdot 10^8$   $\phi$  /ml). L'ensemble est laissé à 33°C pendant différents temps : 6 - 8 - 25 et 30 h.
- L'acide sialique est dosé par la méthode colorimétrique d'AMINOFF (4).

## R E S U L T A T S

## I. - ETUDE DE L'ADSORPTION PHAGIQUE CHEZ R. MELILOTI

### A. - Relation phage - bactérie

#### 1 - Cinétique d'adsorption du phage $\phi 4$ .M11S

Les courbes de la figure 9 sont relatives à l'adsorption du  $\phi 4$  sur les cellules de **R. meliloti** M11S et M5N1.

Le pourcentage d'adsorption du  $\phi 4$  sur **R. meliloti** M11S et M5N1 est respectivement de 96 % et 80 % après 1 min de contact entre phages et bactéries.

Après 40 min, le pourcentage d'adsorption du  $\phi 4$  sur **R. meliloti** M5N1 est de 94 %, s'approchant ainsi de celui de M11S.

Ainsi, le temps de contact entre les phages et les bactéries joue un rôle important dans l'adsorption phagique.

#### 2 - Calcul de la constante d'adsorption

La vitesse de l'adsorption d'un phage sur une bactérie dépend de plusieurs facteurs (état physiologique des bactéries, température, concentration des bactéries et des phages, ...). Elle est proportionnelle à la concentration des bactéries et des phages et suit l'équation suivante :

$$K = \frac{2,3}{B \cdot t} \log \frac{P_0}{P}$$

k = constante d'adsorption en ml/min.

B = nombre de bactéries par ml

t = temps en min.

P<sub>0</sub> = nombre de phages/ml au temps 0

P = nombre de phages non adsorbés/ml au temps t

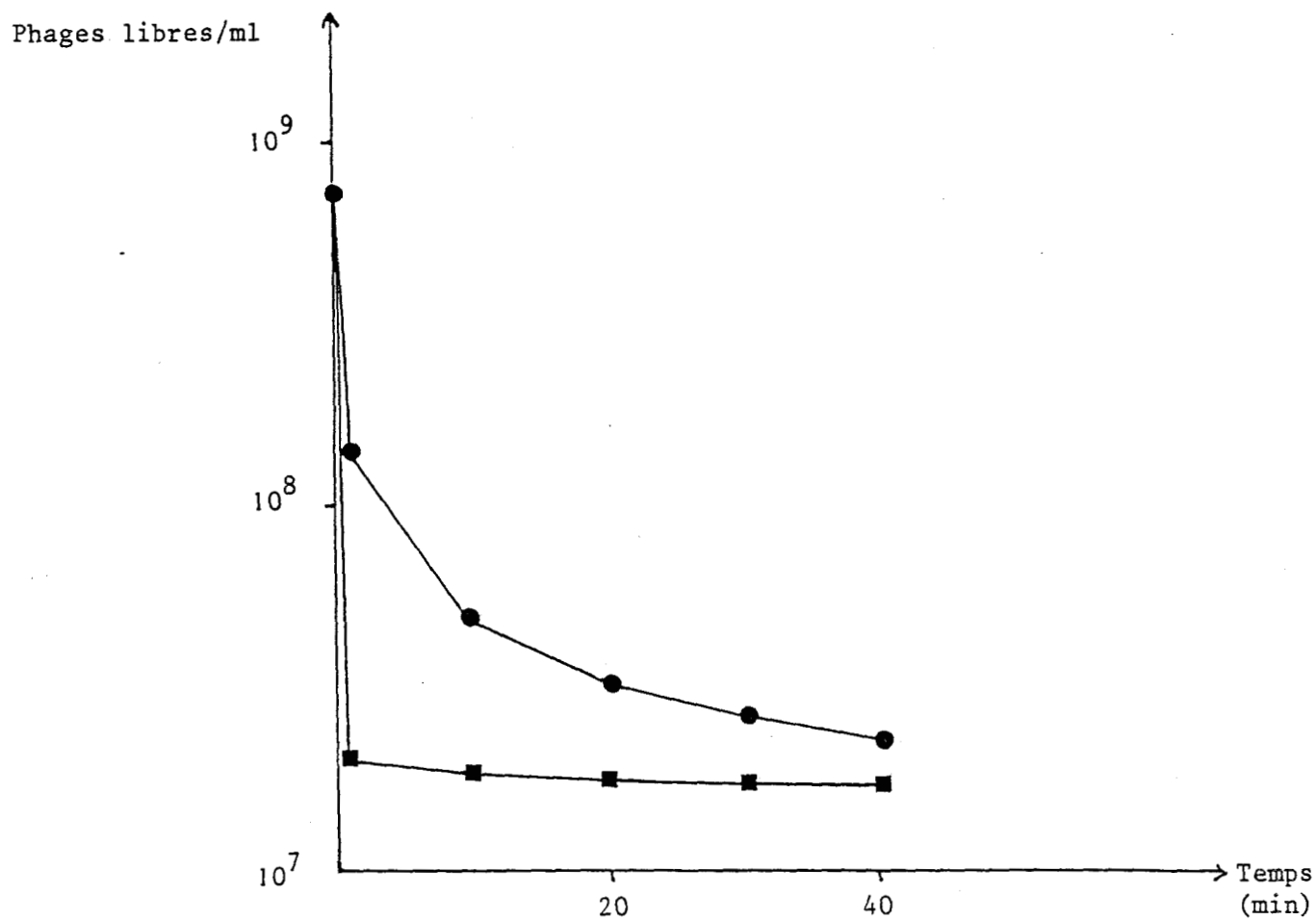


Figure 9 - Adsorption du  $\phi 4.M11S$  sur *R. meliloti* M11S (■—■) et sur *R. meliloti* M5N1 (●—●).

Pour la souche M11S de **R. meliloti**, la constante d'adsorption  $k$  est calculée en utilisant la formule ci-dessus ; nous avons choisi  $t = 1$  min où l'adsorption du  $\Phi$  4.M11S sur **R. meliloti** M11S est déjà maximale :

$$\left. \begin{array}{l} \text{pour } t = 1 \text{ min} \\ B = 8.10^8 \text{ bactéries/ml} \\ P_0 = 8.10^8 \Phi/\text{ml} \\ P = 3.10^7 \Phi/\text{ml (calculé à partir} \\ \quad \text{de la courbe de la cinétique} \\ \quad \text{d'adsorption phagique (fig. 9))} \end{array} \right\} k_{M11S} = 0,4.10^{-8} \text{ ml/min}$$

Pour la souche M5N1 de **R. meliloti**, en gardant les mêmes paramètres ( $t$ ,  $B$ ,  $P_0$ ),  $P$  est égal à  $1,8.10^8 \Phi/\text{ml}$  et  $k$  vaut  $0,2.10^{-8} \text{ ml/min}$ .

De telles valeurs de  $k$  indiquent que des sites d'adsorption phagique, facilement accessibles, sont vraisemblablement situés sur toute la surface bactérienne. A ce titre de comparaison, la valeur la plus basse ( $0,03.10^{-9} \text{ ml/min}$ ) a été constatée chez le coliphage M13 qui s'adsorbe à l'extrémité de pili, sites difficilement accessibles (100).

### 3 - Détermination théorique et expérimentale du nombre de phages adsorbés

#### a) Calcul théorique

Si l'on considère que **R. meliloti** est un bacille ayant en moyenne  $2 \mu$  de longueur et  $0,6 \mu$  de largeur, schématisé par un cylindre muni de deux extrémités hémisphériques, le  $\Phi$ 4 possède une capsidie icosaédrique de  $640 \text{ \AA}$  de diamètre et une queue de  $1100 \text{ \AA}$ . Le nombre de récepteurs à la surface de la bactérie est donné approximativement par le rapport de la surface d'une enveloppe localisée à la distance  $d/2 + l$  de la bactérie ( $d =$  diamètre de la tête du phage,  $l =$  longueur de la queue du phage) sur la section de la tête phagique.

On pourrait donc théoriquement placer environ 2 700 phages sur une cellule de **R. meliloti**.



## b) Calcul expérimental

Afin de vérifier l'hypothèse numérique précédente, nous avons mélangé des phages et des bactéries à différentes multiplicités d'infection.

La figure 10 montre que lorsqu'on met de 10 à 2 000 phages par bactérie, tous ces phages arrivent à s'adsorber. Au delà de 2 000 phages par bactérie, le nombre de phages adsorbés varie lentement.

Expérimentalement, nous déterminons qu'une cellule de **R. meliloti** M11S peut adsorber environ 2 500 phages. Ceci s'approche de la valeur théorique, surtout en tenant compte que **in vivo** les phages ne se disposent pas de façon à pouvoir adsorber un maximum de particules virales sur la bactérie.

## B. - Mise en évidence de l'adsorption phagique sur les LPS

### I - Choix du modèle expérimental

Les lipopolysaccharides entrent dans la constitution de la membrane externe des bactéries à Gram négatif où ils sont souvent les récepteurs spécifiques de bactériophages.

Nous avons donc recherché l'adsorption éventuelle du  $\phi 4$  sur les LPS des souches M11S et M5N1 de **R. meliloti**, celles-ci étant parmi les plus utilisées au Laboratoire.

Réalisée sur des cellules entières, l'extraction par la méthode au phénol-eau de WESTPHAL (106) donne trois fractions :

- un résidu : la muréine,
- une fraction phénolique : lipoprotéines et protéines,
- une phase aqueuse contenant les LPS, qui sont ensuite précipités à l'éthanol et l'acétate de sodium.

Nous avons déterminé le pourcentage d'adsorption du  $\phi 4$  sur chacune des fractions issues des deux souches choisies. Le tableau 10 illustre les résultats ainsi obtenus.

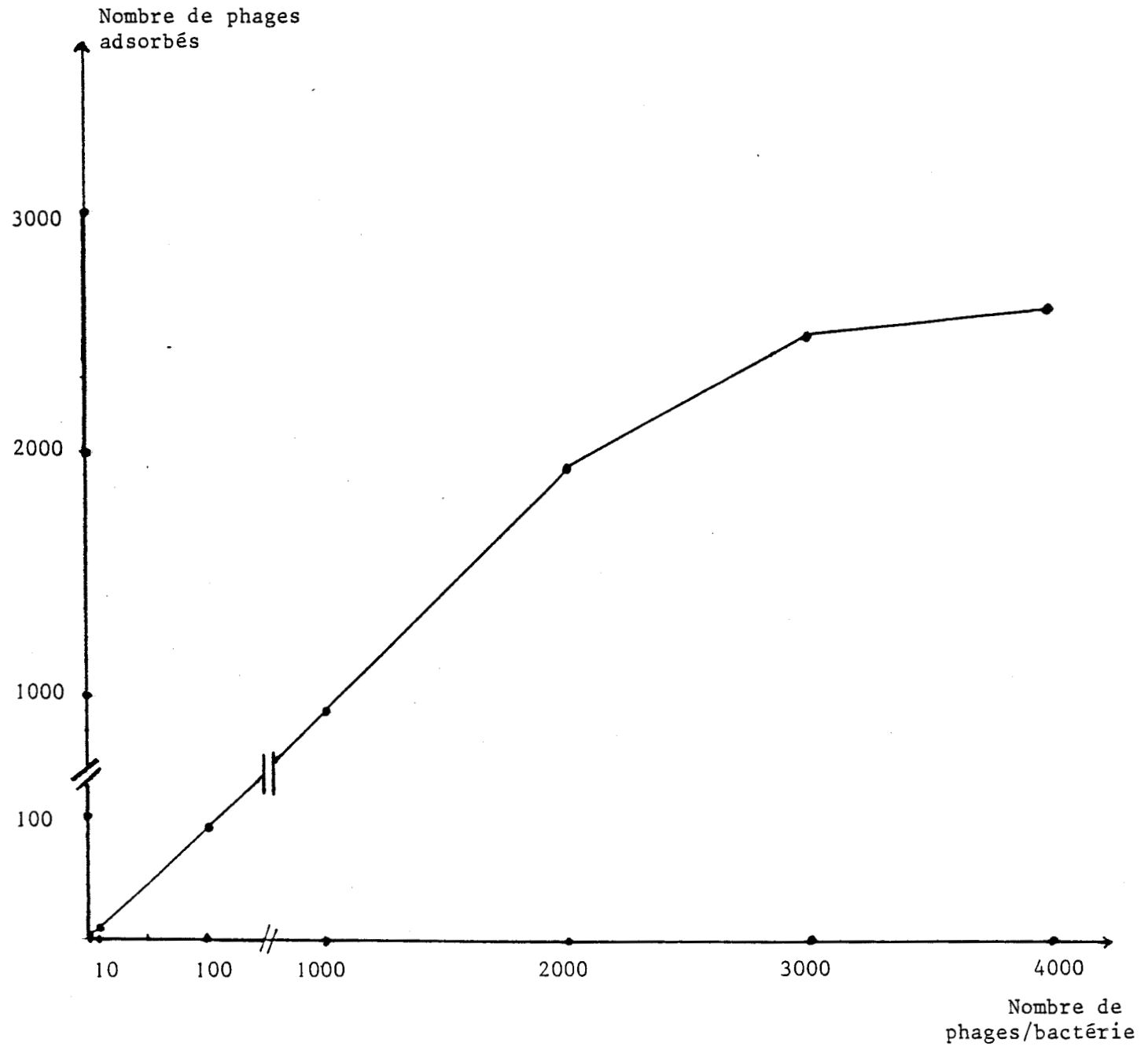


Figure 10 - Estimation du nombre de sites d'adsorption phagique chez *R. meliloti* M11S.

| Phages   | % d'adsorption phagique sur chacune des fractions |                        |     |                                    |
|----------|---------------------------------------------------|------------------------|-----|------------------------------------|
|          | Résidu                                            | fraction<br>phénolique | LPS | culture<br>bactérienne<br>(témoin) |
| Φ 4.M11S | 25                                                | 24                     | 88  | 79                                 |
| Φ 4.M5N1 | 54                                                | 50                     | 56  | 76                                 |

Tableau 10 - Pourcentage d'adsorption phagique sur les trois fractions issues des souches M11S et M5N1 de **R. meliloti**.

