

50376  
1989  
297

50376  
1989  
297

N° d'ordre : 782

# THÈSE D'ÉTAT

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

U.F.R. DES SCIENCES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES

pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Michel WERQUIN



## LES BACTERIOPHAGES DE *RHIZOBIUM MELILOTI* : Isolement, Multiplication, Morphologie et Classification



Soutenue le 13 Décembre 1989 devant la Commission d'Examen

M.	J.B.	GUILLAUME	Professeur Université de Lille I,	Président et Rapporteur
M.	H.W.	ACKERMANN	Professeur Université Laval de Québec,	Rapporteur
M.	R.	TAILLIEZ	Professeur Université de Lille I,	Rapporteur
Mme	J.	ROCOURT	Docteur Institut Pasteur de Paris,	Examineur
M.	E.	VIVIER	Professeur Université de Lille I,	Examineur
M.	G.	PRENSIER	Professeur Université de Clermont Ferrand,	Examineur

*A Evelyne,*

*A Sylvie, Stéphanie et Olivier.*

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

Le travail de Thèse, présenté ici, a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Jean GUILLAUME. En m'accueillant en 1966 dans votre Laboratoire de Chimie Bactérienne à l'Institut Pasteur de Lille puis l'année suivante au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Lille, vous m'avez formé à la Recherche. Grâce à vos conseils judicieux, votre soutien constant et l'expression de votre amitié, ce travail de Thèse a pu être mené à bien. Je vous en remercie très vivement. Permettez-moi également de vous exprimer toute ma gratitude d'avoir accepté d'être à la fois le Rapporteur de ce travail et d'assurer la Présidence du Jury.

La phase finale de ce travail a été réalisée au Département de Microbiologie de l'Université LAVAL de QUEBEC et plus particulièrement au Centre de Référence pour Virus Bactériens "Félix d'Hérelle" fondé et dirigé par le Professeur Hans-Wolfgang ACKERMANN. En m'accueillant chaleureusement pendant 6 mois à Québec, vous m'avez fait profiter de votre immense connaissance des bactériophages, de vos conseils éclairés et de votre amitié. Je vous dois beaucoup. Vous avez accepté de vous déplacer jusqu'à Lille pour juger et être l'un des Rapporteurs de ce travail ; je vous en remercie très vivement et vous assure de mon profond respect.

Que Monsieur Roger TAILLIEZ, Professeur à l'Institut Agricole et Alimentaire de Lille, soit également remercié d'avoir accepté d'être Rapporteur de ce travail. J'ai toujours trouvé auprès de lui une aide et une disponibilité sans faille.

Je suis gré à Madame le Docteur Jocelyne ROCOURT, de l'Unité d'Ecologie Bactérienne de l'Institut Pasteur de Paris, d'avoir accepté malgré ses multiples charges de juger ce travail.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Emile VIVIER d'avoir, en dépit de ses nombreuses occupations, accepté de consacrer un peu de son temps à l'évaluation de ce travail.

Monsieur le Professeur Gérard PRENSIER me fait l'immense plaisir de siéger à mon Jury de Thèse. Qu'il en soit remercié et accepte l'expression de mon amitié sincère.

Merci également à mes collègues et amis Claude DEFIVES et Philippe EB pour leur excellente collaboration tant scientifique qu'humaine.

Je ne saurais clore ici cette rubrique sans remercier chaleureusement :

- les membres des Laboratoires de Microbiologie de l'U.F.R. de Biologie et de Microbiologie Appliquée de l'U.F.R. des Sciences Agricoles et Alimentaires, collègues et amis qui à quelque titre que ce soit m'ont apporté aide et sympathie ;
- les membres du Laboratoire de Génétique du Département de Microbiologie de l'Université LAVAL de Québec, en particulier Monsieur le Professeur Roger LEVESQUE, Anne, Josée, Julien ainsi qu'Annie et Gilles BROCHU qui m'ont beaucoup aidé lors de mon séjour à QUEBEC ;
- un grand merci enfin à Michèle DELECOURT pour l'efficacité et le soin qu'elle a apportés à la dactylographie de cette Thèse ; à Madame Adeline AUGER et à Monsieur Daniel LAZARECKY pour la rapidité d'exécution des planches photographiques ainsi qu'à Monsieur Antoine BOTELLA et l'ensemble du Personnel du service de reprographie de l'Université de Lille Flandres-Artois pour leur participation efficace au façonnage final de cette Thèse.

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

ADN	: acide désoxyribonucléique.
ADP	: adénosine diphosphate.
ARN	: acide ribonucléique.
atm	: atmosphère.
ATP	: adénosine triphosphate.
AU	: acétate d'urane.
°C	: degré Celsius.
cpm	: coups par min.
C.S.	: constante de similitude.
dCTP	: désoxy-cytidine-triphosphate.
DO	: densité optique.
ED	: eau distillée.
EDTA	: éthylène-diamine-tétra-acétate.
g	: gramme.
J.C.	: Jésus Christ.
Kb	: kilobase.
kg	: kilogramme.
l	: litre.
M	: mole ou molaire.
MC	: mitomycine C.
Mdal	: mégadalton.
m	: mètre.
mg	: milligramme.
min	: minute.
ml	: millilitre.
mM	: millimole ou millimolaire.
mm	: millimètre.
m.o.i.	: "multiplicity of infection".
µg	: microgramme = $10^{-6}$ g.
µl	: microlitre = $10^{-6}$ l.
N.B	: nota bene.

NTG	: N-méthyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine.
nm	: nanomètre = $10^{-9}$ m.
$^{32}\text{P}$	: phosphore 32 radioactif.
PEG	: polyéthylène glycol.
PT	: phosphotungstate.
Pi	: phosphate inorganique.
QSP	: quantité suffisante pour.
R-M	: restriction-modification.
RTD	: "routine test dilution".
SSC	: standard saline citrate.
sec	: seconde.
t	: tonne.
Tris	: tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane.
t/min	: tours par min.
UFP	: unité formant plage.
UV	: ultraviolet.
V/V	: volume sur volume.
W	: watt.

## - S O M M A I R E -

- 0 0 0 -

REMERCIEMENTS .....	1
ABBREVIATIONS .....	3
TABLE DES MATIERES .....	5
LISTE DES FIGURES .....	12
LISTE DES TABLEAUX .....	13
LISTE DES PLANCHES .....	15
AVANT - PROPOS .....	16
INTRODUCTION	
I. - LA SYMBIOSE <u>RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE</u> .....	19
A. - <u>Les microorganismes fixateurs d'azote</u> .....	20
1 - Les bactéries fixatrices libres .....	20
2 - Les bactéries fixatrices symbiotiques .....	22
a) <u>Le genre Rhizobium</u> .....	22
b) <u>Les Cyanophycées</u> .....	24
c) <u>Les Actinomycètes</u> .....	24
d) <u>Autres manifestations de la symbiose</u> .....	25

B. - <u>Le macrosymbionte</u> .....	25
1 - Les Mimosacées .....	26
2 - Les Césalpinées .....	26
3 - Les Papilionacées .....	26
C. - <u>Le sol et la rhizosphère</u> .....	26
D. - <u>L'établissement de la symbiose Rhizobium-Légumineuse</u> .....	30
1 - Fixation de la bactérie sur le poil racinaire .....	30
2 - La courbure du poil absorbant .....	32
3 - L'invasion de la racine par le cordon infectieux .....	32
4 - Morphogenèse du nodule .....	33
E. - <u>L'activité nitrogénasique</u> .....	33
1 - Diffusion gazeuse dans le nodule et fonctionnement de la légghémoglobine .....	35
F. - <u>Le cycle de l'azote</u> .....	36
1 - La protéolyse .....	36
2 - L'ammonification .....	36
3 - La nitrification .....	36
4 - La dénitrification .....	38
G. - <u>Support génétique de la fixation de l'azote atmosphérique</u> ...	38
1 - La conjugaison .....	40
2 - La transformation et la transfection .....	41
3 - La transduction .....	41
4 - Les méthodes actuelles d'analyse génétique .....	42
II. - LES VIRUS DES BACTERIES OU BACTERIOPHAGES .....	43
A. - <u>Découverte des virus et des bactériophages</u> .....	43
1 - Des virus .....	43
2 - Des bactériophages .....	44
B. - <u>Classification des phages</u> .....	45
C. - <u>Présence des phages dans la nature</u> .....	46
D. - <u>Origine et évolution des phages</u> .....	49
1 - Origine .....	49
2 - Evolution .....	50



E. - <u>Multiplication des phages - Le cycle lytique</u> .....	51
1 - L'adsorption .....	51
2 - L'infection .....	52
3 - La multiplication .....	54
a) <u>La transcription</u> .....	55
b) <u>Réplication de l'acide nucléique viral</u> .....	58
α) <u>Réplication de l'ADN viral</u> .....	58
β) <u>Réplication de l'ARN viral</u> .....	58
c) <u>Morphogénèse virale</u> .....	58
4 - Libération des virions .....	60
F. - <u>La lysogénie - Le cycle tempéré</u> .....	60
G. - <u>Les utilisations pratiques des phages</u> .....	61
1 - La lysotypie .....	61
2 - Les contaminations phagiques au cours des fermentations industrielles .....	63
H. - <u>Le point sur les bactériophages du genre Rhizobium</u> .....	64
1 - Les phages et les éléments nutritifs présents dans le sol .....	65
2 - Les phages et la culture des Légumineuses .....	65
3 - Le nombre de phages présente des fluctuations très marquées selon les saisons .....	65
4 - Les phages présents dans la rhizosphère participent à l'installation de mutants inefficients .....	66
5 - Les populations bactériennes et phagiques présentent des fluctuations en fonction de la composition des sols .....	66
6 - Les phages de <u>Rhizobium</u> actuellement décrits .....	67
 B U T D U T R A V A I L .....	 69
 C H A P I T R E I : M A T E R I E L E T M E T H O D E S	
 I. - LES SOUCHES BACTERIENNES .....	 70
A. - <u>Obtention et origine</u> .....	70
1 - Isolement des <u>Rhizobium meliloti</u> à partir de nodules du Luzerne ( <u>Medicago sativa</u> L.) .....	70
2 - Nodulation de <u>R. meliloti in vitro</u> .....	70

3 - Nomenclature .....	71
4 - Souches bactériennes utilisées .....	71
B. - <u>Conditions de culture</u> .....	73
C. - <u>Conservation des bactéries</u> .....	73
 II. - LES BACTERIOPHAGES .....	 73
A. - <u>Obtention et origine des bactériophages</u> .....	73
1 - Isolement des bactériophages à partir d'échantillons de terre .....	73
2 - Isolement de bactériophages tempérés après traitement des bactéries par des agents mutagènes .....	74
a) <u>A la mitomycine C</u> .....	75
b) <u>Aux rayons ultra-violets</u> .....	76
c) <u>A la nitrosoguanidine</u> .....	76
3 - Nomenclature .....	76
4 - Les bactériophages utilisés .....	77
B. - <u>Conditions d'obtention des bactériophages</u> .....	78
1 - Réalisation d'un stock de phages .....	78
2 - Numération d'un stock de phages .....	78
C. - <u>Conservation des bactériophages</u> .....	79
 III. - MILIEUX DE CULTURE .....	 79
A. - <u>Pour la culture des bactéries et la prolifération des phages</u> .	79
1 - Milieu RC de LAIRD, modifié par DELATTRE, gélosé ou non .....	79
2 - Milieu TY de BERINGER .....	80
3 - Gélose bactériophage .....	80
B. - <u>Utilisés pour la culture des Légumineuses</u> .....	81
1 - Milieu de NICOL et THORNTON .....	81
2 - Milieu de WRIGHT .....	81

C. - <u>Tampons</u> .....	82
1 - Tampon de non prolifération (TNP) .....	82
2 - Tampon pour bactériophages .....	82
3 - Tampon de dialyse .....	82

## R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N S

### C H A P I T R E II : PRODUCTION DES PHAGES DE RHIZOBIUM

I. - PRODUCTION DES PHAGES EN PETITE QUANTITE .....	83
A. - <u>En boîtes de Petri</u> .....	83
B. - <u>En milieu liquide</u> .....	83
C. - <u>Application à l'étude des facteurs influençant l'adsorption</u> ..	85
1 - Rôle de l'agitation .....	85
2 - Influence de la multiplicité d'infection (m.o.i.) .....	89
3 - Mise en évidence de la dépendance de certains de nos phages vis-à-vis du calcium et du magnésium ....	91
4 - Détermination du pourcentage et de la constante d'adsorption .....	98
a) <u>Technique employée</u> .....	98
b) <u>Résultats et conclusion</u> .....	99
II. - PRODUCTION DES PHAGES EN GRANDE QUANTITE - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'OBTENTION DES PHAGES DE RHIZOBIUM EN FERMENTEUR .....	103
A. - <u>Préparation d'une fermentation</u> .....	103
1 - Préparation du matériel .....	103
2 - Réalisation de la préculture .....	105
3 - Préparation du fermenteur .....	105
4 - Ensemencement de la préculture et affichage des conditions de culture .....	105
5 - Préparation des phages .....	106
B. - <u>Suivi de la fermentation et appréciation de la lyse</u> .....	106
C. - <u>Concentration et purification des phages</u> .....	108
1 - Concentration .....	108

2 - Purification .....	110
D. - <u>Résultats et conclusion</u> .....	111
 C H A P I T R E III : CARACTERISATION DES PHAGES	
I. - RELATIONS SEROLOGIQUES .....	113
A. - <u>Préparation des immunsérums</u> .....	113
1 - Préparation des phages .....	113
2 - Animaux expérimentaux .....	114
3 - Conditions d'obtention et de conservation des immunsérums .....	114
B. - <u>Mise en évidence de l'activité anti-virale des             immunsérums</u> .....	115
C. - <u>Parentés sérologiques - Résultats et conclusion</u> .....	117
D. - <u>Application à la détermination de la durée de la             période de latence et du nombre de phages             produits par bactérie</u> .....	120
1 - Technique employée .....	120
2 - Résultats .....	122
II. - SPECTRES LYTIQUES OU SPECIFICITE D'HOTE (HOST-RANGE) .	127
A. - <u>Mise en évidence d'une restriction-modification             contrôlée par l'hôte chez Rhizobium meliloti</u> .....	128
B. - <u>Préparation des bactéries et des phages</u> .....	139
C. - <u>Détermination de la dilution test standard             (Routine Test Dilution : RTD)</u> .....	139
D. - <u>Conditions expérimentales utilisées</u> .....	141
E. - <u>Résultats et conclusion</u> .....	141
III. - MORPHOLOGIE ET MENSURATIONS DES PHAGES .....	143
A. - <u>Préparation des échantillons</u> .....	145
B. - <u>Colorations</u> .....	145
C. - <u>Observation des échantillons et microphotographies</u> .....	145

D. - <u>Résultats et conclusion</u> .....	146
1 - Dimensions .....	146
2 - Morphologie et caractéristiques phagiques .....	154
3 - Planches photographiques 1 à 9 .....	157
IV. - HOMOLOGIES DES ADN .....	175
A. - <u>Extraction et purification des ADN phagiques</u> .....	175
B. - <u>Détermination des masses moléculaires des ADN</u> .....	175
C. - <u>Hybridations ADN-ADN</u> .....	176
D. - <u>Résultats et conclusion</u> .....	177
(Electrophorégrammes et autoradiogrammes : planche 10) ....	179
CONCLUSION GENERALE .....	181
PUBLICATIONS RELATIVES A LA THESE .....	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	186
RESUME .....	205

## L I S T E D E S F I G U R E S

Figure 1	- Processus d'infection et développement d'un nodule sur une racine de Soja ( <b>Glycine max</b> ) .....	31
Figure 2	- Le cycle de l'azote .....	37
Figure 3	- Les six groupes morphologiques des bactériophages ....	47
Figure 4	- Morphotypes phagiques actuellement reconnus .....	48
Figure 5	- Les sites d'adsorption des bactériophages .....	53
Figure 6	- Courbe de multiplication du phage T2 .....	56
Figure 7	- Représentation schématique de l'assemblage du phage T4 .....	59
Figure 8	- Schéma des cycles lytique et lysogène .....	62
Figure 9	- Lyse de cultures de <b>R. meliloti</b> en milieu RC fructosé par différents bactériophages en fonction de la concentration en $\text{CaCl}_2$ et $\text{MgCl}_2$ ..	92
Figure 10	- Lyse de <b>R. meliloti</b> par les phages NM6, NM9 et CM3 en l'absence ou la présence de $\text{Ca}^{2+}$ et/ou $\text{Mg}^{2+}$ . Pourcentage d'absorbance en fonction du temps .....	95
Figure 11	- Lyse de <b>R. meliloti</b> par les phages CM4 <sub>2</sub> et CM8 en l'absence ou la présence de $\text{Ca}^{2+}$ et/ou $\text{Mg}^{2+}$ . Pourcentage d'absorbance en fonction du temps .....	96
Figure 12	- Représentation schématique du fermenteur SETRIC de type F-7T .....	104
Figure 13	- Variation en fonction du temps du pourcentage d'oxygène dissous et de la densité optique d'une culture en fermenteur de <b>R. meliloti</b> M9S infectée par le phage NM1 .....	107
Figure 14	- Représentation graphique de la multiplication phagique en une seule étape du phage NM2 sur <b>R. meliloti</b> M9S .....	124
Figure 15	- Représentation graphique de la multiplication phagique en une seule étape du phage CM20 sur <b>R. meliloti</b> M18S .....	125

## L I S T E D E S T A B L E A U X

Tableau 1	- Organismes fixateurs libres et fixations associatives d'azote .....	21
Tableau 2	- Groupes d'inoculation du genre <b>Rhizobium</b> .....	23
Tableau 3	- Classification actuelle du genre <b>Rhizobium</b> .....	24
Tableau 4	- Principaux genres de Légumineuses et leurs utilisations .....	27
Tableau 5	- Nombre de microorganismes et biomasse présents dans un sol fertile dans la zone comprise entre la surface et 15 cm de profondeur .....	29
Tableau 6	- Les phages de <b>Rhizobium</b> , de <b>Bradyrhizobium</b> et du <b>Rhizobium</b> du "Cowpea group" actuellement décrits .....	68
Tableau 7	- Souches bactériennes utilisées et leur origine .....	72
Tableau 8	- Evolution de la densité optique d'une culture de la souche lysogène M5N1 en fonction du temps en présence de différentes concentrations en mitomycine C .....	75
Tableau 9	- Les bactériophages et leurs souches propagatrices .....	77
Tableau 10	- Titres des stocks de phages obtenus sur milieu solide .....	84
Tableau 11	- Aspect et dimension des plages de lyse des phages isolés du sol .....	86
Tableau 12	- Aspect et dimension des plages de lyse des phages isolés de bactéries lysogènes .....	87
Tableau 13	- Influence de l'agitation sur la production de phages ...	88
Tableau 14	- Nombre de phages présents dans le milieu après 18 heures de lyse en fonction de la multiplicité d'infection employée .....	90
Tableau 15	- Lyse bactérienne en l'absence ou en présence de $\text{CaCl}_2$ $4 \times 10^{-4}$ M et $\text{MgCl}_2$ $5 \times 10^{-4}$ M .	94
Tableau 16	- Evaluation du nombre de particules non adsorbées en fonction du temps .....	100
Tableau 17	- Pourcentage d'adsorption des phages en fonction du temps .....	101

Tableau 18	- Constante d'adsorption K calculée pour 5 min de contact .....	102
Tableau 19	- Influence de la concentration en PEG 6000 sur la précipitation de 5 phages .....	108
Tableau 20	- Multiplication en fermenteur des bacté- riophages de <b>R. meliloti</b> : estimation de la durée de la lyse et du nombre de phages produits après précipitation au PEG 6000 et centrifugation en CICs .....	112
Tableau 21	- Pourcentages d'inhibition des phages CM1, NM1 et MM1H par leur propre antisérum .....	116
Tableau 22	- Relations sérologiques .....	118
Tableau 23	- Relations sérologiques .....	119
Tableau 24	- Protocole de la manipulation de mise en évidence de la multiplication phagique en une seule étape .....	121
Tableau 25	- Multiplication phagique en une seule étape : suivi de l'apparition des plages de lyse du phage NM2 cultivé sur <b>R. meliloti</b> M9S en fonction du temps à partir des tubes FGT et SGT .....	123
Tableau 26	- Multiplication phagique en une seule étape : suivi de l'apparition des plages de lyse du phage CM20 cultivé sur <b>R. meliloti</b> M18S en fonction du temps à partir des tubes FGT et SGT .....	123
Tableau 27	- Durée de la phase de latence et nombre de phages libérés par bactérie pour 9 des phages isolés du sol .....	126
Tableau 28	- Détermination de la dilution test standard (Routine Test Dilution = RTD) .....	140
Tableau 29	- Spécificité d'hôte des phages groupés par morphotype .	142
Tableau 30	- Relevé des dimensions du phage NM1 .....	147
Tableau 31	- Mensurations des phages du morphotype CM1 .....	148
Tableau 32	- Mensurations des phages du morphotype $\Phi$ M11S .....	149
Tableau 33	- Mensurations des phages du morphotype NM1 .....	150
Tableau 34	- Mensurations des phages du morphotype NM8 .....	151
Tableau 35	- Mensurations des phages du morphotype MM1H .....	152
Tableau 36	- Tableau récapitulatif des dimensions des 33 phages de <b>R. meliloti</b> étudiés .....	153



## L I S T E D E S P L A N C H E S

Planche 1	- Vue d'ensemble de phages du morphotype CM1 .....	158
Planche 2 et 3	- Vues de détail de phages du morphotype CM1 .....	160 162
Planche 4	- Vues de détail de phages du morphotype $\Phi$ M11S .....	164
Planche 5	- Vues d'ensemble de phages du morphotype NM1 .....	166
Planche 6	- Vues de détail de phages du morphotype NM1 .....	168
Planche 7 et 8	- Vues de détail de phages du morphotype NM8 .....	170 172
Planche 9	- Vues d'ensemble et de détail de phages du morphotype MM1H .....	174
Planche 10	- Electrophorégrammes d'ADN phagiques digérés par des enzymes de restriction et autoradiogrammes après hybridation .....	180

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

Sur notre planète, le déséquilibre dans la répartition des richesses protéiques devient chaque jour plus important et alarmant. En effet, la production de protéines tend à s'élever légèrement alors que la population mondiale s'accroît de façon exponentielle. Le déficit du bilan protéique par terrien ne cesse alors de s'accroître avec toutes les distorsions économiques et sociales qui peuvent en résulter.

Pour remédier à cet état de fait, il est nécessaire dans un premier temps d'accroître la production de protéines et ensuite de la répartir de façon équitable.

Dans la biosphère, les principaux éléments d'importance biologique passent de manière cyclique de l'état organique à l'état minéral et vice-versa. Les cycles les mieux connus, ceux du carbone, du soufre et de l'azote maintiennent à eux trois un équilibre stable entre la biosphère de notre planète et la chimiosphère. L'azote est après l'eau le facteur limitant de la production agricole qui elle-même conditionne la survie et le développement de l'espèce humaine. La seule réserve d'azote disponible dans le monde est l'azote atmosphérique. Estimée à  $4 \times 10^{12}$  tonnes, elle est pratiquement infinie.

L'étape critique du cycle de l'azote est le stade de la fixation biologique de l'azote, c'est-à-dire son passage de l'état moléculaire inorganique à l'état organique. On estime cette fixation biologique à  $174 \times 10^6$  t par an, soit environ 70 p100 de la quantité totale ( $260 \times 10^6$  t), d'azote fixé sur terre chaque année.

Elle se réalise dans la nature grâce à des microorganismes tels que les bactéries et les cyanobactéries (autrefois appelées Cyanophycées ou algues bleu-vert). Ces bactéries, telles **Clostridium**, **Klebsiella**, **Pseudomonas** peuvent fixer l'azote à l'état libre. Le **Rhizobium**, par contre, ne fixe l'azote atmosphérique que lorsqu'il entre en symbiose avec les plantes de la famille des Légumineuses. Il induit chez celles-ci la formation de nodules ou nodosités racinaires dans lesquels a lieu la transformation de l'azote gazeux en ammoniac grâce à un complexe enzymatique la nitrogénase. Cette réaction, coûteuse en énergie, nécessite 28 moles d'ATP par mole d'azote réduit. Les cyanobactéries capables de fixer l'azote à l'état libre peuvent aussi la réaliser en association avec certains gymnospermes de régions tropicales ou

subtropicales. Certaines Actinomycètes (bactéries ayant un aspect filamenteux les faisant ressembler à des Champignons inférieurs) peuvent, elles aussi, fixer l'azote en association avec des Angiospermes non légumineuses tel l'aune par exemple. Les symbioses avec nodosités sont des systèmes fixateurs plus efficaces que les bactéries fixatrices libres et les systèmes associatifs. En effet, ces derniers ne fixent l'azote que pendant de courtes périodes correspondant à des conditions d'environnement propices. La symbiose **Rhizobium**-Légumineuse est responsable à elle seule de la fixation de près de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique [HARDY et HAVELKA (125)].

Qu'elle soit d'origine biologique ou chimique, la synthèse d'ammoniac nécessite d'importantes dépenses en énergie. La synthèse d'engrais azotés (procédé F. HABER et BOSCH 1943) s'effectue à grand renfort d'énergie fossile non renouvelable dans des délais raisonnables. Une estimation faisait état d'une utilisation de 2 millions de barils de pétrole en 1975. Qu'en est-il de nos jours ? Ces chiffres parlent d'eux mêmes et montrent l'importance économique du processus de la fixation de l'azote par voie biologique.

L'optimisation des systèmes symbiotiques, décrits précédemment, ainsi que leur extension à d'autres espèces végétales telles que les céréales, par exemple, permettraient d'augmenter les rendements en protéines et de réaliser d'importantes économies d'énergie.

Les composants du couple **Rhizobium**/Légumineuse, chacun en ce qui les concerne, jouent un rôle important dans la fixation symbiotique de l'azote. Ils ne sont pas les seuls, le sol, la rhizosphère et le rhizoplan interviennent également : le sol par sa structure, son humidité et sa composition ; la rhizosphère et le rhizoplan par la nature des germes présents ainsi que par le rôle joué par les excréments racinaires. Cette zone privilégiée est le siège de la croissance d'une microflore variée où se déroulent de nombreux phénomènes de compétition entre les différentes souches bactériennes mais également sous l'action des bactériophages dont la présence dans cette zone est quasi-permanente.

Notre travail a porté sur l'étude d'un des éléments important de la rhizosphère de **Rhizobium** : les bactériophages de **Rhizobium meliloti**. Avant

de décrire nos résultats expérimentaux, nous allons, dans un premier temps, étudier le phénomène de la symbiose **Rhizobium**-Légumineuse puis, ensuite, traiter des phages en général et, enfin, des phages de **Rhizobium**, en particulier.

# INTRODUCTION

## I. - LA SYMBIOSE RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE

La culture des Légumineuses destinées à l'alimentation humaine, remonte au VI<sup>e</sup> millénaire avant J.-C. Des pois, des lentilles, des vesces et des fèves ont en effet été mis à jour lors de fouilles réalisées au Moyen-Orient. Le haricot était consommé au Mexique, le soja en Chine respectivement 4 000 ans et 5 000 ans avant J.-C. La luzerne fut utilisée pour la première fois comme fourrage sous Alexandre I<sup>er</sup> de Macédoine (Ve siècle avant J.-C.). La culture ne s'étendit à l'Europe qu'à partir du XV<sup>e</sup> siècle en même temps que celle du trèfle violet. La culture de ces deux Légumineuses induisit l'utilisation accrue dans l'alimentation humaine de produits animaux tels que le lait et la viande. Parallèlement, une meilleure fertilisation des sols grâce à leur enrichissement en azote par l'enfouissement de la luzerne ou du trèfle permit d'augmenter les rendements en céréales.

Si la découverte de la fixation de l'azote atmosphérique par les microorganismes remonte à la fin du siècle dernier [WINOGRADSKI (286)], l'isolement du complexe enzymatique nitrogénase, responsable au niveau du nodule de la transformation de l'azote en ammoniac, est plus récent [BULLEN et LECOMTE (54)]. Depuis cette époque, une somme considérable de travaux scientifiques ont traité des aspects de la fixation biologique de l'azote atmosphérique par le couple bactérie-plante. Il s'agit d'un phénomène complexe dont l'étude intéresse un nombre important de spécialistes : des physiologistes des végétaux, des microbiologistes, des biochimistes, des virologistes, des généticiens sans oublier les hommes de terrain. Les enjeux sont énormes et vitaux pour chacun de nous. Les états qui en ont les moyens, gagneraient à attirer beaucoup plus de chercheurs vers ce genre d'investigation.

L'importance des nitrates dans la nutrition des plantes est connue depuis longtemps ; en effet, dès 1814, H. DAVY émet l'hypothèse que les nitrates sont formés aux dépens de l'ammonium présent dans le sol et de l'oxygène de l'atmosphère [LECHEVALIER et SOLOTOROWSKY (173)]. Entre 1838 et 1841, BOUSSINGAULT (42, 43, 44) confirme l'importance des nitrates dans la nutrition des plantes en montrant que celles qui sont cultivées en présence d'une solution de nitrates croissent mieux que celles cultivées en présence d'eau. Les travaux de SCHLOESING en 1868 (234) et 1873 (235) aboutissent à

la démonstration que la nitrification est due à des microorganismes. Ces travaux furent confirmés par WARINGTON (274). En 1889, WINOGRADSKI (285) isole des germes appartenant aux groupes de sulfobactéries et des ferrobactéries capables d'oxyder des substances inorganiques, l'hydrogène sulfuré et les sels ferreux, mais également le gaz carbonique et les sels d'ammonium, ceci sans lumière ni autre apport d'énergie. Ces germes transforment les sels d'ammonium en nitrites. Quelques années plus tard, il isole, à partir de sols de différentes provenances, des microorganismes capables d'oxyder les nitrites en nitrates. Ces germes, cependant, ne peuvent pas oxyder l'ammoniac en nitrates. Il isole ensuite une bactérie anaérobie, fixatrice d'azote, **Clostridium** à laquelle il donne en 1902 (287) le nom d'espèce de **pasteurianum** en hommage à Louis PASTEUR.

#### A. - Les microorganismes fixateurs d'azote

La fixation de l'azote atmosphérique est possible chez un certain nombre de bactéries et de Cyanophycées, à l'état libre ou en symbiose.

##### 1 - Les bactéries fixatrices libres

La découverte de ces germes remonte à 1901 lorsque M. BEIJERINCK (32) isole une bactérie aérobie hétérotrophe capable de fixer l'azote. Il crée alors le genre **Azotobacter** avec deux espèces, **A. chroococum** et **A. agilis**. Actuellement, on trouve 6 espèces d'**Azotobacter** et 3 d'**Azomonas** capables d'utiliser l'ammonium, les nitrates ou l'azote de l'air ou quelquefois le glutamate comme seule source d'azote [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Ninth Edition (35)]. Au cours des 50 dernières années, un nombre important de travaux ont révélé l'extrême diversité des bactéries libres fixatrices d'azote. On en rencontre, en effet, dans de nombreuses familles. Elles peuvent être hétérotrophes de types respiratoires variés ou autotrophes (chimio ou phototrophes). Parmi celles-ci, les hétérotrophes ont été les plus étudiées. Nous citerons **Azotobacter** (aérobie), **Clostridium** (anaérobie) avec en particulier **Cl. pasteurianum**, **Klebsiella**, **Bacillus**, **Mycobacterium** et une bactérie acidophile tropicale, **Beijerinckia**. Ces germes sont capables de synthétiser leurs propres protéines à partir de composés azotés dans des conditions d'oxygénation compatibles avec l'activité de la nitrogénase. Notons, cependant, que chez ces bactéries, la quantité d'azote fixé est faible



Caractéristiques	Genres	Espèce la plus importante	Capacité fixatrice d'azote (kg/ha/an)
<u>Bactéries hétérotrophes</u>			
. Aérobie	Azomonas Azotobacter  Rhizobium Beijerinckia Pseudomonas Azospirillum Methylobacter Methylococcus Bradyrhizobium <sup>(b)</sup>	A. agilis A. chroococcum A. vinelandii <sup>(a)</sup> R. meliloti <sup>(a)</sup> B. indica  A. lipoferum	fixent en présence d'O <sub>2</sub> mais avec une très faible efficacité 0,5 à 1
. Aérobie facultative	Klebsiella Enterobacter Escherichia Citrobacter Bacillus	K. pneumoniae E. aerogenes E. coli  B. polymyxa	ne fixent qu'en l'absence d'oxygène
. Anaérobie	Clostridium	C. pasteurianum	
<u>Bactéries autotrophes</u>			
. Chimiotrophes	Thiobacillus	T. ferrooxidans	
. Phototrophes	Rhodospseudomonas Rhodospirillum Rhodomicrobium Chlorobium Chromatium	R. palustris R. rubrum R. vanielii C. thiosulfatophilum C. vinosum	ne fixent qu'en milieu pauvre en oxygène
<u>Cyanobactéries</u>			
. Filamenteuses avec Hétérocystes	Anabaena Nostoc	A. cylindrica N. muscosum	10 à 50
. Filamenteuses sans Hétérocystes	Plectonema Trichodesmium	P. boryanum	ne fixent qu'en milieu pauvre en oxygène
<u>Fixations associatives</u>			
. Rhizosphère de <i>Paspalum notatum</i>	Azotobacter	A. paspali	5 à 10
. <i>Digitaria decumbens</i>	Azospirillum	A. lipoferum A. brasilense	jusqu'à 30
. <i>Oriza sativa</i>	Azotobacter Beijerinckia Pseudomonas Arthrobacter	P. fluorescens	20 à 50

Tableau 1 - Organismes fixateurs libres et fixations associatives d'azote [d'après les travaux de STEWART (256), BLONDEAU (38) et PELCZAR et al. (223)]

(a) Quelques souches (*R. meliloti* en particulier) produisent à l'état libre de l'azote à partir de nitrates en conditions anaérobies [DANIEL et al. (81)].

(b) Une activité nitrogénasique chez les cellules libres a été décelée mais uniquement dans des conditions de culture à très faible taux d'oxygène [KURTZ et LaRUE (168), McCOMBE et al. (75), PAGAN et al. (210)].

(tableau 1). Parmi les formes fixatrices libres, les Cyanophycées possédant des hétérocystes sont certainement celles qui fixent le plus d'azote. Possédant un métabolisme photosynthétique, elles ont un très grand avantage par rapport aux non photosynthétiques (ATP et produits carbonés apportés par la photosynthèse). De ce fait, elles jouent un rôle important dans la colonisation des zones qui sont favorables à la croissance de nombreux autres organismes fixateurs d'azote. Ainsi, ces bactéries à l'état libre ou quelquefois en association avec des champignons (lichens) peuvent fixer entre 25 et 100 kg d'azote par hectare et par an dans les eaux stagnantes ou les sols inondés. Il existe également des fixations associatives rhizosphériques chez de nombreuses espèces de graminées alimentaires. Les plus connues sont celles de *Oryza sativa* - *Azotobacter* et de *Zea mays* - *Enterobacter* - *Klebsiella* - *Pseudomonas*. Une association efficace fort importante dans nos régions s'établit entre la betterave à sucre *Saccharum officinarum* et des genres tels *Enterobacter* - *Klebsiella* et *Pseudomonas*. Le tableau 1 décrit les différents organismes et systèmes fixateurs libres ainsi que les quantités d'azote fixées d'après les travaux de STEWART (256), BLONDEAU (38) et PELCZAR *et al.* (214).

Bien que non négligeable, la fixation de l'azote atmosphérique par les microorganismes libres est peu importante. La contribution majeure provient des systèmes symbiotiques. Parmi ceux-ci, l'association *Rhizobium*-Légumineuse tient la première place. Viennent ensuite les associations symbiotiques entre les Cyanophycées et les Actinomycètes avec les plantes non Légumineuses.

## 2 - Les bactéries fixatrices symbiotiques

### a) Le genre *Rhizobium*

C'est à BEIJERINCK (30) que nous devons l'isolement à partir d'un nodule du premier germe capable de fixer l'azote en symbiose, *Rhizobium leguminosarum*. Depuis les travaux de BALDWIN (19), nous savons que toutes les espèces de *Rhizobium* ne fixent pas l'azote en association avec n'importe quelle Légumineuse. Il existe, en effet, une spécificité assez étroite. De plus, les travaux de VINCENT (267) ont montré que la vitesse de croissance n'était pas identique pour toutes les espèces de *Rhizobium*.

Sept groupes d'inoculations croisées ont ainsi été définis, quatre incluant les espèces à croissance rapide et trois celles à croissance lente (tableau 2).

Groupes d'inoculation	Espèce de <i>Rhizobium</i>	Croissance
<b>Pisum</b> (Pois), <b>Vicia</b> (Vesce), <b>Lens</b> (Lentille)	<b>R. leguminosarum</b>	rapide
<b>Melilotus</b> (Melilot) <b>Medicago</b> (Luzerne) <b>Trigonella</b> (Trigonelle)	<b>R. meliloti</b>	rapide
<b>Trifolium</b> (Trèfle)	<b>R. trifolii</b>	rapide
<b>Phaseolus</b> ( <b>P. vulgaris</b> ) (Haricot)	<b>R. phaseoli</b>	rapide
<b>Glycine</b> (Soja)	<b>R. japonicum</b>	lente
<b>Lupinus</b> (Lupin) <b>Ornithopus</b> (Pied d'Oiseau)	<b>R. lupini</b>	lente
"Cowpea group" <b>Vigna</b> . Légumineuses tropicales	<b>R. "du Cowpea group"</b>	lente

Tableau 2 - Groupes d'inoculation du genre *Rhizobium* d'après VINCENT (267).

Certaines espèces de *Rhizobium* ont cependant une spécificité d'hôte plus ou moins large. C'est le cas de *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *R. phaseoli* qui sont capables de noduler de nombreuses plantes hôtes communes. En 1970, VINCENT et HUMPHREY (271) ont montré que ces trois souches très proches sérologiquement étaient cependant bien distinctes de *R. meliloti*. Cette classification fut pendant quelque temps remise en question sans cependant que l'on puisse y apporter de modifications majeures. Cependant, en 1982, VINCENT (270) propose de regrouper en une seule espèce *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *R. phaseoli*, de garder le statut d'espèce à *R. meliloti* et de rassembler les espèces de *Rhizobium* à croissance lente dans le genre *Bradyrhizobium*. Une nouvelle espèce, *R. loti*, est créée par JARVIS *et al.* (141). Cette classification prévaut à l'heure actuelle et apparaît dans "The ninth edition of BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology" (35) (tableau 3).

Bactéries	Plantes hôtes
<u>Rhizobium à croissance rapide</u>	
R. meliloti - DANGEARD (80)	Medicago, Melilotus et Trigonella
R. leguminosarum - FRANK (109)	
Biovar - trifolii	Trifolium spp.
Biovar - phaseoli	Phaseolus vulgaris, P. multifloris
Biovar - viciae	Pisum, Lathyrus, Lens, Vicia
R. loti - JARVIS, PANKHURST et PATEL (141)	Lupinus, Lotus, Anthyllis, Ornithopus, Cicer, Caragana, Leucaena, Mimosa. (Certaines plantes sont également nodulées par Bradyrhizobium)
<u>Rhizobium à croissance lente</u>	
Bradyrhizobium - JORDAN (143)	
Bradyrhizobium japonicum [Rhizobium japonicum - KIRCHNER (154)]	Glycine max, Macroptilium atropurpureum
Bradyrhizobium spp.	
Bradyrhizobium sp. (Vigna)	Vigna, Arachis et de nombreuses autres genres et espèces
Bradyrhizobium sp. (Lupinus)	Lotus pedunculatus, Lupinus sp.

Tableau 3 - Classification actuelle du genre **Rhizobium**.

#### b) Les Cyanophycées

Elles peuvent fixer l'azote en symbiose avec des plantes de natures très diverses allant des Bryophytes aux Angiospermes ou même avec certains Champignons. L'association **Azolla** (Ptéridophyte)-**Anabaena** a une capacité fixatrice voisine de celle de certaines symbioses **Rhizobium**-Légumineuse. **Anaeba** et **Nostoc** peuvent également fixer l'azote en association avec des Gymnospermes de la famille des Cycales mais dans des proportions plus modestes. Enfin, **Nostoc** est capable d'entrer en symbiose avec une Angiosperme, **Gunnera**, avec des rendements assez élevés.