Ce tableau nous montre que le pourcentage d'adsorption du Φ 4 est de 88 % sur les LPS de **R. meliloti** M11S, et de 79 % sur la culture bactérienne, alors que sur la fraction phénolique et le résidu il est de l'ordre de 25 % ; ceci est vraisemblablement dû à une contamination de ces fractions par des molécules de LPS.

Par contre, pour la souche M5N1 de **R. meliloti**, le pourcentage d'adsorption du Φ 4 sur les trois fractions récupérées est d'environ 50 %, ceci peut avoir pour cause une mauvaise extraction des LPS. Il nous a paru nécessaire d'utiliser une autre technique permettant d'obtenir les LPS de M5N1. Ainsi la méthode de GALANOS (30) (chloroforme/éther de pétrole/eau) a été mise en oeuvre. Elle est plus spécialement préconisée pour les bactéries ayant une membrane externe de type Rough, mais elle a également donné de bons résultats dans d'autres cas et rappelons que **R. meliloti** M5N1 est de type Smooth (10, 67, 110).

Toutefois, les LPS extraits de cette façon n'ont pas permis une amélioration du pourcentage d'adsorption des phages (tab. 11).

Pour ces raisons, nous avons choisi, pour la suite de notre travail, la souche M11S de **R. meliloti** qui semble permettre l'obtention de fractions plus nettes par la technique de WESTPHAL (106).

| Technique | % d'adsorption du $\phi 4$ .M5N1<br>sur les LPS de <b>R. meliloti</b> M5N1 |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|
| Westphal  | 52                                                                         |
| Galanos   | 47                                                                         |

Tableau 11 - Pourcentage d'adsorption phagique sur les LPS extraits selon la technique de WESTPHAL (106) ou de GALANOS (30) chez **R. meliloti** M5N1.

## 2 - Effets de certains facteurs sur l'adsorption phagique

### a) Influence de la concentration en LPS

La figure 11 montre la variation du pourcentage de phages adsorbés en fonction de la concentration en LPS de la souche M11S. 2,5 mg/ml sont indispensables pour une adsorption phagique maximale de 97 %.

### b) Influence des protéines pariétales

La méthode de WESTPHAL (106) fournit simultanément des LPS et des protéines. Ceux-ci sont dosés par la méthode de LOWRY (63). Après l'élimination de ces protéines par la protéinase k, le pourcentage d'adsorption du  $\phi 4$  sur les LPS traités diminue. Toutefois, cet écart nous semble trop faible pour conclure à la nécessité des protéines pariétales pour l'adsorption (97) (tab. 12).

|                       | % d'adsorption<br>du $\phi 4$ .M11S |
|-----------------------|-------------------------------------|
| LPS                   | 94                                  |
| LPS +<br>Protéinase k | 56                                  |

Tableau 12 - Pourcentage d'adsorption du  $\phi 4$ .M11S sur les LPS, avant et après leurs traitements à la protéinase k.

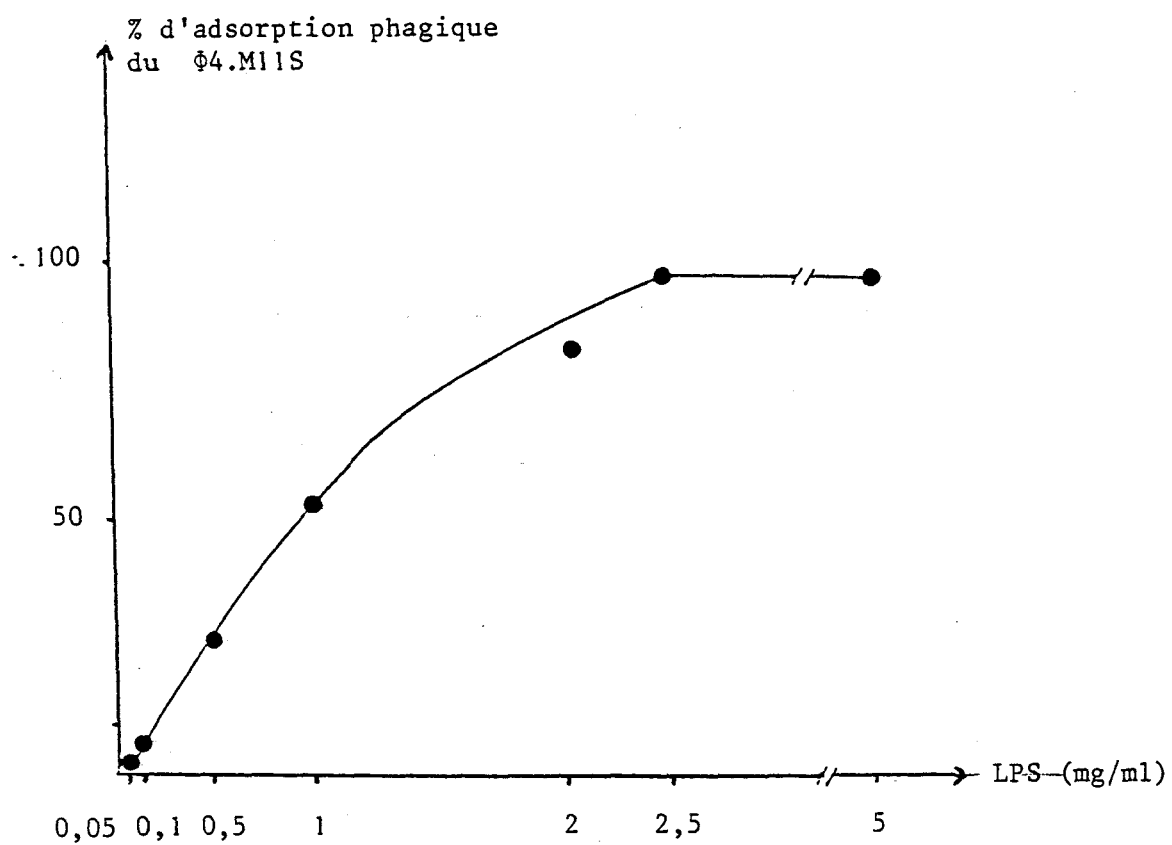


Figure 11 - Adsorption du  $\phi 4.M11S$  sur les LPS de *R. meliloti* M11S.

### c) Effets de DOC et EDTA

Le désoxycholate de sodium (DOC) est connu pour dissocier les LPS (43). Quant à l'EDTA, il agit par chélation des cations divalents tels que le calcium et le magnésium souvent indispensables à l'adsorption phagique.

Le tableau 13 montre que DOC et EDTA 5 mM inhibent totalement ou réduisent considérablement l'adsorption du phage sur les LPS. Ceux-ci ont été utilisés à une concentration de 5 mg/ml. Par mesure de précaution, nous avons doublé la concentration minimale permettant de neutraliser tous les phages.

Nous avons vérifié que DOC et EDTA n'affectaient pas la viabilité de nos bactériophages.

| % des phages adsorbés         |    |
|-------------------------------|----|
| LPS                           | 94 |
| DOC 5 mM<br>+<br>LPS 5 mg/ml  | 0  |
| EDTA 5 mM<br>+<br>LPS 5 mg/ml | 19 |

Tableau 13 - Pourcentage d'adsorption du  $\phi 4.M11S$  sur les LPS de *R. meliloti* M11S après action de DOC et EDTA.

## II. - ETUDE DES LPS DE R. MELILOTI M11S

### A. - Purification après extraction

#### 1 - DNase - RNase et pronase

La méthode de WESTPHAL (106) fournit des LPS de **R. meliloti** M11S accompagnés des protéines et d'acides nucléiques qui ont été évalués respectivement par le dosage selon LOWRY (63) et l'absorbance à 260 nm.

Le tableau 14 montre que la fraction LPS "brute" contient 12 % de protéines et 15 % d'acides nucléiques. De telles quantités pouvant gêner nos travaux ultérieurs, il nous a paru indispensable de les éliminer. Après action de la DNase, de la RNase et de la pronase, nous observons une diminution du pourcentage des protéines et des acides nucléiques dans les LPS de **R. meliloti** M11S.

|                | LPS avant<br>traitement | LPS après<br>traitement |
|----------------|-------------------------|-------------------------|
| Protéines      | 12 %                    | 2,5 %                   |
| Ac. nucléiques | 15 %                    | 0,1 %                   |

Tableau 14 - Teneur en protéines et ac. nucléiques des LPS avant et après action d'enzymes protéolytiques et nucléasiques.

#### 2 - Sephadex G50

Dans une deuxième étape de purification, les LPS obtenus après traitement à la DNase, RNase et pronase sont solubilisés dans l'eau et déposés au sommet d'une colonne de gel filtration Sephadex G50 (1,5 x 130 cm), l'éluant est l'eau distillée, les fractions (2 ml) sont récupérées et les composés glucidiques repérés par le réactif au phénol-acide sulfurique. Nous obtenons ainsi deux pics (1 et 2) (fig. 12).

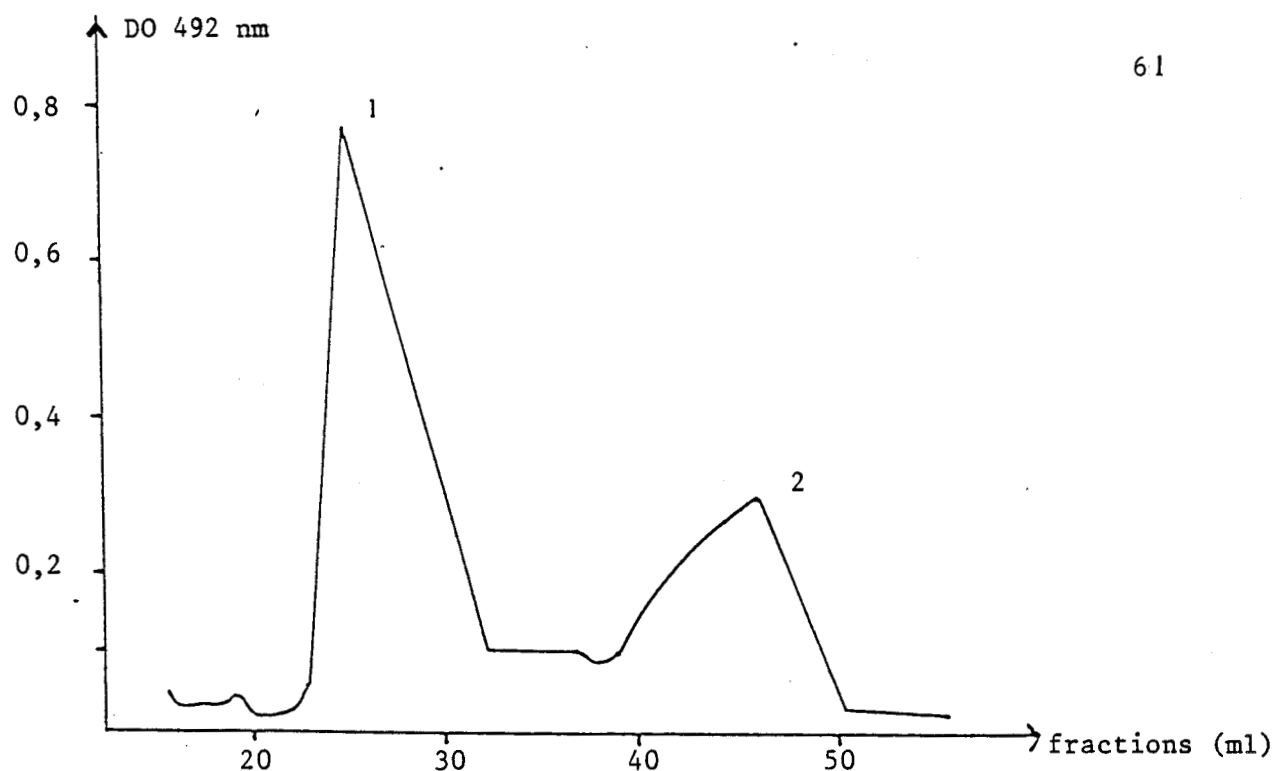


Figure 12 - Profil d'éluion du LPS de *R. meliloti* M11S sur Sephadex G50 :  
(1,5 x 130 cm).  
Eluant : eau distillée  
Fractions : 2 ml