#### c) Les Actinomycètes

Un certain nombre d'Angiospermes non Légumineuses, essentiellement des arbres ou arbrisseaux dicotylédones, possèdent des nodosités fixatrices d'azote sur leur système racinaire. L'endophyte colonisant ces nodosités n'est pas un

**Rhizobium** mais un Actinomycète. Les macrosymbiontes sont répartis en 13 genres comportant 342 espèces au total [BLONDEAU (38)]. Nous citerons, pour exemple, une espèce très répandue en France, l'aune (**Alnus**). Sur 36 espèces connues, 32 sont pourvues de nodules efficaces. Cette fixation est si importante qu'elle est à la base de l'équilibre azoté de nombreux écosystèmes forestiers et est la seule source d'azote pour des terrains tels que les moraines glaciaires [CAMPBELL (64)]. Le mode d'infection de ces plantes semble similaire à celui décrit chez **Rhizobium** ; cependant, des doutes subsistent car l'inoculation des racines au moyen de cultures bactériennes est très difficile. Pourtant, CALLAHAM **et al.** (62) ont réussi à infecter une non Légumineuse de la famille des Myricacées, **Comptonia peregrina** avec son endophyte extrait de nodules et cultivé **in vitro**. De nombreux critères prouvent la nature procaryote de cet endophyte et son analogie de structure avec un Actinomycète. BECKING (28) a proposé de rassembler les endophytes capables de noduler ces Angiospermes non Légumineuses au sein de la famille des Frankiacées comprenant dix espèces avec **Frankia alni** comme espèce type (espèce d'Actinomycète se divisant dans plus d'un plan).

#### d) Autre manifestation de la symbiose

Chez **Psychotria bacteriophila** (Famille des Rubiacées), on observe des nodules foliaires desquels a été isolée **Klebsiella rubracera**, bactérie connue pour fixer l'azote à l'état libre [SILVER **et al.** (243), CENTIFANTO et SILVER (69)]. Cependant, la nodulation de la plante par son endophyte n'est pas toujours réalisable. La bactérie fixatrice ne se rencontre pas seulement au niveau des nodules mais on en détecte très souvent dans les tissus des feuilles des tiges et des graines. Il semble que ce type de fixation soit assez particulier. Une bactérie synthétiserait des phytohormones induisant la formation d'un pré-nodule. Celui-ci serait ensuite colonisé par le symbionte qui établirait alors la fixation [BLONDEAU (38)].

### B. - Le macrosymbionte

De tous les systèmes fixateurs d'azote précédemment décrits, celui qui prédomine est l'association symbiotique **Rhizobium**-Légumineuse. Elle est capable de fixer entre 200 et 500 kg d'azote par hectare et par an, ce qui représente à l'échelle mondiale  $80 \times 10^6$  t d'azote fixé annuellement

(à titre de comparaison, notons que la production d'engrais azotés est pour la même période de l'ordre de  $55 \times 10^6$  t).

La famille des Légumineuses comprend quelques 20 000 espèces pour 700 genres. Seulement 15 p100 de ces espèces ont été étudiées. Il reste donc environ 17 000 associations plante-**Rhizobium** à découvrir, décrire et comprendre. La plupart des Légumineuses examinées sont agronomiquement importantes et correspondent aux plantes fourragères et à graines. Les investigations portant sur les Légumineuses tropicales sauvages ne font que commencer. Il s'avère qu'elles ont un rôle très important dans les écosystèmes de ces régions. La famille des Légumineuses fait partie de l'ordre des Rosales. Elle est divisée en trois sous-familles : les Mimosacées, les Césalpinées et les Papilionacées.

**1 - Les Mimosacées (2 900 espèces)** sont surtout représentées par des arbres et des arbustes. La plupart sont tropicaux. Citons l'Acacia, le Mimosa et le Leucaema.

**2 - Les Césalpinées (1 800 espèces)** sont essentiellement des arbres et arbustes ornementaux des régions chaudes exploités pour leurs bois précieux.

**3 - Les Papilionacées** représentent avec 14 000 espèces et 500 genres la sous-famille la plus importante. Elle est représentée par des plantes herbacées plus rarement des arbres et des arbustes. Elles sont cultivées pour leurs nombreuses utilisations : alimentation humaine et animale, amélioration des sols, bois, essences, gommés, alcaloïdes, etc... Un nombre élevé d'espèces sauvages jouent un rôle considérable dans les écosystèmes des zones tempérées et intertropicales. Le tableau 4 présente les principaux genres et leurs utilisations.

### C. - Le sol et la rhizosphère

Le sol a été défini comme "la région de l'écorce terrestre où la Géologie et la Biologie se rencontrent". D'un point de vue plus fonctionnel, le sol peut être considéré comme la zone de la terre qui fournit le substrat aux vies animale et végétale.

Genre	Nom d'une espèce connue	Utilisations
<i>Sophora</i>		Donne la rutine et la cyti- sine Baume de Tolu et baume du Pérou
<i>Myroxyton</i>		
<i>Lupinus</i>	Lupin	
<i>Genista</i>	Gânet	
<i>Ulex</i>	Ajoncs	
<i>Physostigma</i>	Fève de calabar	On en extrait l'ésérine et la génésérine Fibres, spartéine
<i>Spartium</i>		
<i>Cytisus</i>		
<i>Ononis</i>		
<i>Trigonella</i>	Fenu-grec	
<i>Medicago</i>	Luzernes	Fourrage et extractions de la daporine Fourrage, chlorophylles et protéines alimentaires Fourrage, engrais vert Fourrage Fourrage Indigo Plante d'ornement Gomme Fourrage  Roténone des racines   Graines alimentaires   Matières grasses, tourteaux
<i>Melilotus</i>	Métilot	
<i>Trifolium</i>	Trèfles	
<i>Lotus</i>	Lotier	
<i>Indigofera</i>	<i>Indigofera Tinctoria</i>	
<i>Wisteria</i>	Glycine	
<i>Astragalus</i>	Astragale	
<i>Onobrychis</i>	Sainfoin et Sulla	
<i>Dalbergia</i>	Ebène du Sénégal	
<i>Derris</i>		
<i>Arachis</i>	Arachide	
<i>Pisum</i>	Pois	
<i>Phaseolus</i>	Haricot	
<i>Lens</i>	Lentille	
<i>Vigna</i>	Niébé	
<i>Glycine</i>	Soja	

Tableau 4 - Principaux genres de Légumineuses (Papilionacées) et leurs utilisations.

D'après le : "Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote" (105). Avec l'autorisation de reproduction de l'organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (F.A.O.).

Les caractéristiques des sols varient selon les régions et les conditions climatiques. Ils sont classés en sols minéraux et organiques. Le taux d'humidité dépend du volume des précipitations, du drainage et de la composition du sol. L'eau est retenue en tant qu'eau libre dans les espaces entre les particules solides ou adsorbée à leur surface. De très nombreux composés organiques et minéraux sont dissous dans cette eau et sont ainsi accessibles au peuplement animal, végétal ou microbien.

Les gaz du sol se trouvent dans les espaces laissés libres par l'eau ou en solution dans celle-ci ; c'est le cas, en particulier, du gaz carbonique et de l'ammoniac. La teneur en gaz du sol est donc en relation directe avec son degré d'humidité. Notons enfin que les sols peuvent différer par la valeur de leur pH et par l'influence des pratiques culturales successives (enfouissage d'engrais verts, de fumures animales, d'engrais azotés, etc...).

Les sols fertiles sont colonisés par de nombreuses formes animales (rongeurs, insectes, protozoaires, vers, etc...) et un nombre considérable de microorganismes (tableau 5). Le nombre et la nature des microorganismes sont sujets à de rapides et nombreuses variations. Les conditions climatiques peuvent favoriser sélectivement certains types de microorganismes. Les interactions entre les différentes espèces microbiennes ont sans aucun doute un effet important sur la population présente. Les protozoaires prédateurs ainsi que les Actinomycètes producteurs d'antibiotiques éliminent un certain nombre d'espèces [DANSO *et al.* (82)]. D'un autre côté, les organismes protéolytiques et cellulolytiques apportent les éléments nécessaires aux germes les plus exigeants. La population bactérienne à elle seule dépasse la population de tous les autres groupes de microorganismes réunis.

Des virus animaux, végétaux et bactériens sont également présents dans les sols. Organites fragiles, nécessitant des cellules vivantes pour se reproduire, ils sont plus sensibles que les autres microorganismes aux conditions auxquelles certains sols sont soumis. Ils parviennent dans le sol par l'intermédiaire des déchets animaux et végétaux infectés et par l'eau de ruissellement. Les virus bactériens se maintiennent en général plus facilement dans le sol car ils y rencontrent des bactéries à partir desquelles ils peuvent se reproduire.



Microorganismes	Nombre par gramme de poids sec	Biomasse en g/m <sup>3</sup>
. Bactéries		
comptage direct	25 x 10 <sup>8(*)</sup>	
comptage sur boîte	15 x 10 <sup>6(*)</sup>	160
. Actinomycètes <sup>(+)</sup>	7 x 10 <sup>5</sup>	160
. Champignons	4 x 10 <sup>5</sup>	200
. Cyanophycées <sup>(+)</sup> et Algues unicellulaires	5 x 10 <sup>4</sup>	32
. Protozoaires	3 x 10 <sup>4</sup>	N.A.
. Virus animaux, végétaux et microbiens	non numérés	N.A.

Tableau 5 - Nombre de microorganismes et biomasse présents dans un sol fertile dans la zone comprise entre la surface et 15 cm de profondeur, d'après CAMPBELL (64).

(\*) La différence entre les deux chiffres s'explique par le fait qu'il n'est pas possible de mettre en évidence, avec les milieux courants employés, tous les germes vivants dans le sol.

(+) Bien que considérés comme des bactéries, les Actinomycètes et les Cyanophycées ont été comptés à part.

N.A. non appréciée.

La rhizosphère est la zone où le sol et les racines sont en contact. On admet qu'elle correspond à un espace de 20 mm d'épaisseur environ autour de la racine [ROVIRA (228)]. Sa forme varie cependant avec de nombreux facteurs tels que l'espèce et l'âge de la plante, la nature du sol, les conditions d'éclairement, de température et d'humidité [ROVIRA (230)]. Dans cette région, les exsudats racinaires permettent la prolifération rapide des microorganismes. On a pu montrer la sécrétion de vitamines [ROVIRA et HARRIS (231), ROVIRA (229)], d'hydrates de carbone [GRAHAM (118)], d'acides organiques [VINCENT (268)], etc... Il s'en suit une certaine sélection au niveau de la rhizosphère ; l'espèce préservée et stimulée étant alors apte à infecter efficacement la plante. Le chimiotactisme bactérien est en partie responsable de ce phénomène [BURG et al. (56)]. L'espèce *Rhizobium*, par

exemple, montre des affinités différentes selon les exsudats. Alors que certaines racines attirent de nombreux **Rhizobia** d'autres, par contre, en sont incapables [CURRIER et STROBEL (78)]. Certaines sécrétions racinaires peuvent même écarter les **Rhizobia** [McGREGOR et ALEXANDER (119), CURRIER et STROBEL (78)].

#### D. - L'établissement de la symbiose Rhizobium-Légumineuse

La symbiose aboutit à la formation de nodosités racinaires efficaces, c'est-à-dire fixant l'azote atmosphérique. Les nodules sont génétiquement aptes à effectuer tout le processus de fixation. La plante hôte leur apporte l'énergie et le pouvoir réducteur tout en y maintenant une tension en oxygène faible, compatible avec le fonctionnement de la nitrogénase.

La symbiose va se réaliser en 4 étapes : 1 - fixation de la bactérie sur le poil racinaire ; 2 - induction de sa courbure ; 3 - invasion de la racine de la plante par les **Rhizobia** par l'intermédiaire du cordon d'infection ; 4 - morphogénèse du nodule, multiplication des **Rhizobia** suivie de leur transformation en bactéroïdes, apparition de la nitrogénase, de la légghémoglobine et établissement de la fixation de l'azote atmosphérique (figure 1).

##### 1 - Fixation de la bactérie sur le poil racinaire

La plante hôte stimule le **Rhizobium** spécifique grâce à des sécrétions racinaires. Ce stade semble être le reflet de la spécificité d'hôte. Il est maintenant démontré, depuis les travaux de HAMBLIN et KENT (124), BOHLOOL et SCHMIDT (39), DAZZO et HUBBELL (88) et DAZZO et TRUCHET (89), que la plante produit une protéine spécifique à laquelle a été donné le nom de "lectine". Il s'agit d'une glycoprotéine, la trifoliine A chez **Trifolium** [DAZZO et al. (90)]. Celle-ci se fixe sur les antigènes de surface des deux symbiontes établissant ainsi une union solide [DAZZO et HUBBELL (88), DAZZO et BRILL (86)]. Cette lectine n'est capable de se lier qu'au **Rhizobium** approprié [KATO et al. (148), KIJNE et al. (153), PAAU et al. (209)]. Ainsi, seule la bactérie symbiotique peut infecter la plante hôte, les sites de fixation étant spécifiques [DAZZO et TRUCHET (89)]. La liaison est

*Cordon d'infection*, les cellules, dans cette zone, se multiplient activement et sont contaminées par les rhizobiums, mais la fixation ne se produit pas encore.

*Méristème*, constitué de petites cellules non contaminées par *Rhizobium japonicum* et qui assurent la croissance du nodule.

*Zone de fixation*, où les cellules de soja sont pénétrées par les rhizobiums qui prennent une forme renflée ou ramifiée et sont alors appelés bactéroïdes. Sous cette forme, les rhizobiums contiennent une enzyme, la nitrogénase, qui permet la fixation d'azote. Cette enzyme contient du fer et du molybdène, métaux indispensables au transport des électrons servant à la réaction de réduction. Les cellules où se produit la fixation sont colorées en rouge par la leghémoglobine, pigment qui transporte l'oxygène jusqu'au bactéroïde.

*Zone de dégénérescence*, de couleur verte ou brune. La plupart des cellules dégèrent et la fixation s'arrête.

*Vaisseaux libéraux ligneux* dérivés du cylindre central. Ils irriguent le nodule apportant les hydrates de carbone (glucides) nécessaires à la réaction de fixation et transportent vers les feuilles les composés azotés ainsi élaborés.

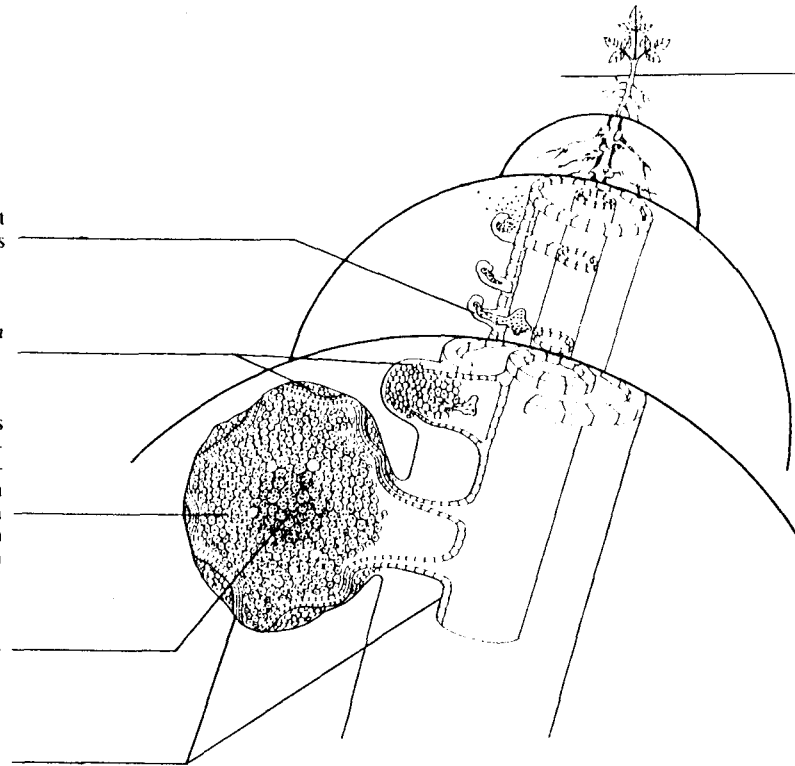


Figure 1 - Processus d'infection et développement d'un nodule sur une racine de soja (**Glycine max**), d'après le fascicule : "Les Inoculums de Légumineuses et leurs applications" (174).

Avec l'autorisation de reproduction de l'Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (F.A.O.).

ensuite maintenue de façon ferme et irréversible [DAZZO (85), DAZZO et KRABAK (87)] et la courbure du poil absorbant va pouvoir se réaliser.

## 2 - La courbure du poil absorbant

Elle précède l'infection proprement dite. Ce phénomène peut être très spécifique [HAACK (123), YAO et VINCENT (293)]. Cependant, la courbure du poil a aussi été observée chez *Trifolium glomeratum* inoculé avec les bactéries isolées de nodules de *M. sativa* et vice et versa [YAO et VINCENT (293)]. La même chose a été signalée chez *Pisum sativum* inoculé avec *R. meliloti* et *R. trifolii* [LI et HUBBELL (177)]. L'ampleur de la courbure, qui peut varier de quelques degrés à plus de 360°, dépend de la variété de la plante, de l'espèce du *Rhizobium* et de l'endroit de l'infection [YAO et VINCENT (293, 294)]. Le nombre de poils racinaires déformés est cependant invariablement plus grand lorsque c'est le *Rhizobium* spécifique qui infecte la plante [YAO et VINCENT (293)]. Pour YAO et VINCENT (294), deux substances seraient probablement impliquées dans la déformation du poil absorbant. La première, partiellement dialysable, thermostable et probablement de nature protéique, a été retrouvée dans les filtrats de culture. La seconde, non dialysable, demande la présence de la bactérie infectante pour exprimer son activité. Ce phénomène n'est cependant pas obligatoire car des auteurs ont décrit l'infection de poils racinaires pourtant restés rectilignes [CHANDLER (71), VINCENT (269)].

Des études ultrastructurales ont montré qu'un élément externe et flexible du poil racinaire continue sa croissance tandis qu'un autre rigide situé dans la paroi cellulaire interne voit son développement inhibé au point de fixation de la bactérie. Celle-ci se trouve alors enveloppée puis enfermée à l'intérieur d'une poche grâce au repli de la paroi cellulaire, où lui est fourni un microenvironnement favorable à la pénétration [CALLAHAM et TORREY (63), SHANTHARAM et WONG (238), TURGEON et BAUER (263)].

## 3 - L'invasion de la racine par le cordon infectieux

Précédant immédiatement l'invasion du poil absorbant, des changements enzymatiques interviendraient au niveau de la bactérie. Ils se traduiraient par la synthèse de différentes enzymes [NAPOLI et HUBBELL (203), REPORTER

**et al.** (221)]. Celle-ci, grâce à leur action sur la paroi cellulaire du macrosymbionte, favoriserait la pénétration du **Rhizobium** [LAMPART (171)]. Les lectines seraient capables d'initier certains de ces changements enzymatiques [ALBERSHEIM et WOLPERT (10)]. Des analyses sérologiques de **Rhizobia** isolés à partir d'une grande variété de nodules suggèrent qu'un nodule dans la nature contient une souche donnée [DART (83)]. La régulation de la prolifération du cordon infectieux semble être sous la dépendance de la Légumineuse [BAUER (26)].

#### 4 - Morphogenèse du nodule

Les nodosités fixatrices sont des structures organisées qui tirent leur origine du cortex racinaire et ne sont pas l'homologue des racines secondaires [LIBBENGA et BOGERS (178)]. Elles sont constituées d'un tissu périphérique en relation avec le système vasculaire du cylindre central racinaire et d'un tissu central dans lequel les bactéries se transforment en bactéroïdes fixateurs d'azote [GOODCHILD (117)]. A leur niveau, les échanges gazeux entre la plante et la bactérie vont pouvoir s'effectuer dans les meilleures conditions [PATE (212)]. Les bactéroïdes montrent un accroissement important de leur activité nitrogénasique [SUTTON **et al.** (258), VANCE (265)] et la léghémoglobine apparaît dans les zones fixatrices d'azote.

#### E. - L'activité nitrogénasique

Avant 1960, date de l'isolement de systèmes acellulaires fixateurs d'azote, les études sur la fixation de l'azote furent menées sur des cellules entières [WILSON (284)]. Elles révélèrent a) que la croissance en présence d' $N_2$  nécessitait du molybdène, du fer et du calcium ; b) que la fixation de l'azote se traduisait par une production d'ammoniac [ZELITCH **et al.** (297), NEWTON **et al.** (204) ; c) que l'hydrogène, le monoxyde de carbone et le monoxyde d'azote étaient inhibiteurs de la fixation [BURRIS (60)]. En 1960, CARNAHAN **et al.** (65) montrent que des extraits acellulaires de **Clostridium pasteurianum** fixent l'azote. De tels systèmes fonctionnent en présence de pyruvate de sodium. L'oxydation du pyruvate conduit à la réduction de la ferredoxine (Fd), source d'électrons pour la réduction de l'azote [MORTENSON (200)] et à la synthèse d'ATP par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA [MORTENSON (199)].

L'ion ammonium ainsi formé 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 [REYNOLDS **et al.** (222)].

En 1966, HARDY et KNIGHT (126) montrent que l'ion  $Mg^{2+}$  est nécessaire et que l'ATP est transformé en ADP + Pi.

Quelques années plus tard, il est définitivement montré par KENNEDY **et al.** (150) que l'ATP joue le rôle de catalyseur et que l'ion  $Mg^{2+}$  ou d'autres métaux bivalents [BURNS (59)] sont absolument indispensables.

La nitrogénase présente dans un extrait brut de *C. pasteurianum* est soluble et sensible à l'oxygène [ZELITCH **et al.** (297)] tandis que celle d'*Azotobacter* sédimente et est stable à l'air [BULEN **et al.** (52), HARDY et KNIGHT (126)]. Cependant, lorsque les deux extraits sont purifiés, dans les deux cas la nitrogénase est sensible à l'oxygène. La nitrogénase présente une structure semblable quel que soit l'organisme à partir duquel elle est isolée. Elle est formée de deux composants, l'un contenant du fer appelé azoferredoxine (Az-Fd), l'autre contenant à la fois du fer et du molybdène appelé molybdoferredoxine (Mo-Fd). D'un poids moléculaire de l'ordre de 60 000, l'Az-Fd est constitué de deux sous-unités de 30 000 chacune. Quant au Mo-Fd, d'un poids moléculaire de 220 000 environ, il est formé de quatre sous-unités de 55 000. Outre l'azote atmosphérique, la nitrogénase est capable de réduire un certain nombre de substrats tels que l'acide cyanidrique (HCN), l'isocyanure de méthyl ( $CH_3CN$ ) et l'acétylène ( $C_2H_2$ ). Ce dernier composé est utilisé pour mettre en évidence l'activité nitrogénasique en chromatographie en phase gazeuse par dosage de l'éthylène ( $C_2H_4$ ) formé. En l'absence ou en présence d'un taux limitant d'azote, la nitrogénase est capable de réduire les ions  $H^+$  en hydrogène [BULEN **et al.** (53)]. Ce phénomène a lieu aussi bien chez les bactéries fixatrices libres que chez le *Rhizobium* en symbiose.

## 1 - La diffusion gazeuse dans le nodule et le fonctionnement de la légghémoglobine

Les nodules sont des organes compacts possédant un cortex épais et résistant protégeant les tissus internes de la dessiccation et de la perte de gaz par diffusion. La présence d'un réseau d'espaces intercellulaires facilite les échanges gazeux [BERGERSEN et GOODCHILD (34)].

En 1939, KUBO (167) montre que le pigment rouge présent dans les nodules racinaires est similaire à l'hémoglobine. Ces travaux furent confirmés, en 1945, par VIRTANEN (272) qui détermina que la présence de cette protéine reflétait l'activité nitrogénasique. Associé avec LAINE, il donna le nom de légghémoglobine à cette hémoprotéine (273). Cette molécule n'a jamais été détectée ailleurs que dans les nodules de Légumineuses. La partie protéique de la légghémoglobine est codée et synthétisée par la plante, en revanche l'hème du pigment semble être synthétisé par le **Rhizobium** [CUTTING et SCHULMAN (79), GODFREY et al. (115)].

De nombreuses expériences effectuées principalement sur les nodules de Soja [BERGERSEN (33)] ont indiqué qu'à une pression de 0,2 atmosphère, l'oxygène est limitant pour la fixation de l'azote. L'immersion dans l'eau qui réduit la diffusion de l'oxygène entraîne une rapide inhibition de l'activité nitrogénasique dans le nodule [SPRENT (246)]. De même, un excès d'oxygène (0,5 atm) inhibe la fixation par inactivation de la nitrogénase [BURRIS et al. (61), WONG et al. (290)]. Le maintien d'une pression partielle basse en oxygène libre dans les tissus des nodules et le maintien dans le même temps d'un flux important d'oxygène vers le bactéroïde sont effectués par la légghémoglobine [APPLEBY (11), APPLEBY et al. (12)].

Tandis que l'importante fonction de la légghémoglobine semble être évidente dans les nodules des Légumineuses, ce pigment n'est cependant pas nécessaire pour une fixation effective de l'azote au cours de toutes les associations. Par exemple, les nodules formés lors de la symbiose de l'Actinomycète du genre **Frankia** avec des non Légumineuses sont dépourvus de légghémoglobine [BECKING (29)] ainsi que celles d'espèces subtropicales telle **Parasponia andersonii** qui forme des nodules efficaces avec le genre **Rhizobium** [TRINICK

(262)]. La présence d'autres types de système tampon pour l'oxygène n'a pas été rapportée chez ces espèces.

## F. - Le cycle de l'azote (figure 2)

### 1 - La protéolyse

On peut considérer que les produits finaux du cycle de l'azote sont les protéines et les acides nucléiques. Ces molécules ne sont pas accessibles aux plantes en tant qu'éléments nutritifs. Ainsi, le premier processus qui entrera en jeu sera leur dégradation par des microorganismes capables d'élaborer des protéases extracellulaires. La protéine sera alors transformée en peptides puis en acides aminés grâce à l'action des peptidases. Un certain nombre d'espèces bactériennes sont impliquées dans ces processus. Citons **Clostridium histolyticum**, **Clostridium sporogenes** et à un degré moindre, les genres **Proteus**, **Pseudomonas** et **Bacillus**. De nombreux Champignons et Actinomycètes telluriques sont également très protéolytiques. L'activité peptidasique est aussi très répandue chez les microorganismes, témoin l'utilisation des peptones (hydrolysats partiels de protéines) en tant que source d'azote dans les milieux de culture.

### 2 - L'ammonification

Les acides aminés produits au cours de l'étape précédente sont désaminés avec libération d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Le sort de ce gaz dépend des conditions au niveau du sol. Ce gaz volatil n'est retenu dans le sol pour donner de l'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) que s'il se solubilise dans l'eau. Dans ce cas, l'ion  $\text{NH}_4^+$  se forme.

### 3 - La nitrification

La transformation de l'ammoniac en nitrate par les microorganismes se déroule en deux étapes, chacune d'entre elles effectuée par des genres bactériens différents. Le passage de l'ammoniac en nitrate se fait via les nitrites selon les réactions suivantes :



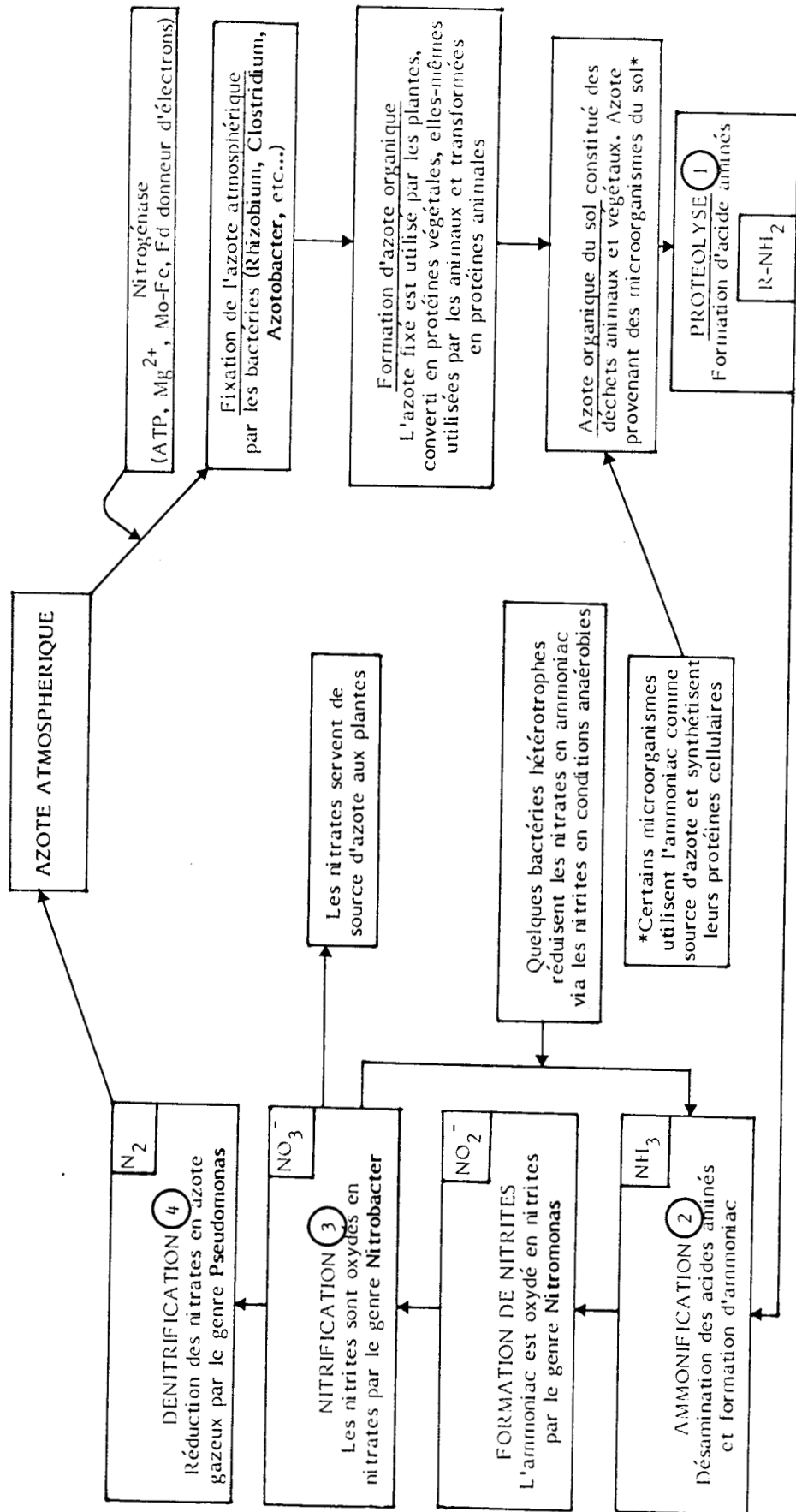
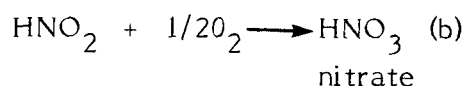
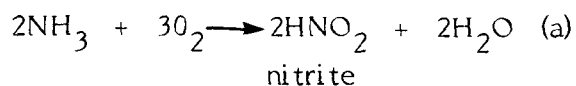


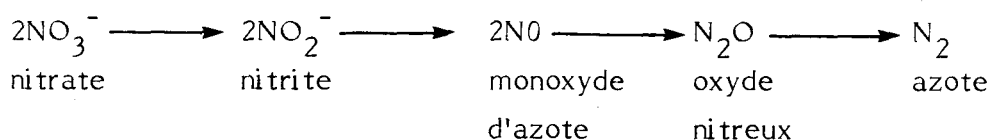
Figure 2 - Le cycle de l'azote



La réaction (a) est réalisée grâce aux bactéries du genre **Nitrosomonas**, la (b) grâce aux bactéries du genre **Nitrobacter**. Ce sont toutes les deux des bactéries chimiolithotrophes. Les germes nitrifiants se rencontrent principalement dans les sols et les eaux.

#### 4 - La dénitrification

La transformation des nitrates en azote gazeux se déroule en une série de réactions :



De nombreux genres bactériens sont impliqués dans ce processus ; nous citerons **Achromobacter**, **Agrobacterium**, **Alcaligenes**, **Bacillus**, **Chromobacterium**, **Flavobacterium**, **Hyphomicrobium**, **Pseudomonas**, **Thiobacillus**, **Vibrio** et **Rhizobium**.

Dans le sol, la dénitrification est d'autant plus importante que le taux de matières organiques est élevé ; maximum lorsque la température atteint 60°C et facilité par un pH neutre ou alcalin. La dénitrification ne se déroule normalement que lorsque l'oxygène disponible est en quantité faible.

#### G. - Support génétique de la fixation de l'azote atmosphérique

Les méthodes récentes d'investigation en génétique bactérienne ont engendré de grands progrès dans la connaissance des phénomènes de la fixation de l'azote. **Rhizobium meliloti**, bactérie à croissance rapide, symbiotique pour

**Medicago sativa**, fut la première à être étudiée, les résultats obtenus furent ensuite étendus aux autres genres de la famille des Rhizobiacées.

Nous ne ferons pas ici une étude extensive des travaux de génétique de la symbiose chez les Rhizobiacées, qui font l'objet d'un nombre considérable de publications, mais nous donnerons quelques éclairages qui nous semblent importants.

En effet, les études de génétique moléculaire chez ces microorganismes se sont heurtées à se heurtent encore à toute une série de difficultés contournées partiellement maintenant grâce aux techniques récentes des manipulations génétiques.

La difficulté principale vient du fait que les propriétés génétiques de ces microorganismes concernant la symbiose ne sont pas accessibles lorsqu'ils se trouvent libres à l'état de vie végétative, mais seulement lorsqu'ils se trouvent en symbiose avec la plante. En effet, les **Rhizobia** sous forme végétative ne donnent pas expérimentalement de bactéroïdes. Donc les mutations et autres modifications intéressant la symbiose ne peuvent être repérées que par des expérimentations lourdes puisqu'elles font intervenir pour être identifiées l'inoculation de chaque clone bactérien à une plantule. De plus, la symbiose étant la résultante de l'association de deux organismes, l'analyse génétique du partenaire, ici d'une Légumineuse, multiplie les difficultés.

Les différentes structures de l'ADN chez le **Rhizobium** sont complexes. En effet, chez **R. meliloti** les trois propriétés essentielles amenant à la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, c'est-à-dire la spécificité d'hôte (**hsn**) et l'infectivité (**nod**), l'efficacité (**fix**) dont les gènes **nif** codent pour les trois sous-unités de la nitrogénase, ont un support plasmidique [ROSENBERG **et al.** (226), LONG **et al.** (180), WONG **et al.** (189)]. La plupart des **R. meliloti** étudiés jusqu'ici sont porteurs de plasmides indigènes dont le nombre et la taille varient selon les souches [BECHET et GUILLAUME (27), CASSE **et al.** (68)]. Chez les souches sauvages de **R. meliloti** capables de fixer l'azote atmosphérique, ROSENBERG **et al.** (226) décrivent deux sortes de plasmides : les plasmides moyens ou pRme (pRme : plasmide de **R. meliloti**), d'une masse moléculaire comprise entre 90 et 300 Mdal. Leur nombre varie avec la

souche ; ils peuvent même être absents. Un plasmide plus petit a cependant été décrit chez **R. meliloti** Rm4 par PALOMARES **et al.** (211). Ces plasmides moyens ne portent pas les gènes structuraux nifD et nifH de la nitrogénase.

Ils voisinent avec les mégaplasmides ou pSym (plasmide contrôlant les propriétés symbiotiques), d'une masse moléculaire supérieure à 450 Mdal [JULIOT **et al.** (145)]. Les transferts génétiques par les méthodes classiques se sont révélés décevants.

### 1 - La conjugaison

La conjugaison a été le moyen le plus utilisé. Les gènes contrôlant la symbiose sont répartis, pour quelques uns, sur le chromosome [FORRAI **et al.** (107)], tandis que les autres sont portés par le mégaplasmide [BANFALVI **et al.** (22), ROSENBERG **et al.** (226)]. De par sa taille, le mégaplasmide est difficilement transférable et s'il est transmis, il l'est à basse fréquence [KONDOROSI **et al.** (160)].

Chez **Rhizobium**, les premières cartes génétiques furent obtenues grâce à la mobilisation du chromosome par les plasmides R (porteurs des caractères de résistance à certains antibiotiques) mis en évidence chez **Pseudomonas aeruginosa** [BERINGER (36), MEADE et SIGNER (197), KONDOROSI **et al.** (159), CASADESUS et OLIVARES (66)]. Ces plasmides, en particulier le plasmide RP4 du groupe d'incompatibilité P<sub>1</sub>, peuvent être transférés entre **Rhizobium** et **Escherichia coli** avec des fréquences comprises entre 10<sup>-5</sup> et 10<sup>-2</sup> par cellule réceptrice. Des fréquences similaires ont pu être observées d'**E. coli** vers **Rhizobium** [DATTA **et al.** (84), BERINGER (36), MEADE et SIGNER (197), KONDOROSI **et al.** (159)]. L'insertion **in vivo** d'un élément génétique transposable tel que le transposon Tn5 [JOHNSTON **et al.** (142), BANFALVI **et al.** (21)], **in vitro** de fragments chromosomiques de **R. meliloti** [JULLIOT et BOISTARD (144)] ou encore de fragments du plasmide à mobiliser, permet l'obtention d'une série de plasmides RP4-prime. Ils furent utilisés pour situer différentes mutations [KISS **et al.** (155)], pour comparer les cartes génétiques [KONDOROSI **et al.** (162)] ou pour transférer des gènes de **R. meliloti** à d'autres genres bactériens [JOHNSTON **et al.** (142), BANFALVI **et al.** (21)].

## 2 - La transformation et la transfection

Ces deux modes de transferts génétiques sont très utiles pour introduire des plasmides dans les bactéries ou pour réintroduire chez d'autres espèces bactériennes des ADN clonés dans ces plasmides.

Les premiers essais de transformation chez les Rhizobiacées remontent aux travaux de BALASSA (18) repris plus tard par BALASSA (17), GABOR-HOTCHKISS (112) et ZELAZNA-KOWALSKA et LORKIEWICZ (296). La transformation réalisée avec de l'ADN double brin n'a jamais été montrée, ce qui tend à prouver que le genre **Rhizobium** n'est pas réceptif à ce type de transformation. Récemment, la transformation chez **R. leguminosarum** avec de l'ADN plasmidique circulaire a été signalée [BULLERJAHN et BENZINGER (55)]. Cependant, les faibles fréquences de transformation enregistrées ( $10^{-8}$ ) limitent sérieusement l'emploi de cette technique. Des résultats similaires ont été décrits chez **R. meliloti** [KISS et KALMAN (156), SELVARAJ et IYER (237)]. La transformation de **R. trifolii** avec du DNA plasmidique isolé d'une autre souche de **R. trifolii** s'est montrée efficace et atteint des fréquences comprises entre 1,4 et  $2,6 \times 10^{-5}$  [KOWALCZUK et al. (163)].

En ce qui concerne la transfection, peu d'expériences ont été réalisées à ce jour si ce ne sont celles effectuées avec du DNA phagique purifié [SIK et OROSZ (241), KONDOROSI et al. (161), STANIEWSKI et RUGALA (254)]. Là encore, les fréquences restent extrêmement basses.

## 3 - La transduction

La transduction généralisée est le résultat de l'encapsulation d'un morceau d'ADN bactérien quelconque à la place de l'ADN phagique. La particule transductrice ainsi formée, est libérée lors de la lyse de la bactérie et peut ainsi infecter une autre cellule bactérienne. Etant donné que cette particule ne contient pas de génome phagique, la cellule infectée ne se lyse pas. Si l'ADN injecté possède des homologues avec l'ADN chromosomique de la cellule-hôte, il pourra y avoir intégration par crossing-over. La transduction généralisée a été particulièrement utile pour la construction des cartes génétiques ; la cotransduction de deux loci indiquant leurs liaisons physique et génétique, les fréquences de cotransduction donnant quant à elles une

indication sur les distances relatives entre les loci. Chez *R. meliloti*, la transduction généralisée a permis de réaliser le transfert de gènes d'auxotrophie [KOWALSKI (164), CASADESUS et OLIVARES (66), SIK *et al.* (240), FINAN *et al.* (106), MARTIN et LONG (193)]. Un cas de transduction spécifique a été mentionné par SVAB *et al.* (259). La transduction a été également utilisée pour construire la carte génétique de *R. leguminosarum* [BUCHANAN-WOLLASTON (51)].