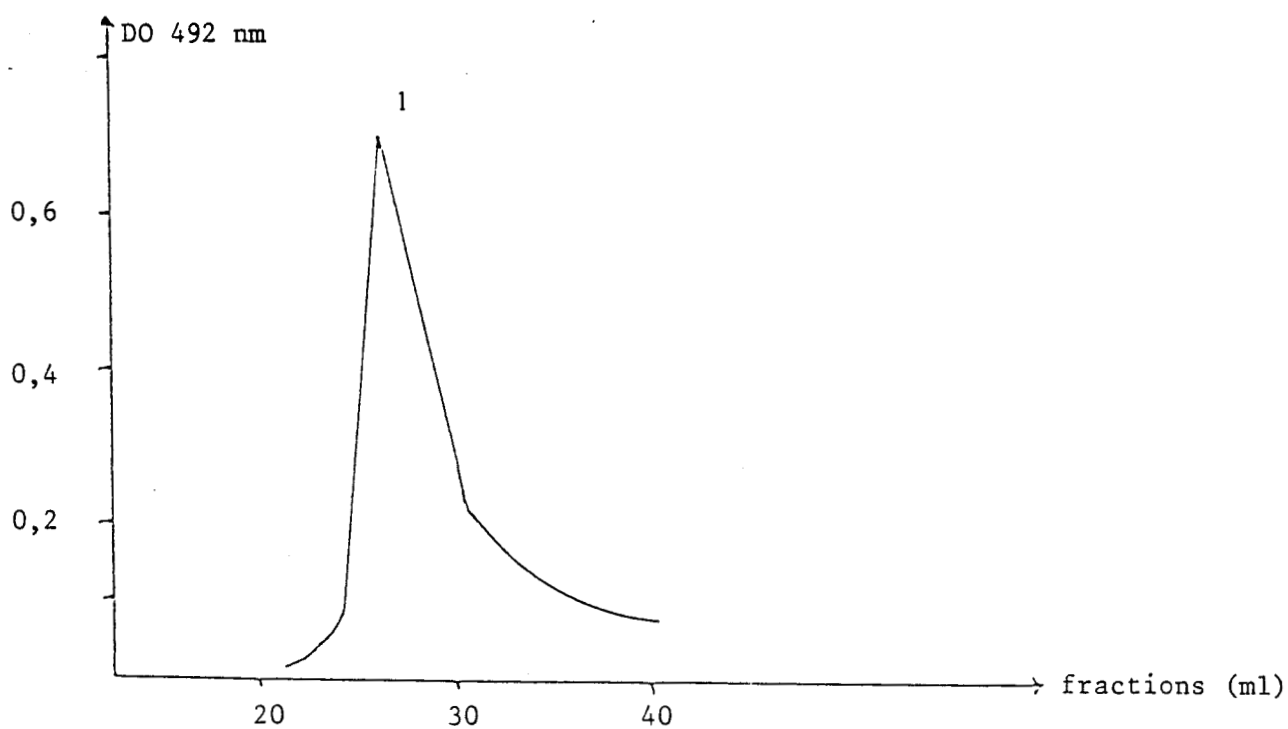


Figure 13 - Profil d'éluion du pic 1 sur Sephadex G50.  
(mêmes paramètres que précédemment)



Par analogie avec des travaux antérieurs (16), nous pensons que les LPS sont contenus dans le pic 1 qui est rechromatographié dans les mêmes conditions. Nous obtenons à nouveau un seul pic (fig. 13).

### **B. - Caractérisation des LPS**

Avant d'étudier la composition chimique des LPS de **R. meliloti** M11S, il nous a semblé important de vérifier leur présence dans le pic 1 obtenu après chromatographie sur Sephadex G50. Pour cela, nous avons employé les techniques suivantes :

- Test de Limulus : il s'agit d'un lysat d'améboocytes de Limule (**Limulus polyphenus**) qui a la propriété de coaguler en présence d'endotoxines de bactéries à Gram négatif qui sont généralement des LPS. Nous avons donc utilisé le test LAL (Limulus Amebocyte Lysat) comme indicateur de la présence de LPS dans nos préparations, en prenant comme témoin les LPS d'**E. coli** 055B5 commercialisés (SIGMA). Le test au Limulus s'est avéré positif sur la fraction 1 de la chromatographie sur Sephadex G50.

- Microscopie électronique : après coloration négative, les LPS de **R. meliloti** examinés en microscopie électronique montrent des structures en forme de rubans linéaires ou enroulés (photo 1) similaires à celles rapportées pour les LPS d'**Escherichia coli** [LOPES et INNIS (62)], **Salmonella typhimurium** [SHANDS et coll. (87)], **Treponema pallidum** [JACKSON et ZEY (41)], **Leptospira interrogans** [VINH et coll. (104)]. L'ultrastructure est d'apparence trilamellaire. Les couches parallèles denses représentent le polysaccharide, la couche intermédiaire est la partie hydrophobe, c'est-à-dire le lipide A.

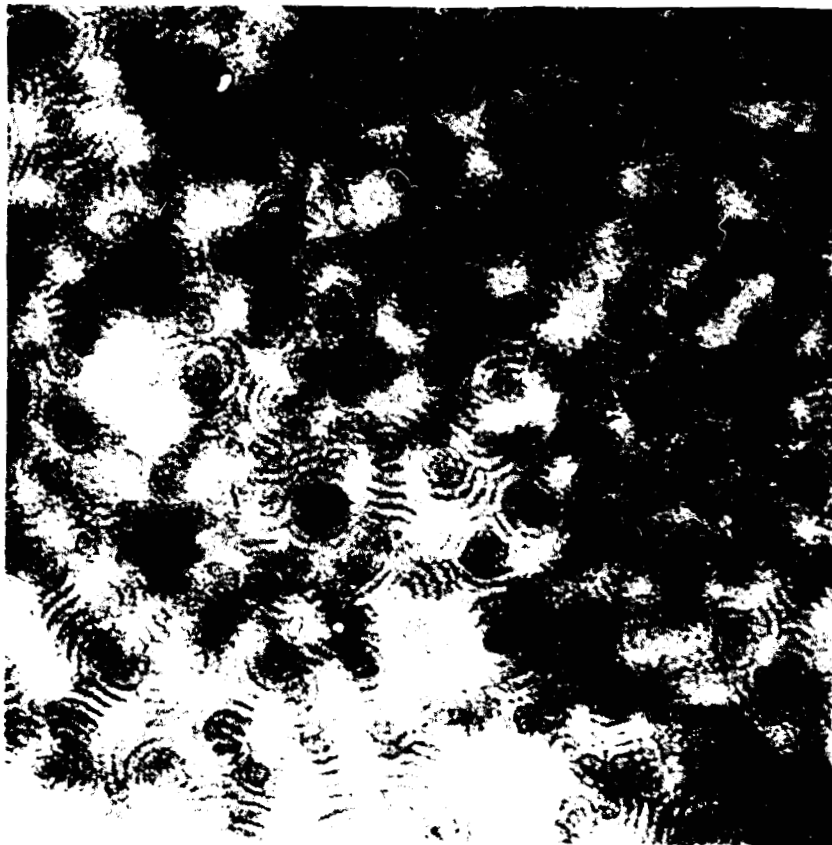


Photo 1 - Observation au microscope électronique des LPS de *R. meliloti* M11S. Grossissement : x 300 000.

- Adsorption phagique : nous avons vérifié que le  $\phi 4$ .M11S s'adsorbe sur la fraction 1 de Sephadex G50 contenant les LPS "purifiés" en mettant les phages  $\phi 4$ .M11S en présence de la fraction 1 de Sephadex G50 et en calculant le nombre de phages adsorbés comme précédemment décrit dans Matériel et Méthodes.

### C. - Analyse des LPS

Nous décrivons dans l'article ci-contre (*FEMS Microbiology Letters*, 1989, 57 : 203-208) les résultats de la préparation, de l'identification et de la composition en sucres du LPS isolé, en particulier la caractérisation de deux types d'acides sialiques ainsi que la composition en acides gras.

## Characterization of sialic acids containing lipopolysaccharide from *Rhizobium meliloti* M 11 S

C. Defives, R. Bouslamti, J.C. Derieux, O. Kol<sup>1</sup> and B. Fournet<sup>1</sup>

Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au CNRS n° 217 et Laboratoire Pilote du Ministère de l'Éducation Nationale, directeur: Professor Montreuil, J.) 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 25 July 1988

Revision received 27 September 1988

Accepted 3 October 1988

Key words: *Rhizobium meliloti*; Lipopolysaccharide; Sialic acid, HPLC

### 1. SUMMARY

The lipopolysaccharide (LPS) of *Rhizobium meliloti* strain M 11 S was isolated and analyzed. It contained fatty acids (3-hydroxymyristic, palmitic, stearic, arachidic acids) and sugars: glucose, galactose, glucosamine, 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid and sialic acids (NeuAc, 9-O-acetyl-NeuAc) identified by combined gas-liquid-chromatography/mass spectrometry (GLC-MS).

### 2. INTRODUCTION

Bacteria of the genus *Rhizobium* are able to establish nitrogen-fixing symbiosis with leguminous plants. As Gram-negative bacteria, they have the usual surface polysaccharides and among them, lipopolysaccharides (LPS) seem involved in different processes such as symbiotic infection or

bacteriophage adsorption. Differences in composition between LPS from nodulating and non-nodulating *Rhizobium trifolii* have been reported [1] and LPS serves as receptor for trifoliin [2]. Lectin from pea and alfalfa have been shown to bind to LPS from *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii* respectively [3,4]. In another respect, LPS has been thought to play a role in the specific attachment of the phage 1P to *R. trifolii* [5] or a bacteriocin to *R. lupinii* [6]. Therefore, the structure of LPS may be a molecular basis for the specificity of *Rhizobium*-plant symbiosis and *Rhizobium*-phage interaction. LPS from different species of *Rhizobium* have been investigated and the reports have suggested a large variation in chemical composition and a high degree of heterogeneity of these molecules [7,8].

We have isolated an LPS containing sialic acids identified by gas-liquid-chromatography (GLC) and mass spectrometry (MS) from a strain of *R. meliloti*. Sialic acids have been described in bacterial polysaccharides but are rare in lipopolysaccharides.

Correspondence to: B. Fournet, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

### 3. MATERIALS AND METHODS

#### 3.1. Bacterial culture

*R. meliloti* M 11 S originated from our laboratory and was grown aerobically in *Rhizobium* complex (RC) medium [9].

#### 3.2. Isolation of lipopolysaccharide

The lipopolysaccharide was isolated by the hot phenol-water procedure [10]. Nucleic acids were eliminated by using DNase and RNase [11] and the lipopolysaccharide was purified by fractionation on a Sephadex G-50 column (1.5 cm I.D.  $\times$  130 cm) and by high-performance-liquid-chromatography (HPLC).

The HPLC was performed on a Spectra Physics apparatus with an anionic exchange Aquapore column (250  $\times$  4.6 mm I.D.) (Brownlee Labs Inc., Santa Clara, CA, U.S.A.) as follows: the LPS (2.5 mg) was dissolved in 1 ml of 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 and subjected to HPLC. The column was washed with the same buffer for 10 min and then a linear gradient of NaCl from 0 to 500 mM was applied for 15 min followed by an isocratic elution with the buffer containing 500 mM NaCl for 20 min. The flow rate was 1 ml/min and 1 ml fractions were collected. Elution was followed at 206 nm.

#### 3.3. Chemicals methods

The total neutral carbohydrate content was determined by the orcinol-sulfuric acid method described by Rimington [12]. The total protein content was estimated by the Lowry method [13].

#### 3.4. Monosaccharides and fatty acids composition

The molar composition of monosaccharides was determined by gas-liquid-chromatography (GLC) of the trifluoroacetylated methyl glycosides according to Zanetta et al. [14] or of trimethylsilylated methyl glycosides according to Kamerling et al. [15] modified by Montreuil et al. [16].

The total lipids were estimated as fatty acids methyl esters by gas-liquid-chromatography after transesterification with methanol/HCl 2 M at 80 °C for 18 h in presence of heptadecanoic acid as an internal standard.

The monosaccharides and fatty acids were identified by their relative retention time compared with authentic standards and by mass-spectrometry.

Combined gas-liquid-chromatography/mass spectrometry was performed on a capillary column CP-SIL 5 CB (50 m  $\times$  0.32 mm I.D.) with a temperature program (150 °C to 280 °C, 5 °C/min) and a Riber Mag 10-10 mass spectrometer. The ionizing potential was 70 eV and the mass range 100–950.

#### 3.5. Identification of sialic acids

Sialic acids were released from LPS according to the method described by Varki et al. [17]. Hydrolysis was performed with 2 M acetic acid at 80 °C for 3 h and the fatty acids were removed by extraction with chloroform. The aqueous phase was freeze-dried and subjected to direct trimethylsilylation with pyridine and bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (1:1 by vol.) for 2 h at room temperature and then analysed by GLC-MS [18].

### 4. RESULTS

The hot phenol-water procedure yielded an extract which contained neutral and acidic sugars, lipids and proteins. Analysis by gas-liquid-chromatography indicated the presence of several fatty acids including 3-hydroxymyristic acid. The carbohydrate composition analysis showed two major components which were glucose and sialic acid. Also found were 3-deoxy-D-manno-oculosonic acid (KDO), galactose and glucosamine, but in smaller quantities. Glucose represented almost the totality of the neutral sugars (92%). This could be caused by a contamination by exopolysaccharides when the LPS was extracted from whole bacteria [19,20]. Further fractionation of the phenol-water extract by gel-filtration on a Sephadex G-50 column yielded an initial fraction (Sephadex G-50 fraction 1) eluted at the void volume of the column, and a second fraction (Sephadex G-50 fraction 2) which contained only glucose. As shown in Table 1, the sugar analysis of the Sephadex G-50 fraction 1 showed the presence of sialic acids with, in smaller amounts, glucose.