#### 4 - Les méthodes actuelles d'analyse génétique

Ces méthodes ont, quant à elles, donné des résultats intéressants sinon définitifs sur la structure du génome des Rhizobiacées. Par hybridation avec les gènes de structure de *nif* (17 au moins) de *Klebsiella pneumoniae* (la souche qui fut utilisée est le plasmide pSA30), il a été possible d'identifier par hybridation les gènes *nif* sur l'ADN cloné de *R. meliloti*. Ceci est relativement aisé du fait de la conservation remarquable de la structure de la nitrogénase chez les différentes espèces bactériennes.

De nombreux vecteurs de clonages pour *R. meliloti*, construits à partir de plasmides de différentes origines, ont été décrits. Les vecteurs cosmidiqes, utilisés pour la première fois par COLLINS et HOHN (74), sont des vecteurs plasmidiqes contenant les extrémités cohésives (ou bouts gluants) du phage  $\lambda$  ( $\lambda$  *cos*). Pour réaliser les expériences de clonage de gènes, la présence du site  $\lambda$  *cos* nécessite l'encapsidation du plasmide dans les têtes de  $\lambda$ . L'ADN pouvant être inséré doit représenter de 78 % (38 Kb) à 107 % (51 Kb) de l'ADN de  $\lambda$  (49 Kb) pour être convenablement encapsidé [FEISS *et al.* (103), FEISS et SIEGELE (104)]. Etant donné que les vecteurs cosmidiqes habituellement utilisés ont une taille oscillant entre 5 et 10 Kb, seuls les ADN polycosmidiqes (produits de la ligation de plusieurs vecteurs) ou les cosmides contenant des morceaux d'ADN de 40 à 45 Kb peuvent être encapsidés. Ainsi, FRIEDMAN *et al.* (110) construisirent le cosmide pLAFRI en insérant la région  $\lambda$  *cos* dans le plasmide pRK290 [DITTA *et al.* (99)], lui-même dérivant du plasmide du type P1, RK2 identique au plasmide RP4 ou R18 étudié par BURKARDT *et al.* (57). De même, l'expression des gènes dans *R. meliloti* fut également analysée à partir de cosmides construits par insertion du gène *cos* du bactériophage P4 dans le plasmide RK2 [KAHN et TRIMBLIN (146)]. Ces cosmides sont facilement introduits dans les capsides du phage P2.

Pour étudier non pas les gènes **nif** mais l'ensemble des gènes de la symbiose chez **Rhizobium**, des méthodes comme celles décrites en 1984 par AUSUBEL (16) ont été source de résultats importants. Pour ces auteurs, il s'agit d'effectuer des mutations chez **Rhizobium** par transposition du plasmide **Tn5** d'**E. coli**. L'isolement des clones transposés (kanamycine résistant) est aisé. Chacun d'eux est testé pour la symbiose sur plantule. Lorsque celle-ci est négative (mutations rares), il est possible d'étudier l'étape bloquée. Pour trouver les gènes inactivés par transposition, on hybride de longs fragments d'ADN total des mutants avec le **Tn5** marqué, ce qui permet d'obtenir une sonde correspondant au gène inactivé. Par hybridation avec de l'ADN de la souche sauvage, il va être alors possible d'isoler les gènes actifs correspondant. Malgré les difficultés de localisation, il apparaît que les gènes de la symbiose se trouvent sur le plasmide géant.

## II. - LES VIRUS DES BACTERIES OU BACTERIOPHAGES

Le virus, composé de matériel génétique entouré d'une coque protéique, est l'une des plus simples entités capable de se reproduire. Les virus n'ont pas de système métabolique, ils n'ont pas de système de mobilité ; ils ne peuvent répondre aux stimuli et ne peuvent croître au sens propre du terme. Leur capacité à maintenir l'intégrité de leur matériel génétique, grâce à leurs possibilités de mutation, est le seul fondement permettant de les considérer comme des êtres vivants. Par ailleurs, le mécanisme grâce auquel ils se reproduisent est unique en Biologie. Dans tous les cas, au cours du cycle de reproduction, le matériel génétique viral devient fonctionnel dans la cellule qu'il infecte. Le matériel génétique apporté par le virus cause l'infection de la cellule aboutissant soit à la production de particules virales, la mort de la cellule étant le résultat final, soit au changement de celle-ci avec acquisition de nouvelles caractéristiques.

### A. - Découverte des virus et des bactériophages

#### 1 - Des virus

La présomption de la présence d'organismes autres que les bactéries responsables de maladies infectieuses transmissibles date des travaux de IVANOWSKI (135). En effet, en utilisant les bougies de CHAMBERLAND (70),

mises au point quelques années plus tôt (1884), il montre que la mosaïque du tabac d'appartement (*Nicotiana glutinosa*) peut être transmise aussi bien à partir de broyats de feuilles malades non filtrés que filtrés. Il en conclut que la maladie n'est due ni à une bactérie ni à un champignon.

Il suggère, à cette époque, que l'agent causal pourrait être une toxine bactérienne, hypothèse inspirée par la découverte de la toxine diphtérique par ROUX et YERSIN en 1888 (227). Ignorant les travaux d'IVANOWSKI, BEIJERINCK en 1898 (31) démontre que la mosaïque du tabac n'est pas due à une bactérie mais à un virus vivant. Ce virus ne se multiplie que dans la plante en croissance où des divisions cellulaires ont lieu. Porté à ébullition, le virus est inactivé mais il peut être déshydraté sans perdre ses propriétés infectieuses. BEIJERINCK nomme cet agent causal le "**Contagium vivium fluidum**".

L'agent infectieux filtrable, appelé de nos jours "virus", est découvert. Depuis, de nombreux autres virus furent isolés, l'un des derniers en date étant celui du Syndrome d'Immuno Déficience Acquisée ou S.I.D.A. [BARRE-SINOUSSE **et al.** (25)]. Les virus sont présents dans le règne végétal, animal et chez les bactéries.

## 2 - Des bactériophages

Les virus des bactéries furent découverts simultanément par TWORT (264) et D'HERELLE (129) sans qu'apparemment ils eussent connaissance de leur découverte respective [STENT (255), NICOLLE (206), DUCKWORTH (101). Quoi qu'il en soit, en 1915, TWORT (264) observe que des cultures de "microcoque" deviennent vitreuses et transparentes. Il s'est avéré plus tard qu'il s'agissait de staphylocoque [ACKERMANN et DUBOW (5)]. Ce phénomène est transmissible, d'une culture à une autre ; l'agent causal traverse les filtres de porcelaine et est inactivé à 60°C. TWORT (264) suggère que cet agent peut être une bactérie ou une enzyme possédant la faculté de se reproduire. Ces résultats ne furent pas remarqués et restèrent inexploités.

En 1915, également, à l'Institut Pasteur de Paris, D'HERELLE observe que des lysats de selles de malades atteints de dysenterie sont capables de liser des cultures bactériennes sur boîte et en milieu liquide. Il publie ses résultats



en 1917 (129), montrant clairement que l'agent causal est un microbe invisible, parasite obligatoire des bactéries vivantes qu'il nomme "bactériophage", phage en abrégé. Ce terme est utilisé de nos jours pour désigner tous les virus des procaryotes, ainsi que ceux des archaebactéries, des cyanobactéries et des mycoplasmes.

### B. - Classification des phages

Comme tous les virus, les bactériophages possèdent une structure élémentaire protéique ou capsidique à laquelle peuvent s'adjoindre d'autres éléments de même nature tels une queue, des fibres, des spicules. La capsidique protège un acide nucléique, soit un ADN, soit un ARN de structure mono ou bicaténaire. L'ensemble capsidique-acide nucléique constitue la nucléocapsidique qui peut montrer une symétrie cubique hélicoïdale ou mixte.

Au moment de sa découverte et jusqu'en 1926, D'HERELLE (130) pensait qu'il n'existait qu'une seule espèce de phage, le **Bacteriophagum intestinale**. En effet, sa suspension phagique était capable de lyser des bactéries aussi différentes que **Escherichia coli**, les Salmonelles, les Shigelles et **Yersinia pestis**. Isolée de fèces de malades, cette suspension était à n'en pas douter un mélange de plusieurs phages. En 1948, HOLMES (133) publie la première classification des virus dans laquelle les phages font partie de l'ordre des Virales, forment une seule famille à un seul ordre et à un seul genre. Cette classification qui aboutissait à des associations étranges comme celle entre les poxvirus et les herpesvirus ne fut pas longtemps acceptée par la communauté scientifique. En 1962, les travaux de LWOFF, HORNE et TOURNIER (le système LHT) (189) permirent de classer les virus en tenant compte de leurs propriétés morphologiques et physico-chimiques. Les phages furent placés en 3 groupes : les Microviridés (type  $\phi$  X174), les Léviridés (type MS2) et les Inoviridés représentés par le seul genre **Inovirus** (type fd). Les phages caudés furent groupés en une seule famille de l'ordre des Urovirales.

En 1965 et 1967, BRADLEY (47, 48) propose de classer les phages en 6 groupes morphologiques qui correspondent aux types d'acide nucléique possédés. On trouve des phages à longue queue contractile ou non, à queue courte, des phages cubiques à ADN ou ARN et enfin les phages filamenteux

(figure 3). Cette classification fut largement admise et est encore utilisée de nos jours.

En 1968, TIKHONENKO (261) propose une classification très proche avec regroupement des phages à ADN et à ARN à symétrie cubique.

En 1974, ACKERMANN et EISENSTARK (6) étendent le schéma originel de BRADLEY en y incluant toute une série de phages, nouvellement découverts, des cubiques, des filamenteux et des pléomorphes. Les phages caudés sont subdivisés en virus à tête isométrique, plus ou moins allongée. Le type D4 est ajouté plus tard [ACKERMANN (1)] pour représenter les phages cubiques possédant un ADN bicaténaire et une double capsid (genre **Tectivirus**, Famille des Tectiviridés). Enfin, très récemment, ACKERMANN (3) et ACKERMANN et DUBOW (5) proposent d'adjoindre à cette classification le groupe F3 constitué du phage TTV1 filamenteux, enveloppé, à ADN bicaténaire, nouvellement découvert chez l'archaebactérie **Thermoproteus tenax**. La figure 4 donne la représentation schématique des différents morphotypes phagiques reconnus de nos jours.

### C. - Présence des phages dans la nature

Tout naturellement, là où existent des bactéries, il existe des phages. Leur habitat le plus important est cependant la bactérie lysogène. En effet, à peu près la moitié des phages connus ont été isolés de bactéries lysogènes ou se sont révélés tempérés après leur isolement à partir de produits naturels.

Chez les bactéries sporulantes, les phages se perpétuent à l'état de prophage ou inclus dans la spore. Cette particularité est quelquefois utilisée pour la conservation des phages de **Bacillus** [ACKERMANN et DUBOW (5)]. Les phages ont été isolés à partir d'une grande diversité de milieux : l'air, les eaux : douces, salées ou d'égout, les sols, les plantes, les aliments (produits laitiers et crustacés surtout), les animaux sains ou malades et leurs excréments, quelquefois seuls mais très souvent associés avec leurs hôtes bactériens [ACKERMANN et DUBOW (5)].

Les phages ainsi que leurs hôtes peuvent être isolés de niches écologiques particulières aux conditions acides, basiques, salées ou saumâtres ou dans des

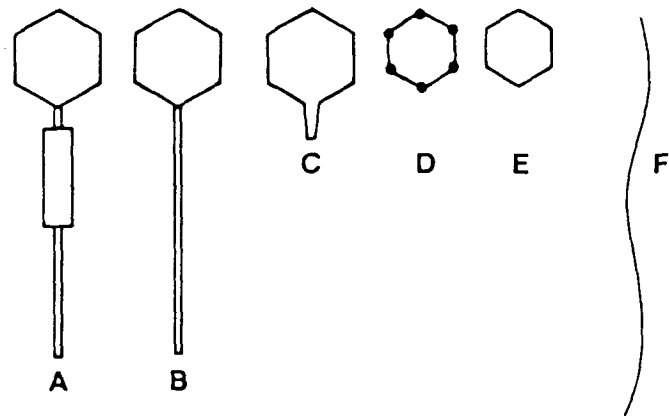


Figure 3 - Les six groupes morphologiques de bactériophages selon BRADLEY (47).

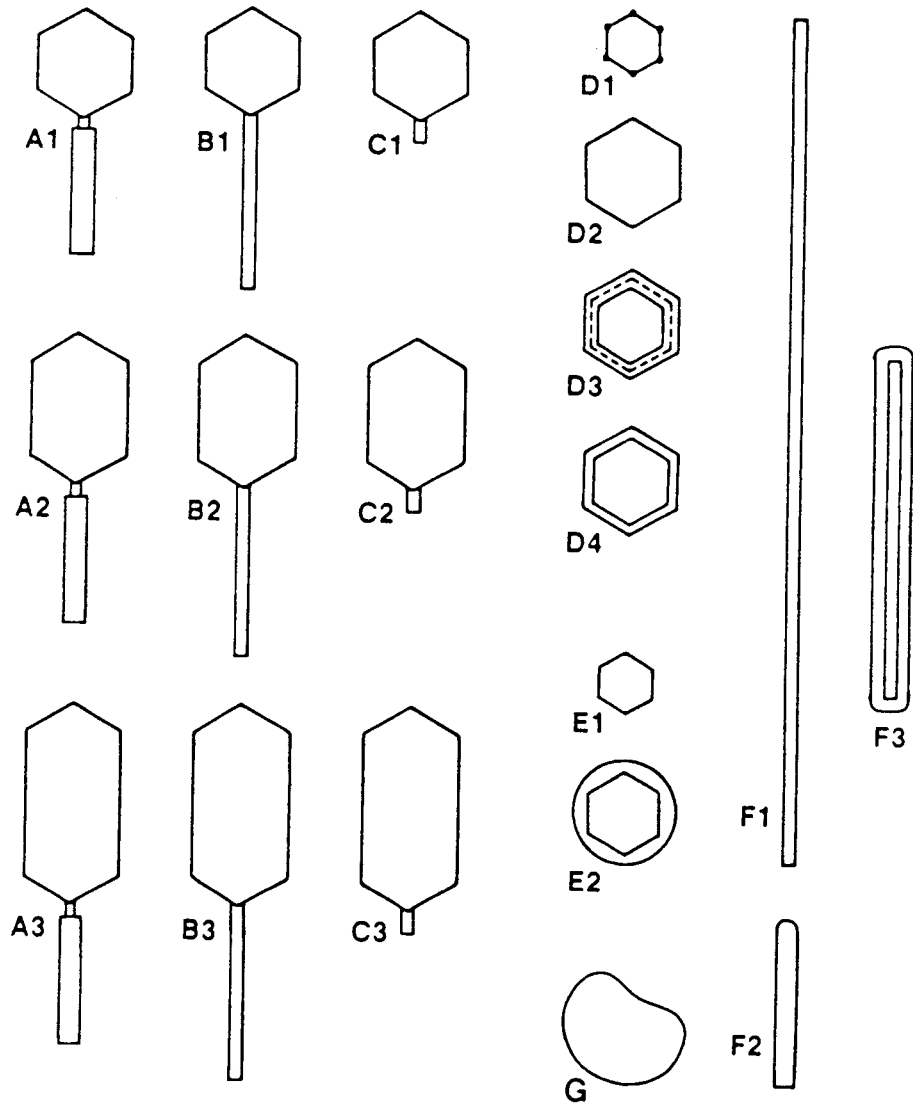


Figure 4 - Morphotypes phagiques actuellement reconnus, d'après ACKERMANN et DUBOW (5).

conditions de températures élevées. Il n'existe pas de corrélations entre la morphologie de ces phages et leur situation dans les différents habitats. En effet, des phages morphologiquement identiques et probablement apparentés peuvent être rencontrés dans des endroits très différents. Les recherches sur la répartition géographique des phages n'en sont qu'à leurs débuts. En effet, elles impliquent des investigations mettant en oeuvre des moyens importants comme la possession d'un microscope électronique et d'une batterie d'antisérums, moyens non disponibles dans certains pays. Cependant, il semble que les phages sont présents sur tout le globe. Certains phages, tels T2, B4, N4 ou T7, semblent être ubiquitaires. Les coliphages à RNA, eux aussi, ont été rencontrés dans de nombreux pays [ACKERMANN et DUBOW (5)].

#### **D. - Origine et évolution des phages**

##### **1 - Origine**

Trois théories ont été proposées pour tenter d'expliquer l'origine des phages : (a) les virus sont des descendants spécialisés des premières formes de vie ; (b) ce sont des organismes en dégénérescence, en particulier pour MATTHEWS (195) qui voit les virus dériver de bactéries dégénérées ; enfin, (c), les virus représentent des gènes devenus infectieux [REANNEY et ACKERMANN (1975)] ou des fragments d'acides nucléiques devenus indépendants et infectieux [LWOFF (187)].

Pour les phages, en particulier, un consensus semble être obtenu quant à leur origine chromosomique [ADAMS (9), BRADLEY (49)] ou extrachromosomique [LWOFF (187), ADAMS (9) et BRADLEY (47)]. Ce dernier auteur suggère que les phages filamenteux du type fd ont pour origine les facteurs R. Ces épisomes auraient acquis la faculté de coder pour la synthèse de F-pili. Ces pili, servant de canal au cours de la conjugaison bactérienne, deviendraient autonomes et pourraient être considérés comme la forme primitive du phage fd. De même, les phages à ARN de la famille des Léviridés peuvent avoir évolué à partir des ARNm cellulaires [BRADLEY (49)].

## 2 - Evolution

L'évolution des acides nucléiques phagiques semble avoir été acquise à la faveur de nombreuses modifications telles que les mutations ponctuelles, les réarrangements génomiques ou les recombinaisons [REANNEY et ACKERMANN (220)].

Les mutations ponctuelles paraissent avoir joué un rôle très important chez les coliphages à ADN T3, T7 et  $\phi$ 11 et probablement chez les Microviridés. Cependant, d'une manière générale, l'ADN est copié relativement fidèlement.

Par contre, chez les phages à ARN monocaténaire (Léviridés), la réplicase du phage Q $\beta$  par exemple peut engendrer jusqu'à 15 p100 d'ARN sensiblement différents. Il s'agit là d'un phénomène très important pour l'évolution des phages de cette famille.

Les réarrangements génomiques ont également une part importante dans le déroulement de l'évolution de certains phages. L'étude d'hétéroduplex de nombreuses variétés de phages caudés des entérobactéries, de **Bacillus**, **Pseudomonas** et **Streptomyces**, ont révélé des régions de complète homologie, suggérant des remaniements importants par délétion, duplication ou substitution [REANNEY et ACKERMANN (220)]. L'insertion-délétion se réalise chez les phages  $\lambda$  et P22 et est particulièrement évidente chez les phages T-pairs.

En ce qui concerne les recombinaisons, trois phénomènes sont classiquement décrits. Le premier consiste en une recombinaison entre phages. Il s'agit là d'une acquisition de matériel génétique à la faveur de l'infection d'une bactérie possédant un prophage ou bien de l'infection simultanée par deux phages différents. Par exemple, des hybrides viables ont été obtenus à partir des phages  $\lambda$  et P22. Notons que l'on peut également obtenir des phages viables par surinfection de bactéries portant des phages défectifs par des phages apparentés. Le deuxième phénomène observable est la recombinaison phage-plasmide. Ces hybrides ont été construits au laboratoire et peuvent exister dans la nature. Nous ne donnerons ici qu'un exemple. La totalité du génome du phage Mu a pu être introduit dans le plasmide RP4. Lorsque cet hybride est transféré par conjugaison chez **Pseudomonas solanacearum** et chez

**Rhizobium meliloti**, le génome du Mu est transcrit et s'exprime chez ces nouveaux hôtes [BOUCHER **et al.** (41)]. Enfin, le troisième phénomène observable est la recombinaison entre le phage et l'ADN de son hôte, c'est-à-dire, plus précisément, la transduction généralisée. Elle semble être à l'origine de la naissance d'un nombre important de nouveaux phages et tient de ce fait une place non négligeable dans leur évolution.

### E. - Multiplication des phages - Le cycle lytique

Le même bactériophage peut exister dans trois états différents : sous forme de virion extracellulaire, de virion intracellulaire ou forme végétative et enfin à l'état de prophage. Les bactériophages, dont le matériel génétique est capable de survivre dans la cellule-hôte sans exprimer sa virulence, sont appelés tempérés, ceux qui en sont incapables et qui lysent la bactérie sont appelés "virulents". Le phage virulent est un parasite létal pour la bactérie chez laquelle il contrôle, à son profit, les voies métaboliques, lui ordonnant de produire ses propres constituants. Le cycle lytique se réalise en 4 étapes : l'adsorption, l'infection, la multiplication et la libération des phages.

#### 1 - L'adsorption

Elle se fait au hasard ; l'attachement au départ réversible, devient très vite irréversible. Il est hautement spécifique et se réalise grâce à une concordance entre les récepteurs phagiques et bactériens. Les points de fixation des phages sur les bactéries peuvent être très différents.

La très grande majorité des phages caudés s'adsorbent sur l'enveloppe bactérienne par leurs crampons et/ou leurs fibres caudales avec contraction ou non de leur queue. Le phage PBS1 de **Bacillus subtilis** (morphotype A1), qui possède 3 longues fibres caudales et le phage X de **Serratia marcescens** (morphotype B1 à une seule fibre caudale), s'adsorbent eux sur les flagelles de leur hôte. D'autres phages, tels le phage Vi de **Salmonella typhi** ou de nombreux phages d'**Escherichia coli** de morphotype C1, s'adsorbent spécifiquement sur la couche muqueuse polysaccharidique externe.

Les phages sans queue à ADN (Microviridés, Corticoviridés et Tectinoviridés) se fixent par leurs fibres apicales. Les Cystoviridés (phages à ARN

bicaténaire) et les Plasmaviridés (à ADN bicaténaire) s'adsorbent par leur enveloppe, tandis que les Léviridés (phages MS2, M17, f2) (ARN monocaténaire) et les phages filamenteux (type fd) (Inoviridé à ADN monocaténaire) se fixent respectivement sur le côté ou à l'extrémité des F-pili. La figure 5, d'après ACKERMANN et DUBOW (5), donne une représentation schématique des différents types d'adsorption.

L'adsorption phagique peut être appréciée par la valeur du taux d'adsorption [ADAMS (9)]. Il est proportionnel au nombre de phages et bactéries présents lors de la réaction. Décroissant exponentiellement en fonction du temps, sa valeur dépend de la cellule-hôte, du milieu (composition, pH, présence de cations), de la température et du virus employé.

D'une façon générale, dans la plupart des systèmes phages-bactéries, 90 % des phages sont adsorbés après 10 min de contact. Nous verrons, dans la suite de ce travail, que c'est également le cas pour les phages de **Rhizobium meliloti** de notre collection.

Des éléments ou conditions requis pour l'adsorption, ce sont les co-facteurs constitués par les ions bivalents tels  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  qui ont été les plus étudiés. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , à eux seuls, sont exigés non seulement pour l'adsorption phagique mais également pour la pénétration de l'ADN, la lyse bactérienne et la stabilité des phages. Les ions  $\text{Mg}^{2+}$  jouent également un rôle important dans la stabilité des phages.

## 2 - L'infection

Chez les phages à queue contractile, après attachement sur l'hôte, la queue se contracte et le canal central entre en contact avec l'enveloppe bactérienne. La sécrétion de lysozyme amène le percement de celle-ci. L'ADN se déroule et entre dans la cellule-hôte en des endroits moins épais de l'enveloppe où l'on a pu observer des zones d'adhérence entre la paroi et la membrane plasmique [FURUKAWA **et al.** (111)]. L'ADN phagique est protégé des endonucléases de restriction de la cellule bactérienne (voir la partie de ce travail consacrée à la restriction-modification). Les mécanismes intervenant lors de l'infection par les phages à queue non contractile contenant de l'ADN restent encore mal connus même pour le phage  $\lambda$  pourtant beaucoup étudié.



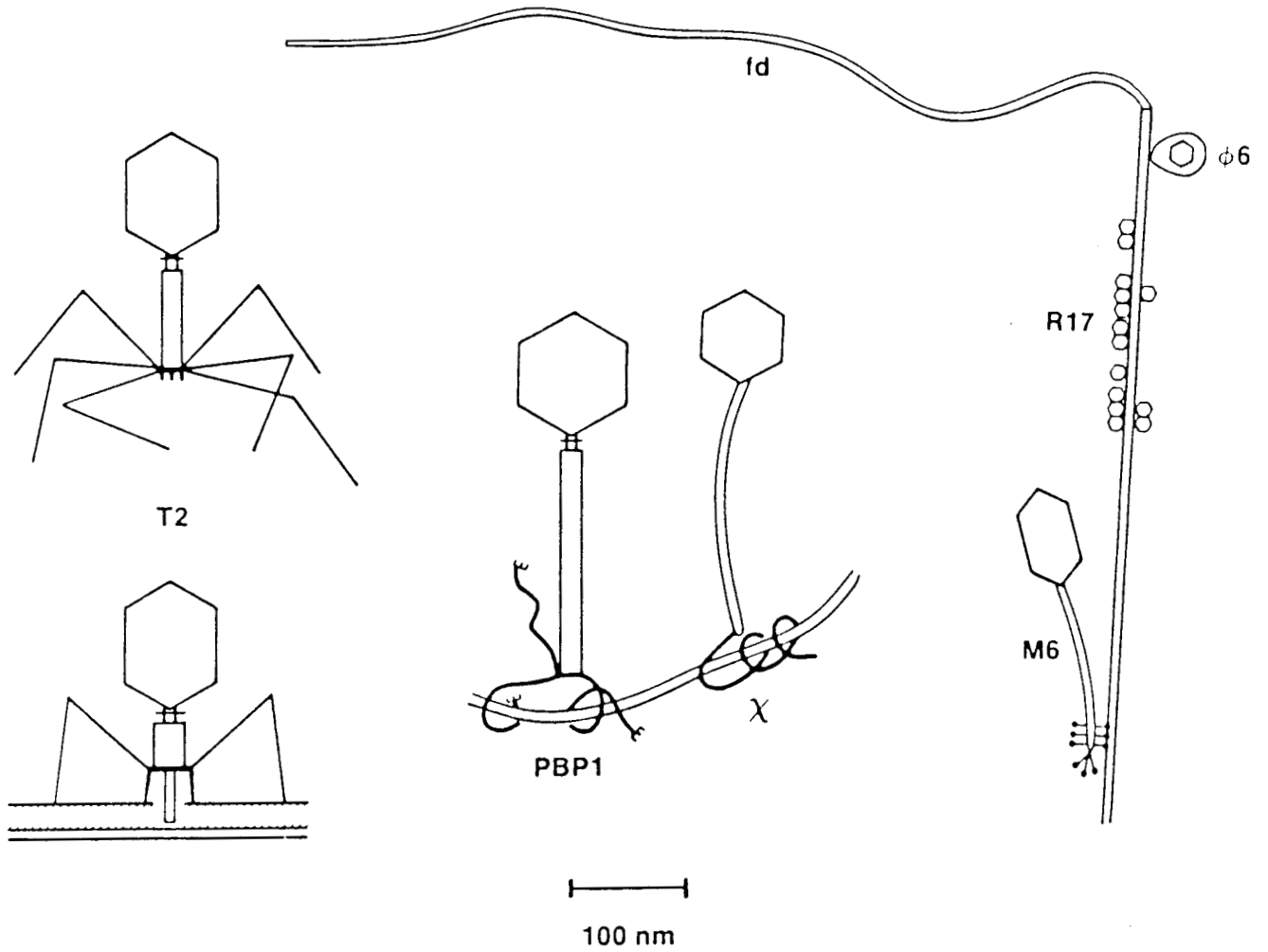


Figure 5 - Les sites d'adsorption des bactériophages, d'après ACKERMANN et DUBOW (5).

En effet, contrairement aux phages à queue contractile dont l'ADN est injecté par effraction comme à l'aide d'une seringue, chez les phages à queue non contractile, l'ADN phagique se trouve momentanément emprisonné entre la paroi et la membrane cytoplasmique bactérienne. Dans cette zone, les nucléases bactériennes coupent l'ADN rendant ainsi d'autant plus difficile le passage de l'acide nucléique phagique et son expression dans la bactérie. Pour ce qui est des autres phages (sans queue, filamenteux et pléomorphes), les processus sont très variés. Chez les Tectiviridés, l'observation de particules intactes ne révèle pas la présence d'une queue ; cependant, sur des particules endommagées ou traitées au chloroforme, on peut observer une queue émanant de l'enveloppe interne de la capsid [ACKERMANN *et al.* (8)]. Chez les Microviridés, les Léviridés et le genre **Inovirus**, les protéines H et A pour les premiers et la protéine A de l'extrémité du phage fd jouent le rôle de médiateur lors de l'adsorption et de guide au cours de l'injection de l'acide nucléique. En ce qui concerne le phage fd, l'infection semble se faire lorsque le F-pilus s'est rétracté dans la cellule-hôte.

Chez le phage  $\phi$  6 (Cystoviridés), la capsid entière pénètre dans l'espace périplasmique et ne semble pas aller plus loin. Quant au déroulement de l'infection due au **Corticovirus** PM2, elle reste inconnue [ACKERMANN et DUBOW (5)].

### 3 - La multiplication

La multiplication phagique, initiée par la pénétration de l'acide nucléique viral, se déroule en plusieurs étapes qui aboutissent à la libération des virions nouvellement formés. L'analyse des différentes étapes requiert un nombre important de cellules qui doivent être infectées simultanément, une infection secondaire devant être évitée. Ce sont les conditions de lyse en une seule étape (one step growth conditions) mises au point par ELLIS et DELBRÜCK (102). Les bactéries sont infectées un très court instant, puis le mélange est fortement dilué ou additionné d'un sérum antiphage spécifique afin d'éviter toute adsorption supplémentaire de phages. La multiplicité d'infection (m.o.i.), pour "multiplicity of infection", c'est-à-dire le nombre de phages par bactérie doit être déterminé très précisément. Pour une m.o.i. trop élevée, on assistera à une lyse par l'extérieur (lysis from without) [HERSHEY et CHASE (131)] qui correspond à la lyse de la bactérie sans émission de nouveaux phages.

Si, par contre, la m.o.i. est très faible, une partie de la population bactérienne ne sera pas infectée.

La courbe de multiplication en une seule étape représente la production de phages en fonction du temps dans les conditions décrites ci-dessus (figure 6).

Trois phases peuvent être décrites : la phase d'adsorption, la phase d'éclipse et la phase de libération des phages (en trait plein). Les deux premières phases réunies sont couramment appelées phase de latence. Si l'on représente l'évolution du nombre de phages intracellulaires en fonction du temps, on obtient une courbe parallèle à la phase représentant les phages libérés mais décalée dans le temps (trait pointillé). La période de latence dépend du phage bien sûr mais également des conditions expérimentales, c'est-à-dire la composition du milieu, la présence d'ions bivalents et la température d'incubation. La phase de latence peut varier énormément d'une espèce bactérienne à une autre. Très courte, de l'ordre de 20 min chez **Escherichia coli** infecté par le phage T2, elle peut atteindre des durées comprises entre 30 et 40 heures chez les cyanophages [FOX **et al.** (108)]. Faisant suite à la phase de latence, la multiplication phagique proprement dite aboutit à la libération des phages. A la fin de la lyse, on peut estimer le nombre de phages libérés ou burst-size [ADAMS (9)]. Comme pour la phase de latence, cette valeur varie très fortement selon le phage et les conditions de culture.

#### a) La transcription

C'est le transfert de l'information génétique de l'ADN ou de l'ARN viral vers l'ARN messenger. Cette phase est réalisée par des ARN polymérases dont l'origine est multiple et permet chez beaucoup de phages une régulation de la transcription. Elles peuvent provenir de la cellule-hôte, être d'origine phagique et synthétisées après l'infection ou être transportées par la capsid. La multiplication phagique passe pour tous les phages par l'étape ARN messenger.

La présence de ces polymérases associées aux virions, indispensables à la transmission de l'information génétique, conduisit BALTIMORE (20) à souligner le rôle central des ARN messagers dans la multiplication virale. Il proposa alors une classification des virus basée non plus sur les caractères

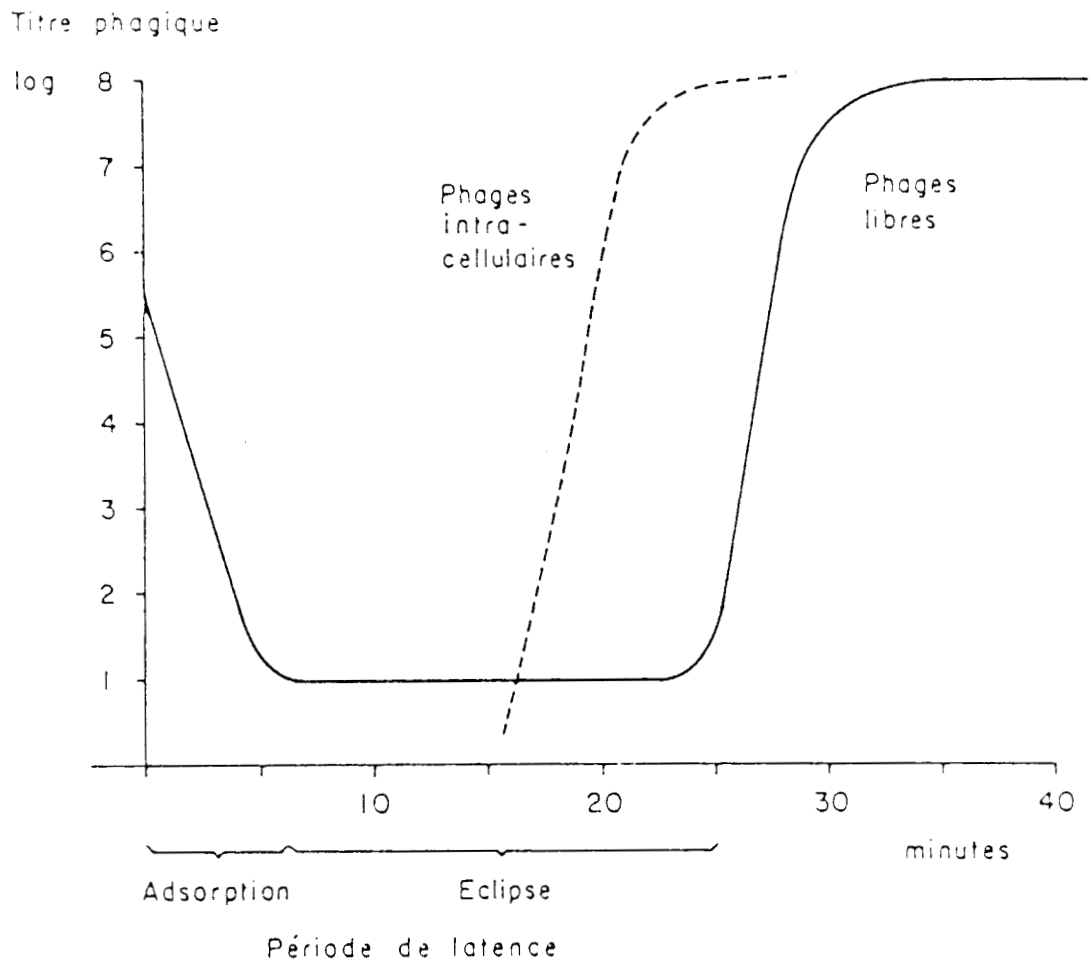


Figure 6 - Courbe de multiplication du phage T2, d'après ACKERMANN (2).

morphologiques ou structuraux mais sur la "stratégie" employée par les différents groupes de virus pour synthétiser les ARN messagers. Cette classification divise les virus en 6 grandes classes.

Les virus de la classe I sont des virus à ADN bicaténaire, transcrivant leur ADN de façon asymétrique pour donner naissance à leurs ARN messagers. Cette classe regroupe la grande majorité des phages (phages caudés, Corticoviridés, Tectiviridés, Plasmaviridés, et phages du groupe F3).

Les virus de la classe II possèdent un ADN monocaténaire de la même polarité que leur ARN messager (cet ARN messager n'est pas synthétisé à partir de l'ADN viral mais à partir d'une copie de celui-ci). Les Microviridés et les Inoviridés font partie de cette classe.

Les virus du groupe III possèdent un ARN bicaténaire segmenté. La synthèse de leurs ARN messagers se fait par transcription asymétrique du génome. Le cystovirus  $\Phi 6$  de **Pseudomonas phaseolicola** est le seul représentant de cette classe.

Les virus du groupe IV possèdent un ARN monocaténaire non segmenté de même polarité que leurs ARN messagers. Ils doivent cependant passer par l'intermédiaire d'une copie complémentaire du génome pour synthétiser plus de messagers. Les phages de la famille des Léviridés appartiennent à cette classe.

Les virus de la classe V possèdent un ARN monocaténaire complémentaire de leur ARN messager dont la synthèse peut donc se faire par transcription directe du génome. A notre connaissance, aucun phage appartenant à ce groupe n'a été décrit.

Enfin, les virus de la classe VI possèdent un ARN monocaténaire de même polarité que leurs ARN messagers. Cependant, ceux-ci ne sont synthétisés qu'à partir d'une transcription du génome en ADN bicaténaire, intégrée dans le génome de la cellule-hôte. Là encore, à notre connaissance, aucun phage appartenant à cette classe n'a été décrit.

## b) Réplication de l'acide nucléique viral

### α) Réplication de l'ADN viral

Chez les phages à ADN bicaténaire, la réplication est semi-conservative et bidirectionnelle et réalisée grâce aux polymérases cellulaires ou virales. Selon les phages, la réplication aboutit à des formes répliquatives de structures plus ou moins complexes et importantes sous forme d'ADN branchés ou présentant des boucles. L'ADN est ensuite coupé en fragments qui pénètrent dans la tête phagique.

Chez les phages à ADN monocaténaire, un intermédiaire bicaténaire est synthétisé à partir de l'ADN viral ; il servira de forme répliquative. Finalement, de l'ADN viral monocaténaire sera synthétisé à partir de la forme répliquative et introduit dans la capsid au moment de sa maturation.

### β) Réplication de l'ARN viral

Elle est semi-conservative comme celle de l'ADN. Chez les Léviridés, par exemple, un brin complémentaire est synthétisé à partir de l'ARN monocaténaire phagique, puis sert de modèle à la synthèse de l'ARN viral.

## c) Morphogenèse virale

Les différents composés s'assemblent pour former un virion injectieux mature. De tous les phages existants, les phages T-pairs ont été les plus étudiés et leur morphogenèse est aujourd'hui bien connue. Nous présenterons ici l'assemblage du phage T4 (figure 7). L'assemblage final se réalise à partir de 3 sous-assemblages, celui de la tête, de la queue et des fibres caudales. Il s'agit, dans le cas du phage T4, d'un des phages dont la structure de la capsid est la plus complexe. Se présentant au départ sous la forme d'un noyau entouré de protéines, la prétête I subit un réarrangement qui lui confère sa forme anguleuse (prétête II). Après un premier clivage du noyau et adjonction d'ADN, elle se transforme en prétête III. Bientôt débarrassée de son noyau et pourvue de tout son ADN, elle se transforme en une tête complète. La queue, formée par l'assemblage de la plaque basale, du tube et de la gaine, vient se fixer à la tête, suivie ensuite des fibres caudales. La particule ainsi formée est un phage mature qui va être libéré.