Table 1

Carbohydrate and fatty acid compositions of LPS obtained by gel-filtration on Sephadex G-50 column and by HPLC on an anionic column

| Fractions                | Molar ratios |      |      |      |      |           |      |      |      |
|--------------------------|--------------|------|------|------|------|-----------|------|------|------|
|                          | Glc          | Gal  | GlcN | KDO  | SA   | 3-OH-14:0 | 16:0 | 18:0 | 20:0 |
| Sephadex G-50 fraction 1 | 1            | ε    | 0.3  | 0.57 | 4.96 | 1         | 0.74 | 0.36 | 0.33 |
| Sephadex G-50 fraction 2 | +            | ε    | ε    | ε    | ε    | -         | -    | -    | -    |
| HPLC peak 1              | +            | -    | -    | -    | -    | -         | -    | -    | -    |
| HPLC peak 2              | 1            | 0.22 | 0.50 | 0.81 | 7.69 | 1         | 0.77 | 0.64 | 0.42 |

GlcN: glucosamine; SA: sialic acid; ε: traces; +: major component; -: not detected; 3-OH-14:0: 3-hydroxymyristic acid; 16:0: palmitic acid; 18:0: stearic acid; 20:0: arachidic acid.

galactose, glucosamine and KDO, while fatty acids analysis showed the presence of palmitic, stearic, arachidic and 3-hydroxymyristic acids. It has been established that the latter fatty acid is a characteristic constituent of the lipid A moiety of many lipopolysaccharides.

In order to purify the lipopolysaccharides, the Sephadex G-50 fraction 1 was subjected to HPLC analysis by using an anionic column which retained molecules with negative charges. As shown in Fig. 1, two major peaks, which absorbed at 206 nm, were obtained (HPLC) peak 1 and HPLC peak 2). The composition analysis of each peak showed that HPLC peak 1 contained only glucose as sugar and that the totality of sialic acids and KDO were located in the HPLC peak 2 (Table 1). In order to determine the nature of the sialic acids with minimal loss and migration of *O*-acetyl groups, the HPLC peak 2 fraction was submitted

to a mild acid hydrolysis with 2 M acetic acid at 80 °C for 3 h as described by Varki et al. [17]. The hydrolysate was freeze-dried and then directly trimethylsilylated. The trimethylsilyl esters, per *O*-trimethylsilyl ether derivatives were then analysed by GLC-MS. As shown in Fig. 2a, two compounds were obtained (compound 1 and compound 2). The retention times of compound 1 (20' 29'') and compound 2 (20' 57''), relative to the standard *N*-acetylneuraminic acid were 1 and 1.017 respectively. By comparison with the results described by Schauer et al. [18,21] compound 1 was identified as *N*-acetylneuraminic acid with characteristic fragment ions at *m/z* 726, 624, 205 and 173 for the EI-MS (fig. 2b) and ions at *m/z* 742 corresponding to *M* + 1, 652 and 562 for the CI-MS (Fig. 2b'). The EI spectrum of the compound 2 (Fig. 2c) shows the characteristic fragment ions at *m/z* 696, 594, 175 and 173, while the CI-MS (Fig. 2c') gave ions at *m/z* 712 (*M* + 1), 622 and 532. In this way, it can be deduced that compound 2 is *N*-acetyl-9-*O*-acetylneuraminic acid.

The fatty acids analysis showed that HPLC peak 2 also contained 3-hydroxymyristic acid (Table 1). The 3-hydroxymyristic acid and KDO are marker constituents of LPS. Their presence with sialic acids indicates the existence of a LPS containing sialic acids in the *R. meliloti* M 11 S.

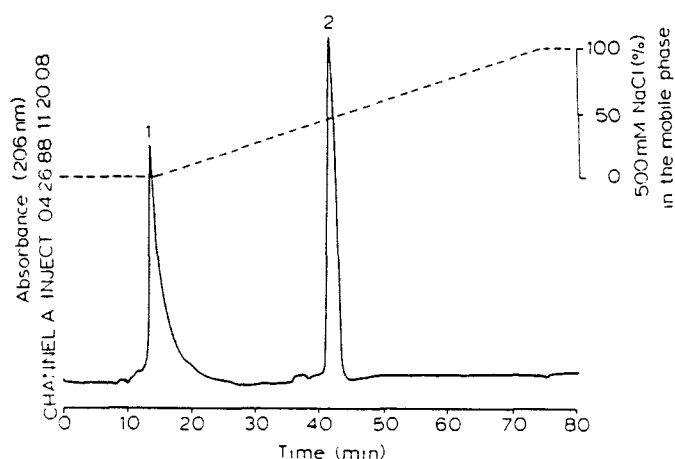


Fig. 1. HPLC of lipopolysaccharide on an anionic exchange column. For details see MATERIALS AND METHODS.

## 5. DISCUSSION

In this study we have characterized a lipopolysaccharide which contains sialic acids from

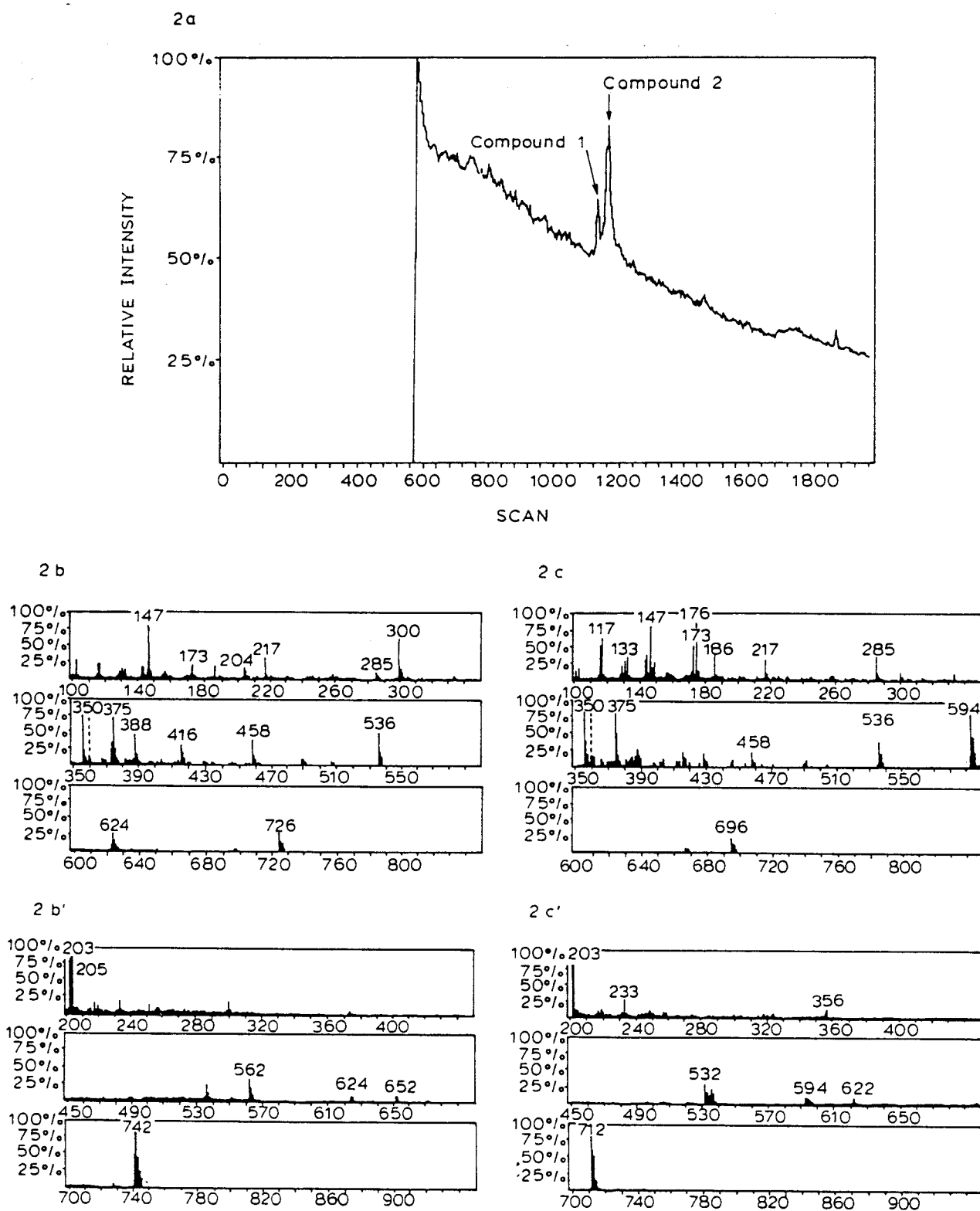


Fig. 2. GLC-MS analysis of trimethylsilyl ester, per-*O*-trimethylsilyl ether derivatives of sialic acids released from *Rhizobium meliloti* M 11 S. For details see MATERIALS AND METHODS. a: Gas liquid chromatogram of the trimethylsilyl derivatives. b: EI mass spectra of compound 1. b': CI mass spectra of compound 1. c: EI mass spectra of compound 2. c': CI mass spectra of compound 2.

*Rhizobium meliloti* M 11 S. Although they have been identified in some bacterial exopolysaccharides, sialic acids are rare in LPS [22]. A 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoxynonulosonic acid (pseudaminic acid) has been identified in LPS from *Pseudomonas aeruginosa* 05 and 010 and from *Shigella boydii* type 7 [23].

Further detailed structural studies of the *R. meliloti* M 11 S lipopolysaccharides will be necessary to determine the different parts of the LPS architecture (the O-antigen, the core and the lipid A). It would also be interesting to determine how the O-antigen polysaccharide is linked to the core in the LPS architecture in the absence of heptose residues. The absence of heptose has also been described in several strains of *Rhizobium* [8,24,25] and in *Agrobacterium tumefaciens* [26]. It has been described that symbiosis between *Rhizobium* and leguminous plants requires an interaction between the bacterial LPS, and in particular its O-antigen polysaccharide constituent, and the lectins of the legumes [3,4,20]. The knowledge of the structure would indicate what part of the LPS (O-antigen polysaccharide, core or lipid A) is involved in the interaction mechanism with the legume lectins and with bacteriophages.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Associée au CNRS n° 217: K.O. and F.B.). We thank Mr. Y. Leroy and Mrs. A. Honvault for their skilful technical assistance. We thank also Mr. G. Ricart (Laboratoire commun de spectrométrie de masse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres Artois).

## REFERENCES

[1] Russa, R., Urbanik, T., Zurkowski, W. and Lorkiewicz, Z. (1981) *Plant Soil*, 61, 81.

- [2] Hrabak, E.M., Urbano, M.R. and Dazzo, F.B. (1981) *J. Bacteriol.*, 148, 697.
- [3] Kato, G., Maruyama, Y. and Nakamura, M. (1979) *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2843.
- [4] Kamberger, W. (1979) *Arch. Microbiol.*, 121, 83.
- [5] Zajac, E. and Lorkiewicz, Z. (1983) *J. Gen. Microbiol.*, 129, 3171.
- [6] Pfister, H. and Lodderstaedt, G. (1977) *J. Gen. Virol.* 37, 337.
- [7] Carlson, R.W., Shatters, R., Duh, J.L., Turnbull, E., Hanley B., Rolfe, B.G. and Djordjevic, M.A. (1987) *Plant Physiol.*, 84, 421.
- [8] Zevenhuizen, L.P.T.M., Scholten-Koerselman, I. and Posthumus, M.A. (1980) *Arch. Microbiol.*, 125, 1.
- [9] Werquin, M., Defives, C., Hassani, L. and Andriantsimavona-Otonia, M. (1984) *J. Virol. Meth.*, 8, 155.
- [10] Westphal, O. and Jann, K. (1965) *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, 83.
- [11] Okuda, S., Sato, M., Uchiyama, H. and Takamashi, H. (1975) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 21, 169.
- [12] Rimington, C. (1951) *Biochem. J.*, 25, 1062.
- [13] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 285.
- [14] Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. and Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.*, 69, 291.
- [15] Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G. and Clamp, J.R. (1975) *Biochem. J.*, 151, 491.
- [16] Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, A., Fournet, B., Spik, G. and Strecker, G. (1986) in *Carbohydrate analysis: a practical approach* (Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. eds.) p. 143, IRL press, Oxford, Washington.
- [17] Varki, A. and Diaz, S. (1984) *Anal. Biochem.*, 137, 236.
- [18] Schauer, R. (1987) in *Methods in Enzymology* (Ginsburg, V. ed.), Vol. 138, p. 132, Academic Press, New York.
- [19] Carlson, R.W. (1984) *J. Bacteriol.*, 158, 1012.
- [20] Wolpert, J.S. and Albersheim, P. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 729.
- [21] Reuter, G. and Schauer, R. (1986) *Anal. Biochem.*, 157, 39.
- [22] Kenne, L. and Lindberg, B. (1983) in *The Polysaccharides* (Aspinall, G.O. ed.), Vol. 2, p. 287, Academic Press, New York.
- [23] Knirel, Y.A., Vinogradov, V.V., L'Vov, V.L., Kocharova, N.A., Shashkov, A.S., Dmitriev, B.A. and Kotchetkov, N.K. (1984) *Carbohydr. Res.*, 133, C5.
- [24] Russa, R. and Lorkiewicz, Z. (1979) *FEMS Microbiol. Lett.*, 6, 71.
- [25] Russa, R., Urbanik, T., Kowalczuk, E. and Lorkiewicz, Z. (1982) *FEMS Microbiol. Lett.*, 13, 161.
- [26] Salkinoja-Salonen, M. and Boeck, R. (1978) *J. Gen. Microbiol.*, 105, 119.

### D. - Analyse du lipide A

Le précipité obtenu lors de l'hydrolyse partielle du LPS est constitué par la fraction lipide A du LPS. Les acides gras libérés par méthanolyse (méthanol/HCl 0,5 N, 80°C, 24 h) ont été analysés en CPG.