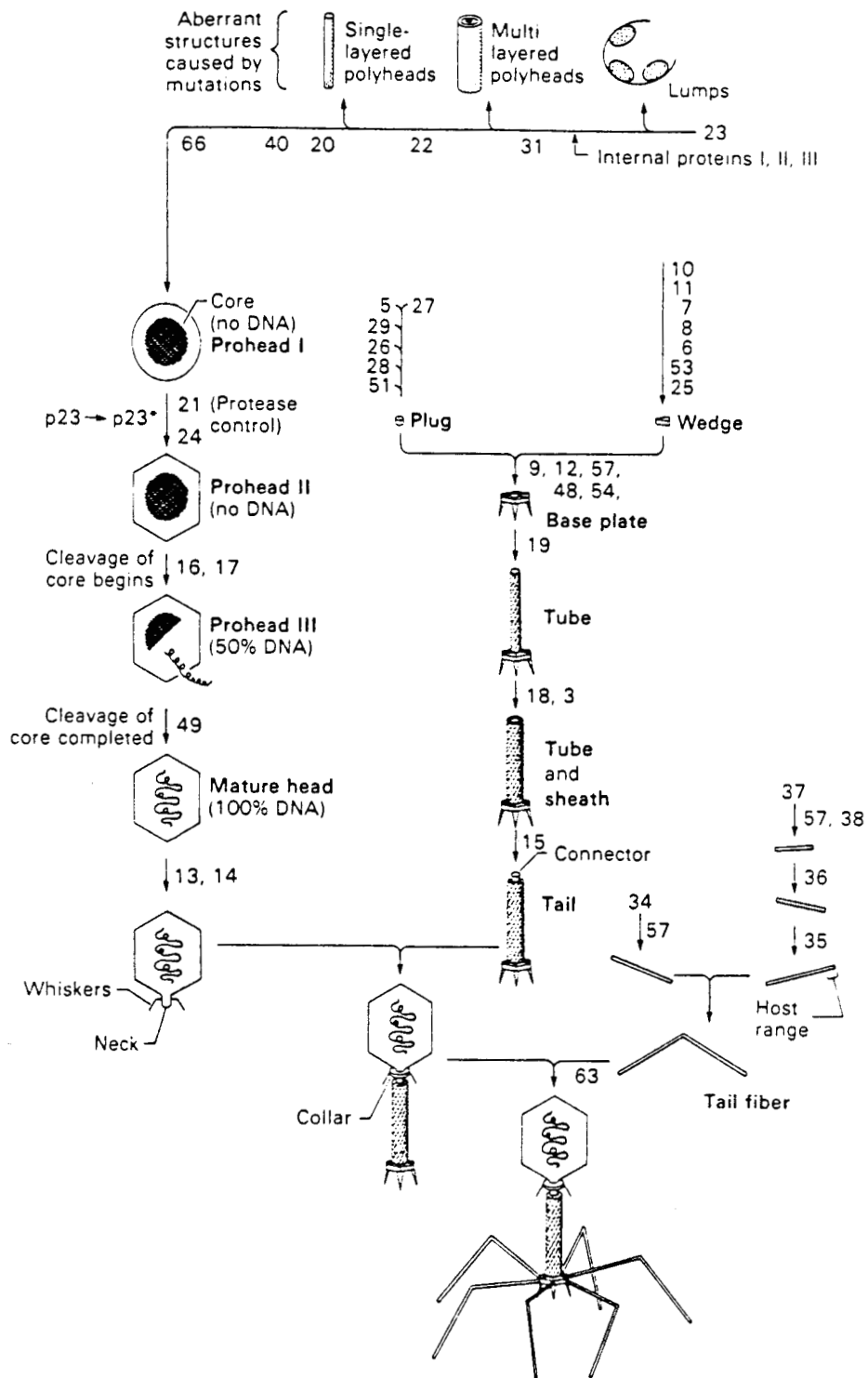


Figure 7 - Représentation schématique de l'assemblage du phage T4, d'après LAEMMLI et FAVRE (169).

L'assemblage que nous venons de décrire est séquentiel. Si pour une raison ou pour une autre une séquence venait à ne pas être lue et exprimée, la conséquence en serait la production de particules anormales sous la forme de polytêtes régulières ou irrégulières, de polymanchons, de phages à tête géante ou à queues multiples [CASJENS et KING (67)].

#### 4 - Libération des virions

La libération phagique se fait selon les phages par lyse de la cellule-hôte, par extrusion ou par bourgeonnement. Chez les phages caudés et cubiques, l'action du lysozyme phagique sur l'enveloppe bactérienne provoque l'éclatement de la cellule-hôte. L'extrusion est de règle chez les phages du type fd et les Plectrovirus. Ces phages traversent l'enveloppe de l'hôte qui survit à l'infection [MANILOFF *et al.* (190)]. La libération par bourgeonnement ne se rencontre que chez les Plasmavirus. Là encore, la cellule-hôte ne se lyse pas et survit à l'infection pendant plusieurs générations [MARVIN et HOHN (194)].

#### F. - La lysogénie - Le cycle tempéré

Le terme "lysogénie" fut employé pour la première fois en 1921 par BORDET et CIUCA (40) pour décrire des bactéries qui, en l'absence d'infection, avaient le pouvoir héréditaire de libérer des bactériophages capables de lyser d'autres bactéries. A cette époque, le mécanisme de ce comportement ne fut pas compris. En 1929, BURNET et McKIE (58) attribuent la lysogénie à la présence dans chaque bactérie d'un principe lytique, constitutif du matériel génétique, capable d'être libéré sous forme de phage. Cependant, ils ne comprennent pas comment la libération se déroule.

En 1950, les travaux de LWOFF et GUTMANN (188) aboutissent à la compréhension du phénomène. Ils attribuent la lysogénie à la présence d'un "probactériophage" (prophage en abrégé) dans le génome bactérien pouvant se transmettre chez les bactéries filles sans lyse de celles-ci. Ils démontrent également que le prophage peut être "activé" et causer la lyse de la bactérie. Une telle bactérie est appelée lysogène. Elle est immune vis-à-vis de toute infection par un phage homologue. Dans certains cas, elle a acquis des propriétés particulières qui subsisteront tant que le prophage sera présent dans le génome. Cet équilibre entre la bactérie et son parasite peut se



maintenir indéfiniment, se briser spontanément ou se rompre sous l'action d'agents inducteurs (en général des agents mutagènes) comme le rayonnement ultra-violet ou la mitomycine C. Jusqu'à maintenant, seuls les phages caudés à ADN bicaténaire sont concernés par ce phénomène [ACKERMANN et DUBOW (5)]. La lysogénie est extrêmement fréquente dans le monde bactérien mais varie de façon considérable d'une espèce bactérienne à l'autre, d'une souche à l'autre mais également d'un sérotype à l'autre [ACKERMANN et DUBOW (5)]. Certaines bactéries peuvent posséder plusieurs prophages ; elle sont dites polylysogènes. Dans ce cas, ce sont des souches plus fragiles car plus sensibles aux rayons ultra-violets. Une bactérie lysogène peut être curée de son prophage par traitement à l'acridine orange, sa descendance perd alors son immunité.

La figure 8 représente schématiquement les deux cycles lytiques et tempérés montrant les relations existant entre eux.

### G. - Les utilisations pratiques des phages

L'utilisation pratique des phages présente plusieurs volets. Les phages ont été ou sont encore employés au diagnostic de certaines maladies infectieuses. Nous citerons l'utilisation du phage 01 permettant de déterminer les Salmonelles humaines ou animales. Avant l'apparition des antibiotiques et des sulfamides, les phages furent également employés en thérapeutique des maladies infectieuses, en particulier des septicémies staphylococciques. De nos jours, on assiste à un renouveau de la thérapie par les phages, conséquence de l'apparition de plus en plus fréquente de mutants résistants aux antibiotiques [ACKERMANN et DUBOW (5)]. L'utilisation pratique majeure des phages reste cependant leur emploi au typage phagique ou lysotypie.

#### I - La lysotypie

La lysotypie est la subdivision des différentes bactéries par les phages. Les premiers travaux sur ce sujet remontent à la présentation par CRAIGIE et YEN (77) d'un système de typage phagique réalisé à partir de quatre phages spécifiques de l'antigène Vi de **Salmonella typhi**. La plupart des schémas de lysotypie utilisés actuellement sont réalisés par rapport aux bactéries

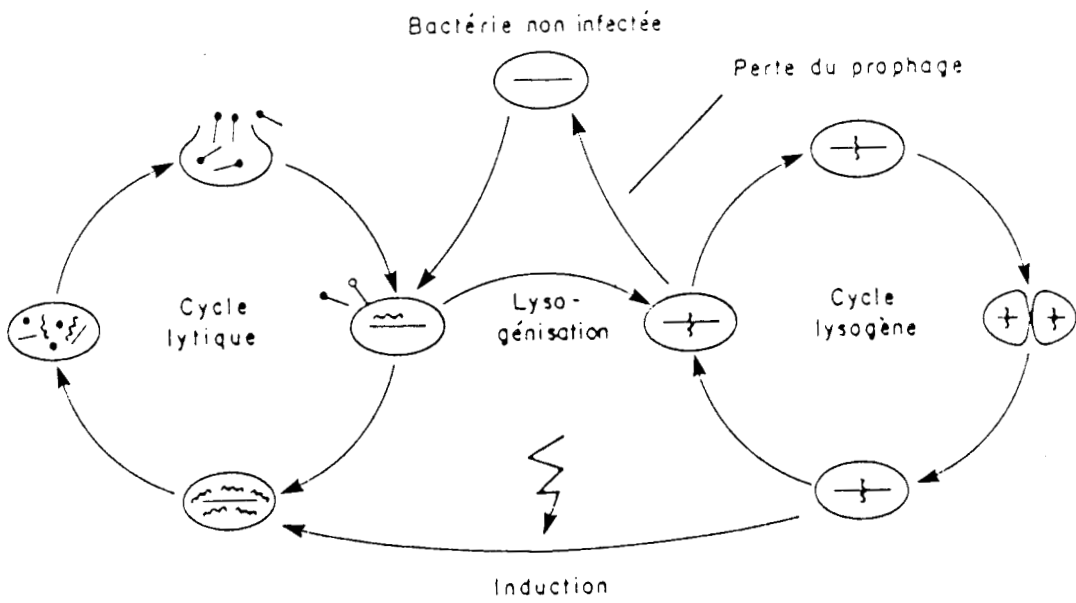


Figure 8 - Schéma des cycles lytique et lysogène, d'après ACKERMANN (5).

d'importance médicale telles que *S. typhi*, *S. paratyphi B* et *Staphylococcus aureus* [KASATIYA et NICOLLE (147), ACKERMANN et DUBOW (5)]. Chez *Rhizobium*, les phages sont également utilisés non seulement pour distinguer entre-elles les bactéries infectant les différentes Légumineuses mais également au sein d'une même espèce pour en séparer les différents biotypes, sérotypes ou mutants [GERRETSEN **et al.** (114), LAIRD (170), KLECZKOWSKA (157), STANIEVSKI **et al.** (252), STANIEVSKI (248), STANIEWSKI **et al.** (250), STANIEWSKI et KOWALSKA (251), STANIEWSKI (249), LESLEY (175), LINDSTROM **et al.** (179)]. Pour tous les schémas de lysotypie, les bactéries et les phages sont utilisés dans des conditions bien particulières, standardisées au maximum, afin d'assurer une reproductibilité la plus fiable possible. Nous présenterons, dans la suite de ce travail, les conditions que nous avons employées pour réaliser la spécificité d'hôte de nos phages.

Les bactériophages peuvent, malheureusement, se révéler être aussi de redoutables contaminants.

## **2 - La contamination phagique au cours des fermentations industrielles**

Le développement de plus en plus rapide des biotechnologies amène à la multiplication des fermentations les plus diverses. Des produits aussi différents que les antibiotiques, les solvants, les acides aminés, etc... ainsi que la production d'aliments fermentés ou d'inoculum divers sont obtenus à partir de microorganismes produits en masse ou grâce à la participation de ceux-ci. La lyse par les phages soulève et cause de graves problèmes technologiques et économiques. Aucune fermentation industrielle de bactéries n'est à l'abri de l'attaque des phages qui montrent des propriétés d'adaptation remarquables [WERQUIN **et al.** (280), DEFIVES et WERQUIN (91)]. Ce problème est particulièrement sensible dans les industries laitières où l'on rapporte que 98 p100 des défauts de fabrication sont dus aux phages [MOSELEY et WINSLOW (201)]. Dans ces industries, le phénomène est tellement présent que l'on effectue des rotations journalières de souches.

Le phage infectant peut provenir soit du milieu extérieur (air, eau, récipients mal stérilisés, mauvaise manipulation) mais également de bactéries lysogènes

ou pseudolysogènes (phénomène très fréquent chez les streptocoques lactiques, par exemple). Ce problème grave et coûteux de l'infection phagique amène à renforcer et à mieux faire respecter les règles d'hygiène en particulier lors de l'élaboration des pieds de cuve. L'utilisation d'inhibiteurs de la multiplication phagique tels que les chélateurs (qui agissent en bloquant les ions bivalents, indispensables à l'adsorption de certains phages), les tensio-actifs et les antibiotiques, en particulier la chloromycétine, ont été envisagés [OGATA (207)]. Actuellement, on s'oriente vers des solutions plus génétiques, à savoir l'utilisation de souches bactériennes rendues résistantes grâce à des manipulations de génie génétique, en particulier celles qui consistent à introduire dans le microorganisme des plasmides de résistance.

#### H. - Le point sur les bactériophages du genre *Rhizobium*

La mise en évidence de bactériophages dans le sol remonte à 1932 avec les travaux de LAIRD (170). Plus tard, DEMOLON et DUNEZ (94) montrent que des phages spécifiques des bactéries de nodules de luzerne sont présents dans les nodules racinaires, les racines et les tiges de vieux plants de luzerne. Ces phages sont également retrouvés dans le sol entourant les racines mais cependant à moins de 30 cm de distance de celles-ci. Ils affirment également que les phages lysent les bactéries des nodules racinaires ainsi que celles présentes dans la proche rhizosphère. Les phages interfèreraient ainsi avec le déroulement de la nodulation, la fixation de l'azote atmosphérique et le développement normal des plantes croissant dans des sols déficients en azote. Pour ces deux auteurs, la fatigue des luzernières doit être imputée aux bactériophages. En 1936, VANDECAVEYE et KATZNELSON (266) montrent également que les phages et les **Rhizobia** cohabitent dans les nodules racinaires d'**Alfalfa**. Cependant et comme pour souligner la complexité du phénomène, GRIJNS en 1927 (121) et LAIRD en 1932 (170) montrent que les bactériophages des **Rhizobia** spécifiques du trèfle n'ont aucun effet sur la nodulation, la fixation de l'azote et la croissance chez cette plante. KLECZKOWSKA, en 1957 (147), étudiant la destruction et les effets des bactériophages spécifiques des bactéries des nodules racinaires, arrive aux mêmes conclusions que les auteurs précédents. Ses résultats révèlent cependant que l'on ne peut pas faire de distinction entre les phages lysant les **Rhizobia** du pois et du trèfle, ceux-ci lysant indifféremment les bactéries de ces 2 groupes d'inoculation. Par contre, les **Rhizobia** des groupes d'inoculation luzerne, lupin ou soja ne sont pas lysés.

## 1 - Les phages et les éléments nutritifs présents dans le sol

La présence et la persistance, plus ou moins marquées des phages dans les sols, seraient en relation avec la présence ou l'absence d'éléments nutritifs.

Des expériences menées sur sols artificiels (vermiculite) montrent, en effet, que les phages et les bactéries ajoutés peuvent cohabiter pourvu qu'aucun élément nutritif ne soit ajouté. Certaines bactéries acquièrent la résistance aux phages mais les bactéries sensibles aux phages ne semblent pas être fortement lysées. Les phages détruisent les bactéries sensibles et épargnent les mutants résistants dès que les éléments nutritifs sont ajoutés au milieu et que la croissance bactérienne reprend.

Le maintien des bactéries sensibles en présence des phages est donc étroitement lié à la valeur nutritive du milieu.

## 2 - Les phages et la culture des Légumineuses

Des phages de **Rhizobium** peuvent être détectés dans des sols n'ayant jamais porté de culture de Légumineuses. Les travaux de DHAR **et al.** (98) montrent que des rhizobiophages sont détectés dans les 30 sols Indiens étudiés, à des taux très différents d'un sol à l'autre. Apparemment, le maintien d'un phage spécifique à une souche et le titre phagique ne sont pas en relation avec la persistance de la culture de la Légumineuse. Ces résultats contredisent ceux de VINCENT (268). Des phages sont détectés dans sept sols de rizière montrant que des rhizobiophages peuvent être présents dans des sols cultivés par d'autres plantes que les Légumineuses. Cette fois, se sont les travaux de GOLEBIOWSKA **et al.** (116) qui sont contredits.

## 3 - Le nombre de phages présente des fluctuations très marquées selon les saisons

En Inde, au cours des mois secs et chauds ainsi qu'au début de la mousson, les titres phagiques sont peu élevés. Ils augmentent à partir d'octobre pour atteindre un maximum en décembre-janvier [DHAR **et al.** (97)]. Ils démontrent que cette population représente des phages sensibles à la température qui seront rapidement détruits durant les mois chauds de l'été. Le nombre de

phages est en corrélation étroite avec la population de **Rhizobium leguminosarum**. Le nombre de **Rhizobia** décroît brusquement jusqu'à devenir nul durant les mois les plus chauds, d'avril à juin, quand l'humidité du sol se situe entre 3,2 et 5,3 p100.

#### 4 - Les phages présents dans la rhizosphère participent à l'installation de mutants inefficients

En 1980, BARNET (24) étudie *in vitro* le comportement de deux souches de **Rhizobium trifolii** (SU91 et SU36) sensibles à deux phages spécifiques (CT3 et CT4). La résistance à la streptomycine et/ou à la kanamycine est utilisée comme marqueur de ces souches. Chaque souche est employée seule ou jumelée avec une souche de **Trifolium subterraneum** résistante aux phages jouant le rôle de compétiteur. De ces travaux, il ressort que lorsque les souches de **R. trifolii** sont utilisées seules, l'addition de phages ne produit aucun effet significatif sur le nombre total de bactéries, la nodulation et le poids sec des plantes.

Cependant, lorsque les phages sont ajoutés à une population mixte, on assiste à une diminution nette du nombre des bactéries sensibles aux phages fréquemment associée à une augmentation du nombre des résistants. On note également une augmentation du nombre des mutants inefficients. Cependant, les poids secs et le nombre de nodules ne sont pas modifiés. Ce phénomène est probablement dû au fait que le nombre de bactéries efficaces est suffisant au début de l'expérience pour entraîner la formation d'un nombre convenable de nodules fixateurs d'azote.

#### 5 - Les populations bactériennes et phagiques présentent des fluctuations en fonction de la composition des sols

LAWSON *et al.* (172) étudient pendant une période de deux ans l'influence de deux sols sur des populations de **Rhizobium leguminosarum** biovar **trifolii** et de leurs phages. Le nombre de **Rhizobia** présente une corrélation significative et positive avec l'ensoleillement et la taille de la plante ; phénomène normal étant donné que les exsudats racinaires sont la source majeure d'éléments nutritifs et que leur quantité est en relation directe avec l'activité photosynthétique [BOWEN (45)]. Par contre, une telle relation n'existe pas

avec les températures moyennes, les précipitations, la structure et le type de sol.

En ce qui concerne les phages, leur nombre est en corrélation significative et positive avec la structure du sol et la taille de la plante. On note une réduction du nombre de phages dans le sol gras argileux par rapport au sol sableux gras ; les particules d'argile colloïdale pouvant adsorber les phages [BITTON (37)] et en même temps protéger les bactéries sensibles de l'attaque phagique par blocage des structures de surface [ROPER et MARSHALL (225)].

Comme on peut le constater, lorsque l'on fait une étude bibliographique, peu de travaux sur le rôle des phages dans le sol sont disponibles. Ceci souligne la complexité du phénomène.

#### 6 - Les phages de Rhizobium actuellement décrits

Un certain nombre de phages de **Rhizobium** ont été isolés de sols de nombreux pays, de nodules racinaires ou encore obtenus à partir de souches bactériennes lysogènes. A l'heure actuelle, 14 espèces de phages de **Rhizobium**, y compris ceux du **Rhizobium** infectant **Galega officinalis**, ont été observés et décrits. Ces phages seront proposés prochainement à l'"International Committee on Taxonomy of Viruses" (I.T.C.V.) pour y être reconnus en tant qu'espèces types.

Nous présentons dans le tableau 6 suivant ces 14 espèces auxquelles nous avons adjoint les phages du **Rhizobium** du "cowpea group" et de **Bradyrhizobium japonicum** décrits jusqu'ici.