La figure 14 et le tableau 15 donnent les résultats de l'identification et du dosage. On constate la présence des acides gras suivants : acides  $\beta$ -OH myristique, palmitique, stéarique et arachidique. Le pourcentage en acides gras du lipide A reste faible (1,15 %). La libération des acides gras par saponification n'améliore pas d'une façon significative le rendement en acides gras (1,38 %).

|                    | Rapports molaires           |      |      |      |      |
|--------------------|-----------------------------|------|------|------|------|
|                    | $\beta$ -OH C <sub>14</sub> | C16  | C18  | C20  | %    |
| Lipide A           | 1                           | 0,47 | 0,74 | 0,38 | 1,15 |
| Lipide A saponifié | 1                           | 0,65 | 0,46 | 0,61 | 1,38 |

Tableau 15 - Rapports molaires en acides gras du lipide A des LPS de **R. meliloti** M11S.

### III. - RECHERCHE DU SITE RECEPTEUR DU PHAGE $\Phi$ 4 DE R. MELILOTI M11S

#### A. - Adsorption phagique

L'adsorption du  $\Phi$ 4.M11S a été mesurée sur le LPS et sur les fractions de l'hydrolysat partiel du LPS : la fraction lipide A et fraction surnageante ("side-chain" et "core").

Sur la fraction surnageante ("side-chain" et "core"), l'adsorption phagique atteint 45 % alors qu'elle est de 3,5 % sur le lipide A (tab. 16).



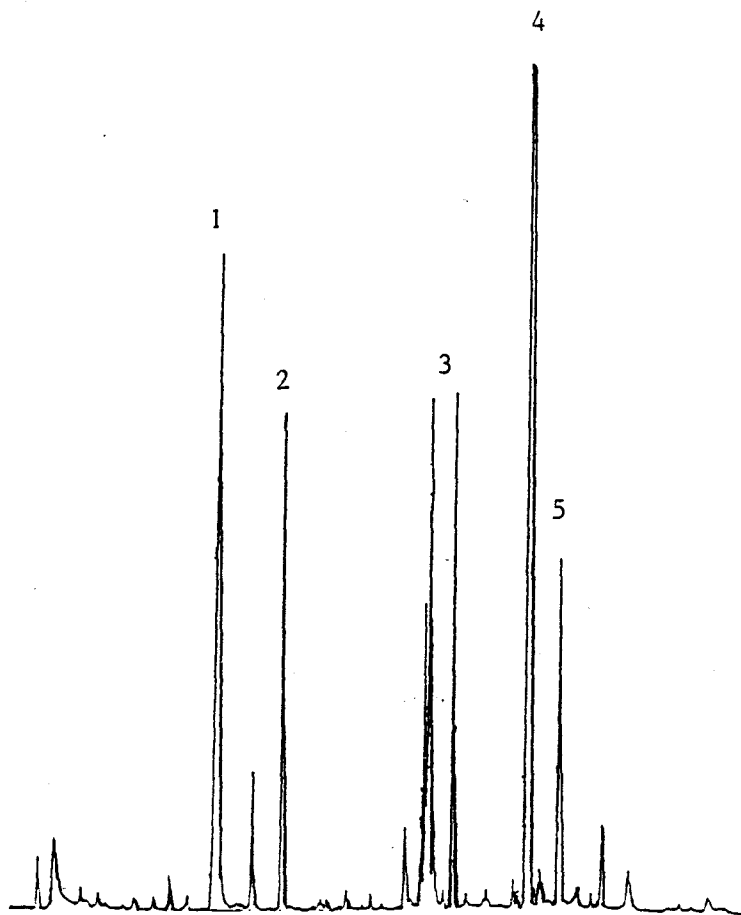


Figure 14 - Composition en ac. gras de la fraction lipide A du LPS de *R. meliloti* M11S en CPG.

|   |                   |                            |
|---|-------------------|----------------------------|
| 1 | : $\beta$ -OH C14 | ac. $\beta$ -OH myristique |
| 2 | : C16             | ac. palmitique             |
| 3 | : C18             | ac. stéarique              |
| 4 | : C19 (témoin)    | ac. nonadécanoïque         |
| 5 | : C20             | ac. arachidique            |

Les sites d'adsorption du  $\Phi 4$  sur **R. meliloti** M11S se trouveraient donc au niveau de la fraction "side-chain" et "core" du LPS caractérisée par une concentration importante d'acides sialiques.

| Fractions<br>5 mg/ml                            | % d'adsorption du<br>$\Phi 4$ .M11S |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------|
| LPS                                             | 93                                  |
| Lipide A                                        | 3,5                                 |
| Fraction surnageante<br>("core" + "side-chain") | 45                                  |

Tableau 16 - Pourcentages d'adsorption du  $\Phi 4$ .M11S sur les LPS et sur les fractions de l'hydrolysate partiel du LPS de **R. meliloti** M11S.

#### B. - Utilisation des lectines

Les acides sialiques semblent avoir un rôle important dans l'adsorption phagique ; nous avons pensé étudier ce phénomène à l'aide des lectines, celles-ci pouvant se lier, avec une haute spécificité, à certains résidus de sucres sans les modifier mais en neutralisant leur activité.

Les cellules de **R. meliloti** M11S sont mises en présence des lectines spécifiques des sucres présents dans les LPS. Après 5 min de contact, le phage  $\Phi 4$  est additionné et on effectue un dosage des phages non adsorbés.

La figure 15 montre que les lectines de glucose (ConA), galactose (SBA et RCA), inhibent faiblement l'adsorption du phage. Par contre, la lectine spécifique de l'acide sialique empêche fortement la fixation du phage, ce qui montre le rôle de l'acide sialique dans la fixation du phage  $\Phi 4$  sur **R. meliloti** M11S.

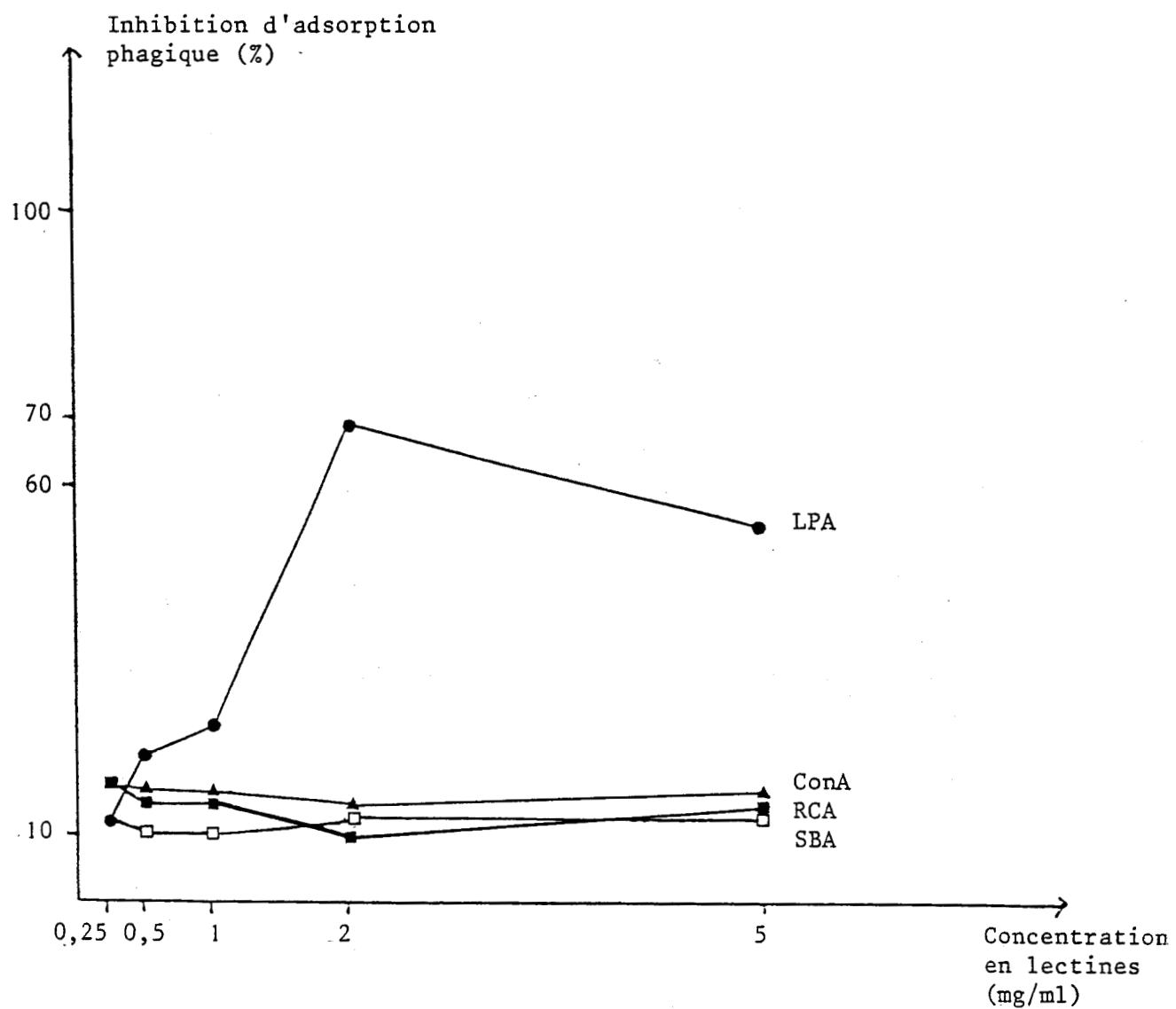


Figure 15 - Effet des lectines sur l'adsorption du  $\phi 4$  sur *R. meliloti* M11S : SBA ( $\square$ — $\square$ ), RCA ( $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ), ConA ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ) et LPA ( $\bullet$ — $\bullet$ ).

### C. - Analyse des LPS de souches de *R. meliloti* résistantes au phage $\phi 4$

Nous avons voulu vérifier l'importance de l'acide sialique du LPS dans la fixation du phage en comparant les compositions glucidiques des LPS de *R. meliloti* M11S avec celles de trois souches résistantes au phage par défaut d'adsorption : M2S, M3S et M9S.

On note l'absence d'acide sialique dans les LPS de ces trois souches résistantes au phage  $\phi 4$ , ceci est en faveur de son importance dans l'adsorption phagique.

### D. - Déacétylation des LPS

Afin d'expliquer le rôle éventuel des groupements acétylés dans la fixation du phage sur le LPS de *R. meliloti* M11S et par comparaison avec les résultats de ZAJAC *et al.* (112, 113) décrivant l'importance des groupements acétylés dans la fixation du phage 1P sur le LPS de *R. trifolii*, nous avons comparé l'adsorption du  $\phi 4$ .M11S sur les LPS acétylés et déacétylés par la soude.

Les résultats ainsi obtenus montrent que le pourcentage d'adsorption phagique diminue et atteint une valeur de 32 % alors qu'il est de 94 % sur un LPS non traité, utilisé comme témoin (tab. 17).

Les groupements acétylés semblent donc jouer un rôle important dans l'adsorption phagique chez *R. meliloti* M11S.

|                               | % d'adsorption du<br>$\phi 4$ .M11S |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| LPS<br>témoin<br>(5 mg/ml)    | 94                                  |
| LPS<br>déacétylé<br>(5 mg/ml) | 32                                  |

Tableau 17 - Pourcentage d'adsorption du  $\phi 4$ .M11S sur les LPS, avant et après déacétylation.

Il semble donc nécessaire qu'il y ait à la fois présence d'acide sialique et de groupements O-acétylés pour que le phage  $\Phi 4$  se fixe sur **R. meliloti** M11S.

### E. - Recherche d'une sialidase phagique

Certains auteurs ont montré que l'adsorption des phages sur leurs sites récepteurs est souvent suivie d'une lyse de constituants glucidiques à l'aide d'enzymes spécifiques (17, 32, 37, 38, 39, 48).

Nous avons voulu savoir si le  $\Phi 4$ .M11S possède une enzyme phagique capable de couper les acides N-acétyl-neuraminique et N-acétyl-9-0-acétyl-neuraminique. Pour cela, le  $\Phi 4$ .M11S est mis en contact avec les LPS de **R. meliloti** M11S à 33°C pendant différents temps (6, 18, 25 et 30 h). Un dosage d'acide sialique libre est fait par la technique colorimétrique d'AMINOFF (4).

Le tableau 18 nous montre que le pourcentage d'acide sialique libre par rapport à la quantité des LPS ne dépasse pas 2,58 % au bout de 25 h de contact entre le phage et les LPS.

Cette variation de la teneur du milieu réactionnel en acide sialique libre n'est pas significative et ne permet pas de conclure à l'action d'une sialidase phagique.

| Temps de contact en heure | % d'acide sialique libre |
|---------------------------|--------------------------|
| 6                         | 1,24                     |
| 18                        | 2,20                     |
| 25                        | 2,58                     |
| 30                        | 2,34                     |

Tableau 18 - Cinétique de dosage d'acide sialique libéré à partir des LPS mis en contact avec les phages.

Toutefois, par comparaison avec l'action des phages sur les constituants glucidiques des bactéries (action d'endoglycosidase), nous ne pouvons pas exclure la possibilité de l'action d'une endosialidase qui libèrerait des oligosaccharides.

## DISCUSSION

Les lipopolysaccharides sont localisées dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. On sait qu'ils ont des activités biologiques importantes tels que facteurs de pathogénicité, récepteurs phagiques, etc...

Par ailleurs, les LPS de Rhizobiacea semblent impliqués dans les processus de reconnaissance spécifique entre la plante et la bactérie (46, 47, 49, 110). Connaissant le rôle des phages dans la compétition que se livrent les souches de **Rhizobium** présentes dans la rhizosphère pour établir la symbiose avec la Légumineuse, et en admettant que les récepteurs d'adsorption des rhizobiophages sont localisés au niveau des LPS, comme c'est souvent le cas chez les bactéries à Gram négatif (67, 97, 112, 113), nous avons dirigé notre étude vers la relation phage-bactérie.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'adsorption du phage  $\Phi$  4 sur les souches sensibles de **R. meliloti** M11S et M5N1. Il s'avère que cette adsorption est très rapide puisque de 80 % à 97 % des phages sont adsorbés dans la minute qui suit le contact avec les bactéries. La valeur assez élevée des constantes d'adsorption ( $k = 0,4 \cdot 10^8$  ml/min) montre que les sites récepteurs du phage sont facilement accessibles. Chez **R. meliloti** M11S, la neutralisation expérimentale d'un grand nombre de phages par bactérie (environ 2 000 phages/bactérie), détermination proche du seuil maximal théorique (2 700 phages/bactérie), est aussi en faveur de l'existence de nombreux sites sur la surface de la bactérie et facilement accessibles au phage.

Nous avons extrait les LPS de **R. meliloti** M11S par la technique de WESTPHAL (106) et nous avons vu que le phage  $\Phi$  4 se trouve bien neutralisé par ces molécules. Rappelons que d'autres rhizobiophages tels que le phage TN1 de **R. japonicum** HS123 (91), IP de **R. trifolii** 24SM (114, 115) ou 16B et F20 de **R. meliloti** 102FS1 (101) se fixent sur les LPS bactériens.

Les LPS sont souvent suffisants, sans intervention d'autres molécules issues de la membrane externe, pour assurer seuls la fonction réceptrice du phage, comme c'est le cas chez **Klebsiella pneumoniae** pour les phages FC 3-2, FC 3-3 et FC 3-6 (98), **Pseudomonas aeruginosa** pour le phage H22 (96) ou **Vibrio cholerae** pour le phage CP-T1 (34).

A l'inverse, certains coliphages T pairs ou apparentés ont besoin, en plus du lipopolysaccharide, de la participation de protéines OmpF, OmpC ou OmpA (12).

Chez *R. meliloti*, nous avons remarqué que les LPS seuls seraient en mesure de fixer les phages puisque l'action de la protéinase k n'affectait pas l'adsorption de façon significative.

Par contre, la chélation des ions divalents tels que  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  par l'EDTA empêche l'adsorption. Ceci confirme le rôle de ces cations, cofacteurs très souvent indispensables à l'adsorption des phages caudés (1).

Dans un second temps, la recherche plus précise des récepteurs du phage  $\Phi 4$  chez *R. meliloti* M11S nous a amené à étudier la composition des LPS de cette bactérie.

La chromatographie de gel de filtration des LPS natifs, néanmoins débarrassés des protéines et des acides nucléiques contaminants, a permis de fournir deux fractions et nous avons vérifié :

- que la première fraction correspondait aux LPS grâce à l'utilisation de la microscopie électronique, au test de détection des endotoxines bactériennes par le lysat d'améboocytes de *Limule* et, enfin, par la neutralisation spécifique du phage ;
- que la seconde fraction renferme des composés de poids moléculaires plus faibles que les LPS. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a montré qu'il s'agissait d'un polymère de glucose. Il est vraisemblable qu'il ait été extrait en même temps que les LPS. En effet, SCHMIDT et coll. (84) ont obtenu un résultat identique lors de l'extraction des LPS de *Salmonella greenseide*. Or, on sait que *R. meliloti* synthétise en abondance des exopolysaccharides (21) et des  $\beta$ -glycannes neutres (110, 117) pouvant être à l'origine de la contamination des LPS.

La composition des LPS a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse et confirmée, pour les sucres, en spectrométrie de masse.



Nous remarquons, d'une part, la présence de constituants habituels des LPS : glucose, galactose, glucosamine et KDO et, d'autre part, la présence, rare chez les Procaryotes, d'acides sialiques en quantité importante (rapport molaire égal à 4,96 par rapport au glucose).

Peu connus dans les LPS bactériens, les acides sialiques ne sont mis en évidence que dans très peu de cas : quelques antigènes O d'entérobactéries (50) et le core de souches du genre *Rhodobacter* (54) contiennent de l'acide N-acétyl-L-neuraminique. Un analogue d'acide sialique, l'acide pseudominique, a été identifié chez *Pseudomonas aeruginosa* 05, 010 et 013 ainsi que chez *Shigella boydii* type 7 (52, 53).

La présence d'acides sialiques dans la fraction surnageante ("core" et "side-chain"), issue de l'hydrolyse partielle du LPS de *R. meliloti* M11S par l'acide acétique à 1 %, constitue donc une originalité importante de cette souche. C'est pourquoi nous avons vérifié que ces acides sialiques étaient bien des molécules constitutives des LPS et non pas simplement associés d'une façon ou d'une autre. La chromatographie d'échange d'ions à haute performance a permis de lever ce doute et de purifier davantage le LPS en éliminant de nouveau du glucose. De plus, la spectrométrie de masse a caractérisé en réalité deux acides sialiques : l'acide N-acétyl-neuraminique et l'acide N-acétyl-9-O-acétyl-neuraminique.

En ce qui concerne le lipide A, sa composition comporte aussi des originalités. Il est caractérisé par l'acide  $\beta$ -hydroxy-myristique qui est constant dans les LPS bactériens. Les acides palmitique (C16), stéarique (C18) sont également fréquents, y compris chez *Rhizobium* (117). Par contre, l'acide arachidique (C20), présent ici, est plus rarement signalé.

On remarquera la faiblesse de la teneur en acides gras du lipide A de *R. meliloti* M11S (2 %) alors qu'elle est de 15 à 20 % chez *R. leguminosarum* et de 14 à 17 % chez *R. phaseoli* (117).

Certes, on peut penser à une dégradation partielle provoquant la libération d'acides à longues chaînes et l'élimination d'une partie des acides  $\beta$ -hydroxylés

dans la phase phénolique comme l'ont montré OKUDA et coll. (68) lors de l'extraction des LPS d'*E. coli* par la méthode phénol-eau.

Il est possible également que les acides gras soient ici d'extraction difficile, ce qui suggère une structure particulière.

Toutefois, certaines bactéries telle que *Coxiella burnetii* (3) ont aussi montré un faible taux d'acides gras.

Nous n'avons pas décelé l'heptose dans nos LPS alors qu'il y est habituellement fréquent. Certes, l'absence d'heptose a aussi été constatée chez plusieurs souches de *Rhizobium* (117) et d'*Agrobacterium tumefaciens* (83).

Enfin, on trouve relativement peu d'hexosamine dans ce LPS. ZEVENHUISEN et coll. (117) ont fait la même observation chez différentes souches de *Rhizobium*. Ces auteurs suggèrent qu'il s'agit d'un autre élément montrant que le lipide A de *Rhizobium* est essentiellement différent de celui des *Enterobacteriaceae* et doit avoir un squelette différent. Ceci entraînerait vraisemblablement une organisation générale du LPS de *R. meliloti* qui diffère du modèle classique défini chez les entérobactéries.

Nous rejoignons ici les conclusions issues d'études réalisées sur un certain nombre de souches de *Rhizobium* d'espèces différentes (117).

Les lipopolysaccharides de *R. meliloti* ont des similitudes avec ceux d'*E. coli* et de *Salmonella*. Ils contiennent un lipide A, du KDO (2-céto-3-désoxyoctonate) et un polysaccharide qui peut être séparé du lipide A par hydrolyse acide douce.

La connaissance, même partielle, du LPS de *R. meliloti* M11S nous a permis de préciser la nature du site récepteur du rhizobiophage  $\Phi$  4. Nous avons montré que la fraction contenant "side-chain" et "core" permet la plus forte adsorption phagique. Ceci diffère quelque peu des observations réalisées par d'autres auteurs. Ainsi, ZAJAC (114) montre qu'il n'y a d'activité réceptrice vis-à-vis du phage IP de *R. trifolii* que lorsque le lipide A et le polysaccharide sont séparés. Tandis que ATKINS et HAYES (6) détectent des altérations dans les

polysaccharides capsulaires et les lipoprotéines d'une souche de **R. trifolii** qui adsorbent faiblement les phages. Plus précisément, BARNET et VINCENT (8) suggèrent que le site récepteur des phages 7, 7cs et 8 est l'antigène O de **R. trifolii**, de même que pour le phage F20 de **R. meliloti** (101).

L'utilisation des lectines ayant des affinités spécifiques pour les oses constituant le LPS de **R. meliloti** M11S, nous a permis une étude plus fine du site d'adsorption. En effet, il s'avère que le phage n'est plus neutralisé lorsque les acides sialiques (N-acétyl-neuraminique et N-acétyl-9-0-acétyl-neuraminique) sont bloqués spécifiquement par l'agglutinine de **Limulus polyphemus**.

Une autre façon d'apprécier le rôle des sucres dans l'activité réceptrice d'un phage est de rechercher une action enzymatique dépendante du phage et dirigée vers ces monosaccharides. Ainsi, de nombreux phages qui se lient aux exopolysaccharides capsulaires ou solubles possèdent une dépolymérase qui est souvent une endoglycosidase. Citons les coliphages 29 et K30 d'**E. coli** 29 et K30 (77), le phage 11 de **K. pneumoniae** K11 (79), le phage K2 d'**Aerobacter aerogenes** (111) ou encore le rhizobiophage M-1 de **R. japonicum** (22).

Les LPS peuvent également subir des hydrolyses partielles par les enzymes phagiques. Ainsi, le phage P22 possède une endorhamnosidase qui coupe l'antigène O de **Salmonella** appartenant à divers sérotypes (37, 39). Une N-acétyl-galactosaminidase du phage  $\phi$ 1(40) dégrade le polysaccharide de l'antigène O de **Salmonella johannesburg** (17, 32) qui est aussi le récepteur du phage.

Enfin, le phage A7 de **P. syringae** pv. **morsprunorum** scinde les chaînes latérales du LPS grâce à une rhamnanase (90).

Dans le même ordre d'idées, nous avons recherché une sialidase phagique mais nous n'avons pas mis en évidence la libération d'acides sialiques, comme dans le cas de l'action d'une exosialidase. Toutefois, ceci ne nous permet pas d'exclure l'éventualité de l'existence d'une endosialidase qu'il faudrait rechercher par d'autres techniques chromatographiques.

Puisque les acides N-acétyl-neuraminique et N-acétyl-9-O-acétyl-neuraminique semblent fortement impliqués dans l'adsorption du phage  $\Phi 4$ , lorsqu'ils sont présents mais peuvent être apparemment remplacés par d'autres constituants, nous avons pensé que les groupements O acétylés pouvaient être indispensables comme cela a été démontré pour le phage 1P de *R. trifolii* (114) ou encore 52A de *Staphylococcus aureus* (88) et E79 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO (43). Effectivement, la déacétylation alcaline du LPS de *R. meliloti* M11S résulte en une perte importante de la capacité d'adsorption du phage  $\Phi 4$ .

Les groupements acétylés sont donc essentiels pour l'attachement du phage  $\Phi 4$  chez *R. meliloti* M11S.

Il reste donc des points à préciser afin de pouvoir, par exemple, utiliser des phages dans l'étude des LPS de *R. meliloti* et leurs variations éventuelles lors de la transformation des bactéries en bactéroïdes pendant l'installation de la symbiose.

## CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons étudié la première étape de la relation phage-bactérie chez **R. meliloti** M11S et M5N1 et le phage  $\Phi 4$ .

Dans une étude préliminaire :

- nous avons étudié la cinétique d'adsorption du  $\Phi 4$  et le calcul des constantes d'adsorption a montré que les sites récepteurs devaient être nombreux et facilement accessibles. En effet, nous avons déterminé qu'une cellule de **R. meliloti** M11S peut adsorber environ 2 500 phages ;
- puis, nous avons montré que les LPS de **R. meliloti** M11S assurent la fonction réceptrice du phage  $\Phi 4$ , vraisemblablement sans intervention des protéines pariétales et que la présence des ions divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) sont souvent indispensables à l'adsorption phagique.

La recherche de la nature du récepteur phagique nous a amené à aborder l'étude de sa composition. Les LPS ont été extraits par la méthode de WESTPHAL (106), la purification par chromatographie de gel filtration ou par chromatographie liquide de haute performance a fourni deux fractions.

L'une est constituée uniquement de glucose provenant certainement d'exopolysaccharides (21) ou de glycannes (117) extraits en même temps que les LPS contenus dans l'autre fraction.

L'analyse du LPS de **R. meliloti** M11S par chromatographie en phase gazeuse montre, d'une part, la présence des sucres habituellement rencontrés : glucose, galactose, glucosamine et KDO et, d'autre part, une quantité importante d'acides sialiques. Ceci confère une grande originalité à ces LPS car les acides sialiques sont très rares dans les LPS bactériens (50, 54).

La spectrométrie de masse a permis de caractériser deux acides sialiques : les acides N-acétyl-neuraminique et N-acétyl-9-O-acétyl-neuraminique.

Concernant le lipide A, l'analyse des méthylesters d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse montre la présence de l'acide  $\beta$  -

hydroxymyristique : un constituant caractéristique du LPS et des acides : palmitique (C16), stéarique (C18) et l'acide arachidique (C20). Le pourcentage en acides gras est faible (2 %) comparé aux LPS de nombreuses autres espèces (117). Ceci est dû à la structure du LPS, soit qu'il contienne réellement peu d'acides gras, soit que ces derniers sont difficilement séparables du reste de la molécule.

Dans la dernière partie du travail, étant en possession de la composition chimique globale des LPS de **R. meliloti** M11S, nous avons essayé de préciser le site d'adsorption du  $\phi 4$ .M11S.

Nous avons montré que :

- la fraction surnageante contenant la "side-chain" et "core", issue de l'hydrolyse partielle du LPS par l'acide acétique, permet la plus forte adsorption du bactériophage et que le lipide A n'intervient pas dans l'adsorption phagique ;
- l'inhibition de l'adsorption du phage par une lectine spécifique de l'acide N-acétyl-neuraminique, ainsi que l'absence d'acides sialiques dans les LPS de trois souches de **R. meliloti** naturellement résistantes au phage, est en faveur du rôle important de ces constituants dans l'adsorption phagique ;
- les acides sialiques, ainsi identifiés dans les LPS de **R. meliloti** M11S, se trouvent sous formes N-acétylés et N-acétyl-9-O-acétylés et la déacétylation alcaline du LPS de **R. meliloti** M11S résulte en une perte importante de la capacité d'adsorption du phage  $\phi 4$ .

Les groupements acétylés des acides sialiques sont donc également nécessaires pour l'attachement du phage  $\phi 4$ .M11S sur **R. meliloti** M11S.

Ainsi, nos résultats précisent la composition primaire du lipopolysaccharide de **R. meliloti** M11S et la nature du récepteur du phage  $\phi 4$  sur cette souche.

Ce modèle expérimental permettra de poursuivre des recherches dans plusieurs voies. Par exemple, le rôle des bactériophages dans l'établissement de la symbiose est encore mal connu. Il serait intéressant de savoir si l'on peut utiliser les phages pour agir sur la population de **Rhizobium** dans le but d'améliorer la symbiose.

De plus, les structures externes de la bactérie telles que les LPS sont impliquées dans la reconnaissance spécifique entre les Légumineuses et les **Rhizobium** ainsi que dans la transformation des bactéries en bactéroïdes au sein du nodule. Les bactériophages pourraient être utilisés pour une nouvelle approche du rôle physiologique de ces structures pariétales.



B I B L I O G R A P H I E

1. ACKERMANN, H.W. and DOBOW, M.S., 1987.  
Viruses of Procaryotes. General properties of bacteriophage.  
CRC. Press. Inc. Boca Raton, Florida, 55-56.
2. ADAMS, M.H., 1956.  
Bacteriophages.  
InterScience Publishers, New-York, London.
3. AMANO, K.I., FUKUSHI, K. and WILLIAMS, J.C., 1985.  
Electron microscopic studies of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetti*.  
**J. Gen. Microbiol.**, 131, 3127-3130.
4. AMINOFF, D., 1961.  
Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminique acid and their application to hydrolysates of sialomucoids.  
**Biochem. J.**, 81, 384-392.
5. ARBER, W. and LINN, S., 1969.  
DNA modification and restriction.  
**Ann. Rev. Biochem.**, 38, 467-500.
6. ATKINS, G.J. and HAYES, A.H., 1972.  
Surface changes in a strain of *Rhizobium trifolii* on mutation to bacteriophage resistance.  
**J. Gen. Microbiol.**, 73, 273-278.
7. AYANABA, A., 1982.  
Les bactéries et l'économie de l'azote.  
**Science et Société**, 2, 203-212.
8. BARNET, Y.M. and VINCENT, J.M., 1970.  
Lysogenic conversion of *Rhizobium trifolii*.  
**J. Gen. Microbiol.**, 61, 319-325.
9. BAYER, M., 1979.  
The bacterial outer membranes.  
Ed. INOUE M., Wiley, New-York.
10. BENEDETTO, J.P., BRUNETEAU, M. et MICHEL, G., 1976.  
Etude du lipopolysaccharide de *Escherichia coli* K<sub>12</sub>CR<sub>34</sub>.  
**Eur. J. Biochem.**, 63, 313-320.
11. BERNHEIMER, H.P. and TIPABY, J.G., 1976.  
Inhibition of phage infection by *Pneumococcus* capsule.  
**Virology**, 73, 308-309.

12. BEUMER, J., HANNECART-POKORNI, E. and GODART, C., 1984.  
Bacteriophage receptors.  
**Bull. Inst. Pasteur**, 82, 173-253.
13. BRADLEY, D.E. and KEY, D., 1960.  
The fine structure of bacteriophages.  
**J. Gen. Microbiol.**, 23, 553-563.
14. BRADLEY, D.E. and PITT, T.L., 1974.  
Pilus-dependance of four *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages with non contractile tails.  
**J. Gen. Virol.**, 23, 1-15.
15. CARLSON, R.W., SANDERS, R.E., NAPOLI, C. and ALBERSHEIM, P., 1978.  
Host-symbiont interactions. III - Purification and partial characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharides.  
**Plant Physiol.**, 62, 912-917.
16. CARLSON, R.W., 1984.  
Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides.  
**J. Bacteriol.**, 158, 1012-1017.
17. CHABY, R. and GIRARD, D., 1980.  
Adsorption and endo-glycosidase activity of phage  $\phi 1(40)$  on *Salmonella johannesburg* O polysaccharide.  
**Virology**, 105, 136-147.
18. CHESTER, R. and MEADOW, P.M., 1975.  
Heterogeneity of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*.  
**Eur. J. Biochem.**, 58, 273-282.
19. CONN, H.J., BETTCHER, E.J. and RANDALL, C., 1945.  
The value of bacteriophage in classifying certain soil bacteria.  
**J. Bacteriol.**, 49, 359-367.
20. CORRAL, E., MONTOYA, E. and OLIVARES, J., 1978.  
Sensitivity to phages in *Rhizobium meliloti* as a plasmid consequence.  
**Microbios Letters**, 5, 77-80.
21. COURTOIS, B., 1984.  
Les exopolysaccharides de *Rhizobium* : conditions de biosynthèse, structure primaire et propriétés physico-chimiques.  
Thèse de Doctorat ès-Sciences, Université de Lille Flandres-Artois.

22. DANDEKAR, A.M. and MODI, V.V., 1978.  
Interaction between *Rhizobium japonicum* phage M-1 and its receptor.  
**Can. J. Microbiol.**, 24, 685-688.
23. DELATTRE, J.M., 1971.  
Introduction à une étude génétique du genre *Rhizobium*.  
Thèse de Docteur-Ingénieur, n°121, Université de Lille Flandres-Artois.
24. D'HERELLE, F.H., 1917.  
Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.  
**C. R. Acad. Sci.**, 165, 373-375.
25. DROGE, W., LEHMAN, J., LUDERITZ, O. and WESTPHAL, O., 1970.  
Structural investigations on the 2-keto-3-deoxyoctonate region of lipopolysaccharides.  
**Eur. J. Biochem.**, 14, 175-184.
26. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F., 1956.  
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.  
**Analytical Chemistry**, 28, 350-356.
27. DUTTON, G.G.S. and MERRIELD, E.H., 1982.  
Acylated oligosaccharide from *Klebsiella* K63 capsular and by bacteriophage-borne enzymes.  
**Carbohydr. Res.**, 103, 107-128.
28. FEIGE, V. and STIRM, S., 1976.  
On the structure of the *Escherichia coli* C cell wall lipopolysaccharide core and its  $\phi$  X174 receptor region.  
**Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 71, 566-573.
29. FUCHS, E., 1977.  
The formation of bacteriophage T7 and T3 lysozymes from inactive precursors.  
**FEBS Letters**, 80, 27-29.
30. GALANOS, C., LUDERITZ, O. and WESTPHAL, O., 1969.  
A new method for the extraction of R lipopolysaccharides.  
**Eur. J. Biochem.**, 9, 245-249.
31. GEMSKI, P.Jr., KOELTZON, D.E. and FORMAL, S.B., 1975.  
Phage conversion of *Shigella flexneri* group antigens.  
**Infect. Immun.**, 11, 685-691.

32. GIRARD, R. and CHABY, R., 1981.  
Comparative studies on *Salmonella johannesburg* bacteriophages : morphology, virulence and interactions with the host cell lipopolysaccharide.  
**Ann. Microbiol.**, 132B, 197-214.
33. GMEINER, J., LUDERITZ, O. and WESTPHAL, O., 1969.  
Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Salmonella* R mutants. 6 - Investigations of the structure of the lipide A component.  
**Eur. J. Biochem.**, 7, 370-379.
34. GUIDOLIN, A. and MANNING, P.A., 1985.  
Bacteriophage CP-T1 of *Vibrio cholerae*. Identification of the cell surface receptor.  
**Eur. J. Biochem.**, 153, 89-94.
35. HAMMERLING, G., LUDERITZ, O. and WESTPHAL, O., 1971.  
Structural investigations on the core polysaccharide of *Escherichia coli* O100.  
**Eur. J. Biochem.**, 22, 331-344.
36. HANNECART-POKORNI, E., GODARD, C. et BEUMER, J., 1976.  
Chimiotypes de mutants R de *Shigella flexneri* et récepteurs de phages. Etude chimique des lipopolysaccharides.  
**Ann. Microbiol.**, 127B, 1-14.
37. IWASHITA, S. and KANEGASAKI, S., 1973.  
Smooth specific phage adsorption : endorhamnosidase activity of tail parts of P22.  
**Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 55, 403-409.
38. IWASHITA, S. and KANEGASAKI, S., 1975.  
Release of O antigen polysaccharide from *Salmonella newington* by phage  $\epsilon$ 34.  
**Virology**, 68, 27-34.
39. IWASHITA, S. and KANEGASAKI, S., 1976.  
Enzymic and molecular properties of baseplate parts of bacteriophage P22.  
**Eur. J. Biochem.**, 65, 87-94.
40. IWASHITA, S. and KANEGASAKI, S., 1976.  
Deacetylation reaction catalysed by *Salmonella* phage C341 and its baseplate parts.  
**J. Biol. Chem.**, 251, 5361-5365.

41. JACKSON, S.W. and ZEY, P.N., 1973.  
Ultrastructure of lipopolysaccharide isolated from **Treponema pallidum**.  
**J. Bacteriol.**, 114, 838-844.
42. JARRELL, K.F. and KROPINSKI, A.M.B., 1976.  
The isolation and characterization of a lipopolysaccharide-specific  
**Pseudomonas aeruginosa** bacteriophage.  
**J. Gen. Virol.**, 33, 99-106.
43. JARRELL, K.F. and KROPINSKI, A.M.B., 1977.  
The identification of the cell wall receptor for bacteriophage E79 in  
**Pseudomonas aeruginosa** PAO.  
**J. Virol.**, 23, 461-466.
44. JARRELL, K.F. and KROPINSKI, A.M.B., 1981.  
**Pseudomonas aeruginosa** bacteriophage  $\phi$  PLS27 lipopolysaccharide inter-  
actions.  
**J. Virol.**, 40, 411-420.
45. JARRELL, K.F. and KROPINSKI, A.M.B., 1981.  
Coliphage T7 réceptors are present in **Pseudomonas aeruginosa** rough  
lipopolysaccharides.  
**Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 99, 1185-1190.
46. KAMBERGER, W., 1979.  
An ouchterlony double diffusion study on the interaction between legume  
lectins and rhizobial cell surface antigens.  
**Arch. Microbiol.**, 121, 83-90.
47. KAMBERGER, W., 1979.  
Role of cell surface polysaccharides in **Rhizobium** pea symbiosis.  
**FEMS Microbiol. Lett.**, 6, 361-365.
48. KANEGASAKI, S. and WRIGHT, A., 1973.  
Studies on the mechanism of phage adsorption : interaction between  
phage  $\epsilon$  15 and its cellular receptor.  
**Virology**, 52, 160-173.
49. KATO, G., MARUYAMA, Y., and NAKAMURA, M., 1980.  
Role of bacterial polysaccharides in adsorption process of the **Rhizobium**  
pea symbiosis.  
**Agric. Biol. Chem.**, 44, 2843-2855.

50. KEDZIERSKA, B., 1978.  
N-acetyl-neuraminic acid : a constituent of the lipopolysaccharide of **Salmonella typhi**.  
**Eur. J. Biochem.**, 91, 545-552.
51. KLECKZKOWSKA, J., 1945.  
The production of plaques by **Rhizobium** bacteriophage in poured plated and its values as a counting method.  
**J. Bacteriol.**, 50, 71-80.
52. KNIREL, Y.A., VINOGRADOV, E.V., L'VOV, V.L., KOCHAROVA, N.A., SHASHKOV, A.S., DMITRIEV, B.A. and KOCHETKOV, N.K., 1984.  
Sialic acids of a new type from the lipopolysaccharides of **Pseudomonas aeruginosa** and **Shigella boydii**.  
**Carbohydr. Res.**, 123, C5-C8.
53. KNIREL, Y.A. and KOCHETKOV, N.K., 1987.  
2,3 diamino-2,3 dideoxyuronic and 5,7 diamino 3, 5, 7, 9 tetra-deoxy-nonulosonic acids : new components of bacterial polysaccharides.  
**FEMS Microbiol. Rev.**, 46, 381-385.
54. KRAUSS, J.H., KEUTER, G., SCHAUER, R., WECKESSER, J. and MAYER, H., 1988.  
Sialic acids containing lipopolysaccharides in purple non sulfur bacteria.  
**Arch. Microbiol.**, 150, 584-589.
55. KROPINSKI, A.M.B., CHAN, L., JARRELL, K.F. and MILAZZO, F.H., 1977.  
The nature of **Pseudomonas aeruginosa** strain PAO bacteriophage receptors.  
**Can. J. Virol.**, 23, 653-658.
56. KROPINSKI, A.M.B., CHAN, L. and MILAZZO, F.H., 1979.  
The extraction and analysis of lipopolysaccharides from **Pseudomonas aeruginosa** strain PAO and three rough mutants.  
**Can. J. Microbiol.**, 25, 390-398.
57. LAIRD, D.G., 1932.  
Bacteriophage and the root nodule bacteria.  
**Arch. Microbiol.**, 3, 159-193.
58. LESLEY, S.M., 1981.  
A bacteriophage typing system for **R. meliloti**.  
**Can. J. Microbiol.**, 28, 180-189.

59. LINDBERG, A.A., 1967.  
Studies of a receptor for Felix 0-1 phage in **Salmonella minnesota**.  
**J. Gen. Microbiol.**, 48, 225-233.
60. LINDBERG, A.A. and HELLERQUIST, G.G., 1971.  
Bacteriophage attachment sites serological specificity and chemical composition of the lipopolysaccharides of semi-rough and rough mutants of **Salmonella typhimurium**.  
**J. Bacteriol.**, 105, 57-64.
61. LINDBERG, A.A., 1973.  
Bacteriophage receptors.  
**Ann. Rev. Microbiol.**, 27, 205-241.
62. LOPES, J. and INNES, W.E., 1970.  
Electron microscopic study of lipopolysaccharide from an avain strain of **Escherichia coli** O18.  
**J. Bacteriol.**, 103, 238-248.
63. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., 1951.  
Protein measurement with the folin phenol reagent.  
**J. Biol. Chem.**, 193, 265-273.
64. LUDERITZ, O., 1970.  
Neuere Ergebnisse zur Biochimie der Zellwand lipopolysaccharide von **Salmonella** Bakterien.  
**Angew. Chem. Dtsch.**, 82, 708-722.
65. MARSHALL, K.C., 1956.  
A lysogenic strain of **Rhizobium trifolii**.  
**Nature**, 177, 92.
66. MEYER, A., DEIANA, J. et LECLERC, H., 1984.  
Cours de Microbiologie générale.  
Ed. Doin, Paris.
67. MUTOH, V., FURUKAWA, H. and MIZUSHIMA, S., 1978.  
Role of lipopolysaccharide and outer membrane protein of **Escherichia coli** K-12 in the receptor activity for bacteriophage T4.  
**J. Bacteriol.**, 136, 693-699.
68. OKUDA, S., SATO, M., UCHIYAMA, H. and TAKAHASHI, H., 1975.  
Degradation of lipopolysaccharide of **Escherichia coli** by a hot phenol extraction.  
**J. Gen. Appl. Microbiol.**, 21, 169-184.



69. PATE, J.C., PETZOLD, S.J. and UMBREIT, T.H., 1979.  
two flagellotropic phages and one pilus-specific phage active against  
**Asticcacaulis biprosthecum**.  
**Virology**, 94, 24-37.
70. PEMBERTON, J.M., 1973.  
A DNA bacteriophage specific for the pili of **Pseudomonas aeruginosa**  
strain PAO.  
**Virology**, 55, 558-560.
71. PLANQUE, K., VON NIEROP, J.J., BURGERS, A. and WILKINSON, S.G.,  
1979.  
The lipopolysaccharide of free-living and bacteroid forms of **Rhizobium**  
**leguminosarum**.  
**J. Gen. Microbiol.**, 110, 151-159.
72. PREHM, P., STIRM, S., JANN, B. and JANN, K., 1975.  
Cell wall lipopolysaccharides from **Escherichia coli**.  
**Eur. J. Biochem.**, 56, 41-55.
73. RABUSSAY, D., 1982.  
Bacteriophage T4 infection mechanisms. Molecular action of toxins and  
viruses.  
Eds. COHEN and VAN HEYNINGEN, Elsevier Biomedical Press, 219-331.
74. RAPIN, A.M.C. and KALCKAR, H.M., 1971.  
The relation of bacteriophage attachment to lipopolysaccharide  
structure.  
**In** : "Microbial toxins", **Academic Press**, IV, 267-307.
75. RESKE, K., WALLENFELS, B. and JANN, K., 1973.  
Enzymatic degradation of O-antigenic lipopolysaccharides by coliphage  
 $\Omega$  8.  
**Eur. J. Biochem.**, 36, 167-171.
76. REYNOLDS, P.H.S., BOLAND, M.J., BLEVINS, D.G., RANDALL, D.D.  
and SCHUBERT, K.R., 1982.  
Ureide biogenesis in leguminous plants.  
**Trends Biochem. Sci.**, 7, 366-368.
77. RIEGER, D., FREUND-MOLBERT, E. and STIRM, S., 1975.  
**Escherichia coli** capsule bacteriophages. III - Fragments of bacteriophage  
29.  
**J. Virol.**, 15, 964-975.

78. ROMEO, D., GIRARD, A. and ROTHFIELD, L., 1970.  
Reconstitution of a functional membrane enzyme system in a mono-molecular film. I - Formation of a mixed monolayer of lipopolysaccharide and phospholipid.  
**J. Molec. Biol.**, 53, 475-490.
79. RUDOLPH, C., FREUND-MOLBERT, E. and STIRM, S., 1975.  
Fragments of **Klebsiella** bacteriophage n°11.  
**Virology**, 64, 236-246.
80. RUSSA, R. and LORKIEWICZ, Z., 1974.  
Fatty acids present in the lipopolysaccharides of **Rhizobium trifolii**.  
**J. Bacteriol.**, 119, 771-775.
81. RUSSA, R., URBANIK, T., ZURKOWSKI, W. and LORKIEWICZ, Z., 1981.  
Neutral sugars in lipopolysaccharides of **Rhizobium trifolii** and its non-nodulating mutant.  
**Plant Soil**, 61, 81-85.
82. SAHIM, L., 1983.  
Approche génétique de la relation phage-bactérie chez **Rhizobium meliloti**.  
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°1060, Université de Lille Flandres-Artois.
83. SALKINOJA-SALOEN, M. and BOECK, R., 1978.  
Characterization of lipopolysaccharides isolated from **Agrobacterium tumefaciens**.  
**J. Gen. Microbiol.**, 105, 119-125.
84. SCHMIDT, G., FROMME, I. and MAYER, H., 1970.  
Immunochemical studies on core lipopolysaccharides of Enterobacteriaceae of different genera.  
**Eur. J. Biochem.**, 14, 357-366.
85. SCHOLL, D.R. and JOLLIICK, J.D., 1980.  
Pilus-dependant, double stranded DNA bacteriophage for **Caulobacter**.  
**J. Virol.**, 35, 949-954.
86. SENEZ, C., 1968.  
Microbiologie générale.  
Ed. Doin, Paris.
87. SHANDS, J.W., GRAMAN, J.A. and NATH, K., 1967.  
The morphologie structure of isolated bacterial lipopolysaccharide.  
**J. Mol. Biol.**, 5, 15-21.

88. SHAW, D.R.D. and CHATTERJEE, A.N., 1971.  
O-acetyl groups as a component of the bacteriophage receptor on **Staphylococcus aureus** cell walls.  
**J. Bacteriol.**, 108, 584-585.
89. SIK, T., HORWATH, J. and CHATTERJEE, S., 1980.  
Generalized transduction in **Rhizobium meliloti**.  
**Molec. Gen. Genet.**, 178, 511-516.
90. SMITH, R.W., ZAMZE, S.E. and HIGNETT, R.C., 1985.  
Composition of lipopolysaccharide from **Pseudomonas syringae** pv. **morsprunorum** and its digestion by bacteriophage A7.  
**J. Gen. Microbiol.**, 131, 963-973.
91. STACEY, G., POCRATSKY, L.A. and PUVANESARAJAH, V., 1984.  
Bacteriophage that can distinguish between wild type **Rhizobium japonicum** and a non nodulating mutant.  
**Appl. Envir. Microbiol.**, 84, 68-72.
92. STANIEWSKI, R., 1970.  
Relation-ship among different **Rhizobium** strains determined by phage lysis.  
**Acta Microbiol. Polon.**, Ser. B, 2, 3-12.
93. STRUZYK-NICOLAIDIS, M.J., 1985.  
La reconnaissance **Rhizobium meliloti**-Luzerne : rôle d'une lectine végétale et des exopolysaccharides bactériens.  
Mémoire de Diplôme d'Ingénieur, Conservatoire National des Arts et Métiers de Lille.
94. SUTHERLAND, I.W., 1977.  
Surface carbohydrates of the prokaryotic cell.  
**Academic Press**, 8, 290-349.
95. TAKAYAMA, K., QUERESHI, N. and MASCAGNI, P., 1983.  
Complete structure of lipid A obtained from the lipopolysaccharides of the heptoseless mutant of **Salmonella typhimurium**.  
**J. Biol. Chem.**, 258, 12801-12802.
96. TEMPLE, G.S., AYLING, P.D. and WILKINSON, S.G., 1986.  
Isolation and characterization of a lipopolysaccharide specific bacteriophage of **Pseudomonas aeruginosa**.  
**Microbios**, 45, 81-91.

97. TOMAS, J.M. and JOFRE, J.T., 1985.  
Lipopolysaccharide-specific bacteriophage for **Klebsiella pneumoniae** C3.  
**J. Bacteriol.**, 162, 1276-1279.
98. TOMAS, J.M., BENEDI, V.J. and JOFRE, J.T., 1987.  
Identification of the cell surface receptor for FC 3-2, FC 3-3 and FC 3-6 bacteriophages from **Klebsiella pneumoniae**.  
**FEMS Microbiol. Lett.**, 41, 223-228.
99. TWORT, S.W., 1915.  
An investigation of the nature of the ultramicroscopic viruses.  
**Lancet**, 2, 1241-1243.
100. TZAGOLOFF, H. and PRATT, D., 1964.  
The initial steps in infection with coliphage M13.  
**Virology**, 24, 372-380.
101. UGALDE, R.A., HANDELSMAN, J. and BRILL, W.J., 1986.  
Role of galactotransferase activity in phage sensitivity and nodulation competitiveness of **Rhizobium meliloti**.  
**J. Bacteriol.**, 166, 148-154.
102. VARKI, A. and DIAZ, S., 1984.  
The release and purification of sialic acids from glycoconjugates : methods to minimize the loss and migration of acetyl groups.  
**Anal. Biochem.**, 137, 236-247.
103. VINCENT, J.M., 1974.  
Root nodule symbioses with **Rhizobium**. The biology of nitrogen fixation.  
**Frontiers of Biology**, 33, 265-341.
104. VINH, T., ADZER, B. and FAINE, S., 1986.  
Ultrastructure from chemical composition of lipopolysaccharide extracted from **Leptospira interrogans** serovar **copenhageni**.  
**J. Gen. Microbiol.**, 132, 103-109.
105. WERQUIN, M. et BEN BRAHIM, M., 1977.  
Etude des bactériophages de **Rhizobium meliloti**.  
**C. R. Acad. Sci. Paris**, 284, 1851-1854.
106. WESTPHAL, O. and JANN, K., 1965.  
Bacterial lipopolysaccharides : extraction with phenol-water and further applications of the procedure.  
**Methods in Carbohydr. Chem.**, 5, 83-91.

107. WILKINSON, S.G., GALBRAITH, L. and LIGHTFOOT, G.A., 1973.  
Cell walls, lipids and lipopolysaccharides of **Pseudomonas** species.  
**Eur. J. Biochem.**, 33, 153-174.
108. WILKINSON, S.G. and GALBRAITH, L., 1975.  
Studies of lipopolysaccharides from **Pseudomonas aeruginosa**.  
**Eur. J. Biochem.**, 52, 331-343.
109. WOLLMAN, E. et WOLLAMAN, E., 1933.  
Bactériophage et lyse secondaire.  
**C. R. Soc. Biol.**, 112, 164-165.
110. WOLPERT, J.S. and ALBERSHEIM, P., 1976.  
Host-symbiont interactions. I - The lectins of legumes interact with  
the O-antigen containing lipopolysaccharides of their symbiont rhizobia.  
**Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 70, 729-737.
111. YUREWICZ, E.D., GHALAMBOR, M.A., DUCKWORTH, D.H. and HEATH,  
E.C., 1971.  
Catalytic and molecular properties of a phage-induced capsular poly-  
saccharide depolymerase.  
**J. Biol. Chem.**, 246, 5607-5616.
112. ZAJAC, E., RUSSA, R. and LORKIEWICZ, Z., 1975.  
Lipopolysaccharide as receptor for **Rhizobium** phage 1P.  
**J. Gen. Microbiol.**, 90, 365-367.
113. ZAJAC, E. and LORKIEWICZ, Z., 1983.  
Role of O-acetyl groups in the lipopolysaccharide receptor for  
**Rhizobium** phage 1P.  
**J. Gen. Microbiol.**, 129, 3171-3176.
114. ZAJAC, E., 1987.  
The native structure of **Rhizobium** 24SM lipopolysaccharide required  
for 1P inactivation.  
**Acta Microbiologica Polonica**, 36, 169-178.
115. ZAJAC, E., 1988.  
Interaction of bacteriophage 1P with the cell surface components of  
**Rhizobium trifolii** 24SM.  
**J. Basic Microbiol.**, 28, 409-415.

116. ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C. and WINCEDON, G., 1972.  
Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the  
O-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to  
glycoproteins and glycolipids.  
**J. Chromat.**, 69, 291-304.
117. ZEVENHUIZEN, L.P.T.M., SCHOLTEN-KOERSELMAN, I. and  
POSTHUMUS, M.A., 1980.  
Lipopolysaccharides of **Rhizobium**.  
**Arch. Microbiol.**, 125, 1-8.