Hôte bactérien	Morphotypes	Espèces phagiques types	Références bibliographiques
<i>R. leguminosarum</i>	B1 B1 B1	317 (RL1 ≈ NT2) <sup>(a)</sup> (RL2 ≈ 317) <sup>(a)</sup>	LEY <b>et al.</b> (176) DHAR <b>et al.</b> (96) DHAR <b>et al.</b> (98) (97)
<i>R. loti</i>	C1	φ 2042	PATEL (213)
<i>R. lupini</i>	B1 B3	16-6-12 7-7-7	LURZ <b>et al.</b> (186) LOTZ et MAYER (181) (182), LOTZ et PFISTER (183)
<i>R. meliloti</i>	C1 B1 B2  A1 B1	2 5 φ 2037/1  CM1 NM1	RAUTENSTEIN et MOSKALENKO (219), MARANTZ <b>et al.</b> (192), KHADGI-MURAT <b>et al.</b> (152)  KRSMANOVIC-SIMIC et WERQUIN (166), WERQUIN <b>et al.</b> (281) (276) (277)
<i>R. phaseoli</i>	A2		KHADGI-MURAT <b>et al.</b> (152), MOSKALENKO et RAUTENSTEIN (202) ; (phages de type T-pair non encore multipliés)
<i>R. trifolii</i>	A1 B1  A1	WT1, CT4 NT2  m	BARNET (23), ATKINS (14) (15)  ZAJAC et LORKIEWICK (295)
<i>Galega rhizobium</i>	A1	φ gal-1/R	LINDSTROM <b>et al.</b> (179)
<i>Cowpea Rhizobium</i>	A1 B1	RS1 RS2	SINGH <b>et al.</b> (244)
<i>B. japonicum</i>	A2  C1	TN1 (ref. Stacey)	KOWALSKI <b>et al.</b> (165), DOCTOR et MODI (100), STACEY <b>et al.</b> (247), HASHEM <b>et al.</b> (127) WERQUIN <b>et al.</b> (278)

Tableau 6 - Les bactériophages de *Rhizobium*, de *Bradyrhizobium* et du *Rhizobium* du "Cowpea group". Espèces phagiques types actuellement décrites.



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

L'importance de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique n'est plus à démontrer. Selon des estimations réalisées par WITTEWER (288), elle permettrait aux Etats-Unis une économie de quelques 3,3 billions de dollars par an. Les 79 p100 de l'air qui nous entoure, représentent une source d'azote inépuisable, renouvelable et non polluante contrairement aux engrais chimiques dont l'utilisation intensive produit les nombreux inconvénients que l'on connaît. Accomplie dans sa quasi-totalité par les bactéries des genres **Rhizobium** et **Bradyrhizobium** en symbiose avec les Légumineuses, la fixation de l'azote doit son efficacité à l'aboutissement heureux de nombreux mécanismes physiques et biochimiques intervenant entre la plante, la bactérie, la rhizosphère, le sol, etc... Au niveau de la rhizosphère, des phénomènes de compétition interviennent entre les **Rhizobium** eux-mêmes, les microorganismes indigènes et leurs prédateurs naturels que sont les protozoaires et les bactériophages.

L'ensemble des chercheurs du Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois travaille sur **Rhizobium** et **Bradyrhizobium** dans les différents domaines : génétique, biochimique, taxonomique, relation bactérie-végétal et leurs applications. Au sein de ce Laboratoire, nous animons avec Monsieur Claude DEFIVES un groupe de recherche s'intéressant plus particulièrement aux bactériophages de **Rhizobium**.

Le travail de Thèse, présenté ici, porte sur la multiplication, la morphologie et la classification de bactériophages de **R. meliloti** isolés du sol du Nord de la France ou obtenus à partir de souches lysogènes de notre collection. Notre contribution entre dans le cadre d'études préalables à l'utilisation des bactériophages en recherches fondamentales et appliquées.

# CHAPITRE I

## MATERIEL ET METHODES

## I. - LES SOUCHES BACTERIENNES

### A. - Obtention et origine

#### 1 - Isolement des Rhizobium meliloti à partir de nodules de Luzerne (Medicago sativa L.)

L'isolement de **Rhizobium** à partir des Légumineuses indigènes est la méthode la plus efficace pour obtenir beaucoup de souches sauvages différentes et constituer une collection.

La technique classique d'isolement de souches de **Rhizobium** à partir de nodosités est la suivante :

1. les nodules sont sectionnés en prenant soin de ménager des morceaux de racines de part et d'autre de ceux-ci, lavés à l'eau courante afin d'éliminer les particules de terre puis séchés entre deux papiers filtre ;
2. les nodules sont désinfectés pendant 5 min dans une solution d' $\text{HgCl}_2$  à 2,5 p1000 additionnée de Teepol (0,5 p100) puis lavés huit fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace de désinfectant ;
3. chaque nodosité est transférée dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 8,5 p1000 dans l'eau distillée) puis écrasée consciencieusement à l'aide d'un agitateur stérile ;
4. le broyat estensemencé à l'ose sur du milieu de WRIGHT (291) gélosé à 15 p1000.

Les colonies de **Rhizobium** apparaissent au bout de 4 à 8 jours d'incubation à 30°C.

#### 2 - Nodulation de R. meliloti in vitro

L'appartenance d'une souche sauvage au genre **Rhizobium** se détermine par le test de nodulation **in vitro** en conditions aseptiques. Les graines de luzerne (**Medicago sativa**) sont désinfectées, mises à germer stérilement sur milieu

solide de WRIGHT pendant 2 à 4 jours à 30°C jusqu'à l'apparition des radicules. Les plantules sont alors transférées dans des tubes de 20 mm x 200 mm renfermant du milieu de NICOL et THORNTON (205) gélosé à 12 p1000 et dépourvu d'azote. Les plantules, utilisées comme témoins non inoculés, sont cultivées sur le même milieu complet. Une plantule par tube est déposée délicatement à l'aide d'une öse sur la partie supérieure de la tranche du milieu gélosé. Les tubes sont placés en serre à 20°C et à 80 p100 d'humidité. La phase diurne est de 16 heures.

Dès l'apparition des racines secondaires (soit pour la luzerne au bout d'une semaine en moyenne), les plantules sont contaminées par une suspension de **R. meliloti** en tampon de non prolifération (TNP), titrant environ  $10^8$  cellules bactériennes par ml et replacées en serre. Les nodosités se développent habituellement en 3 ou 4 semaines attestant l'appartenance de la bactérie au genre **R. meliloti**. Ce test n'est bien entendu valable que pour les souches sauvages. En effet, il existe certains mutants qui ont perdu leur infectivité et qui sont dits nod<sup>-</sup>. Dans leur cas, l'appartenance au genre **Rhizobium** ne peut se faire que par la mise en évidence de marqueurs génétiques et leur comparaison avec ceux de la souche sauvage.

### 3 - Nomenclature

En ce qui concerne les souches de **Rhizobium meliloti** de notre laboratoire, la nomenclature suivante a été adoptée : M pour **meliloti** ; S pour sauvage. La souche M5N1 correspond à un clone non muqueux de la souche M5S lorsqu'il est cultivé sur milieu RC [DELATTRE (93)] contenant du glucose  $55 \times 10^{-3}$  M.

### 4 - Souches bactériennes utilisées

Cf. tableau 7 ci-après.

---

N.B. Pour éviter les contaminations par les champignons, il est possible d'ajouter au milieu de WRIGHT de l'actidione (cycloheximide) à la concentration finale de 2 mg p100.

Souches de <i>Rhizobium meliloti</i>	Source
A16, FMI, LBI, LS2A, LS5B, LS18, TU20, VE26	Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France
A145, A161	Rijksdienst voor de Ijsselmeer Polders, Kampen, Netherlands
E12, MVII-1	University of Bielefeld, Section Biology IV (Genetics), Bielefeld 1, GFR
L 5-30	Department of General Microbiology, Marie Curie Skłodowska University, Lublin, Poland
M5N1, M2S, M3S, M5S, M9S, M10S, M11S, M12S, M13S, M14S, M15S, M18S, M19S, M20S, M22S, M23S, M26S, M27S, M28S, M29S	Institut Agricole et Alimentaire de Lille, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
M31, M1-5	Station Agronomique de Gembloux, Gembloux, Belgique
Rh21	Centro Nacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia
U45	Division of Plant Industry, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Canberra, Australia
Wu498, Wu499	Institute of Agriculture, University of Western Australia, Nedlands, Western Australia
444	Institut de Cytologie et de Biologie cellulaire, U.E.R. Luminy, Marseille, France
2001, 2003, 2004, 2009, 2011	Rothamsted Collection of <i>Rhizobium</i> , Harpenden, Hertfordshire, United Kingdom
102F 34	Department of Microbiology, University of California at San Diego, La Jolla, Calif., U.S.A.

Autres souches utilisées	Source
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> : 3.55, J5, 3.14, 3.15b3, 3.2, 3.30, J68	Institut Agricole et Alimentaire de Lille, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France
<i>Rhizobium loti</i> <i>Rhizobium galega</i> 1 <i>Rhizobium galega</i> 2	Centre de Référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle, Département de Microbiologie, Université Laval, Québec, G1K 7P4, Canada
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	"

Toutes les souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* sont capables d'assimiler l'azote atmosphérique en symbiose avec des plantules aseptiques de leur légumineuse-hôte.

Tableau 7 - Souches bactériennes utilisées et leur origine

## B. - Conditions de culture

Les bactéries sont cultivées en milieu RC fructosé à 1 p100 en aérobiose à 30°C sous agitation. Pour les expériences d'induction, le milieu TY de BERINGER (36) est employé dans les mêmes conditions de température et d'agitation.

## C. - Conservation des bactéries

Lorsque les bactéries sont utilisées fréquemment, leur conservation est assurée à + 4°C sur milieu RC gélosé incliné. Le repiquage s'effectue tous les mois. Pour des conservations plus longues, ces souches sont placées en milieu RC liquide fructosé additionné de glycérol (10 p100 final) et stockées à - 20°C. Dans ce cas, les bactéries sont repiquées tous les 6 mois. Périodiquement des contrôles de pureté sur milieu RC gélosé et de nodulation *in vitro* sont effectués.

## II. - LES BACTERIOPHAGES

### A. - Obtention et origine des bactériophages

Tous les bactériophages étudiés dans ce travail ont été isolés par nos soins et font partie de la collection du Laboratoire de Microbiologie. Ils proviennent soit du sol de champs de luzerne, soit de souches lysogènes de **R. meliloti** isolées de nodules de luzerne. Un certain nombre d'entre-eux sont répertoriés au Centre de Référence pour virus bactériens "Félix d'Hérelle" à l'Université Laval de Québec (Canada)..

#### 1 - **Isolement des bactériophages à partir d'échantillons de terre** [BARNET (23)]

Des échantillons de terre de 5 g sont prélevés au niveau de la proche rhizosphère de pieds de luzerne. Parallèlement, les nodules présents sur les racines sont sectionnés et écrasés dans 1 ml de sérum physiologique stérile. L'ensemble est placé dans 10 ml de milieu RC fructosé à 1 p100 et laissé en agitation à 30°C pendant une nuit. La suspension est alors additionnée de 1 ml

de chloroforme et remise en agitation pendant deux heures afin de détruire le maximum de bactéries. L'échantillon est alors centrifugé à 12 000 t/min pendant 20 min (centrifugeuse Beckman J2-21 - Rotor JA.20) et le surnageant obtenu filtré sur filtre Millipore 0,40 µm (Millipore Corp. Bedford Mass.). La présence éventuelle de phages dans le filtrat est établie en employant la technique de la double couche selon ADAMS (9).

Des échantillons de 0,3 ml de culture de **R. meliloti**, en phase exponentielle de croissance (milieu RC fructosé à 1 p100), sont portés dans 3 ml de gélose bactériophage maintenue en suspension à 45°C et coulés immédiatement à la surface du milieu RC gélosé fructosé à 1 p100 en boîte de Petri. Après solidification, des échantillons de filtrats d'un volume de l'ordre de 0,1 ml sont déposés à la surface de la double couche. Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 30°C et observées périodiquement. La présence de phages se traduit par l'apparition de plages de lyse plus ou moins étendues et plus ou moins claires. Toutes les plages différentes sont répertoriées et purifiées par trois repiquages successifs à partir d'une plage unique sur la souche de **R. meliloti** sensible correspondante. Lorsque l'on est sûr de la pureté de la suspension phagique (plages d'aspect parfaitement homogène), on réalise un stock de phages.

## 2 - Isolement de bactériophages tempérés après traitement des bactéries par des agents mutagènes

Les bactéries lysogènes (qui possèdent un prophage) peuvent perpétuer indéfiniment cet état au cours de leurs divisions successives. Elles sont également capables de libérer spontanément ce prophage pour donner naissance à un phage. On peut accentuer ce phénomène par l'utilisation d'agents physiques ou chimiques appelés inducteurs. Nous citerons les plus utilisés : les radiations ultraviolettes (UV) ou les rayons X [L WOFF (187)] ainsi que des composés chimiques à action mutagène puissante telles que la mitomycine C (MC) [OTSUJI (208)] ou la N-méthyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) [SHAPIRO (239)].

a) A la mitomycine C (tableau 8)

Des cultures de **R. meliloti** en milieu TY sont soumises à l'action de la mitomycine C à des doses comprises entre 0,1 et 10 µg/ml. Une étude de l'évolution de la turbidité d'une culture d'une souche de **R. meliloti** M5N1 montre une lyse visible de la culture bactérienne à partir d'une dose de MC de 1 µg/ml appliquée pendant 4 heures. Pour des concentrations en MC supérieures, la chute de la turbidité n'est pas due uniquement à la lyse bactérienne provoquée par la libération de phages mais également à une lyse bactérienne engendrée par l'action létale de la MC sur la culture bactérienne [HASSANI (128)]. Les souches bactériennes de notre collection sont soumises à la MC à une concentration de 1 µg/ml pendant 4 heures. Après deux lavages successifs dans le milieu TY, les bactéries sont remises en culture dans le même milieu à 30°C pendant 15 heures. La culture est ensuite centrifugée et le surnageant filtré sur membrane Millipore 0,22 ou 0,45 µm. Le filtrat est déposé en spot sur les souches réceptrices (les souches jouent simultanément le rôle de souche induite et de souche réceptrice).

		Temps en heures						
		0	1	2	3	4	5	6
Concentration en MC µg/ml	0,0	0,2	0,23	0,29	0,33	0,45	0,53	0,65
	0,1	0,2	0,23	0,30	0,33	0,42	0,50	0,57
	0,5	0,2	0,23	0,27	0,31	0,43	0,49	0,48
	1,0	0,2	0,23	0,27	0,32	0,40	0,23	0,18
	5,0	0,2	0,23	0,27	0,31	0,34	0,25	0,23
	10,0	0,2	0,23	0,25	0,29	0,27	0,28	0,25

Tableau 8 - Evolution de la densité optique d'une culture de la souche lysogène M5N1 en fonction du temps en présence de différentes concentrations en mitomycine C.



### b) Aux rayons ultraviolets

Toutes les souches de **R. meliloti** en notre possession ont été soumises à l'action des UV.

Des boîtes de Petri contenant 10 ml de culture de **R. meliloti** en milieu TY (D.O. de 0,2 à 600 nm) ont été exposées à des doses d'UV de 85 ergs/mm<sup>2</sup>/sec (Lampe Germicide Mazda, puissance 15 W) pendant des temps variant de 4 à 20 sec. Nous avons déterminé, en collaboration avec HASSANI (128), que la durée d'exposition la plus efficace se situait à 6 sec. Après incubation à l'obscurité (pour éviter la photoréactivation) à 30°C pendant 15 heures, les cultures sont centrifugées pendant 15 min à 12 000 t/min, filtrées et déposées en spot sur les souches réceptrices.

### c) A la N-Méthyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine

A 5 ml d'une culture de **R. meliloti** en milieu TY, de D.O. 0,3, on ajoute 1 ml d'une solution de NTG dans du tampon Tris-maléique (600 µg de NTG par ml de tampon Tris 90 mM, acide maléique 50 mM ; pH 6,65). L'ensemble est incubé à 30°C pendant 30 min. La culture est ensuite traitée de la même façon que pour l'induction par la mitomycine C.

Contrairement à son pouvoir inducteur de phages mis en évidence chez les bactéries glutamiques par SHAPIRO (239), la NTG s'est révélée inefficace vis-à-vis des souches de **R. meliloti** de notre collection. Son action inductrice est nulle même sur les souches s'étant révélées lysogènes par traitement aux UV ou à la MC.

## 3 - Nomenclature

Les bactériophages isolés du sol sont désignés comme suit : la première lettre fait référence à une propriété ou à l'aspect de la queue du phage : C pour contractile, N pour non contractile, M pour petite queue (Minus) ; la deuxième lettre M pour **meliloti**. Pour les phages de la série MM, C pour plage claire et H pour plage avec un halo.

Quant aux bactériophages tempérés, ils sont désignés par le nom de la souche dont ils sont issus précédé de la lettre  $\Phi$  selon la nomenclature proposée par JARVIS (138).

#### 4 - Les bactériophages utilisés

Le tableau 9 suivant présente les phages utilisés dans ce travail ainsi que leurs souches propagatrices.

Souches propagatrices	Phages isolés du sol (a)	Phages provenant de souches lysogènes (b)
L5-30		$\Phi$ A161, $\Phi$ 2011, $\Phi$ M1-5
M3S		$\Phi$ M5N1, $\Phi$ M14S
M5S		$\Phi$ LS5B
M9S	NM1, NM2, NM6, NM7	$\Phi$ M20S
M11S	CM2, CM6, NM3, NM4, NM8, NM9	
M12S	CM1, CM3	
M13S	CM4, CM9	$\Phi$ M27S
M14S	CM7, CM8, MM1C, MM1H	
M18S	CM5, CM20, CM21	
M22S		$\Phi$ FM1
444		$\Phi$ M11S, $\Phi$ M23S, $\Phi$ M26S

Tableau 9 - Les bactériophages et leurs souches propagatrices.

- (a) Les phages CM2, CM6, CM9, NM3, NM4, NM8 et NM9 ont été étudiés par nous-mêmes sous les synonymes de  $\Phi$  9,  $\Phi$  12,  $\Phi$  11,  $\Phi$  5t,  $\Phi$  6,  $\Phi$  4 et  $\Phi$  7 respectivement. [WERQUIN **et al.** (281)].
- (b) Phages obtenus par induction par les UV sauf les phages  $\Phi$  M20S,  $\Phi$  M26S et  $\Phi$  M5N1 obtenus après induction à la mitomycine C.

## B. - Conditions d'obtention des bactériophages

### 1 - Réalisation d'un stock de phages [ADAMS (9)]

0,3 ml d'une culture de **R. meliloti** en phase exponentielle de croissance est infecté à partir d'une plage de lyse. Pour cela, il suffit d'effleurer une plage de lyse avec un fil ensemeur fin et de le rincer dans la suspension bactérienne. Le mélange est laissé à 20°C sans agitation pendant 20 min pour permettre au phage de s'adsorber convenablement sur la bactérie, puis porté dans la gélose bactériophage et coulé comme précédemment. Un témoin sans phage est réalisé dans les mêmes conditions. Le tout est placé à 30°C pendant une nuit. L'observation des deux boîtes de Petri montre un tapis bactérien continu sur la boîte témoin sans phage et la présence d'un nombre plus ou moins important de plages de lyse sur l'autre boîte. Dans le cas de phages montrant des plages de lyse particulièrement grandes ou lorsqu'on a eu la chance de prélever beaucoup de phages dans la plage de lyse, on peut obtenir au premier essai une lyse confluyente se traduisant par l'absence totale de bactéries sur la boîte. Que ce soit dans un cas ou dans l'autre, on répète l'opération plusieurs fois pour obtenir le stock de phages définitif. Pour cela, la double couche contenant les phages et les bactéries lysées est prélevée, portée dans un tube, centrifugée et le surnageant filtré comme précédemment. La suspension phagique est alors divisée en aliquots de 0,1 ml, mis en présence de 0,3 ml de bactérie, coulés en double couche, etc... On obtient après deux opérations de ce genre une suspension phagique d'environ 20 ml, exempte de bactéries.

### 2 - Numération d'un stock de phages [ADAMS (9)]

Il s'agit de déterminer le nombre de phages présents dans la suspension. La suspension phagique obtenue précédemment est diluée dans du milieu RC jusqu'à  $10^{-8}$ . Des aliquots de 0,1 ml des dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  sont mis en contact avec 0,3 ml d'une culture de **R. meliloti** (3 opérations par dilution). L'ensemble est traité comme décrit plus haut. On réalise un témoin sans phage. Les plages de lyse (qui correspondent, à l'origine, à une seule particule phagique) sont comptées. Le titre de la suspension phagique est obtenu en multipliant le nombre de plages par 10 fois la dilution. Il sera

exprimé en nombre de particules phagiques infectieuses par millilitre encore appelées unités formant plages ou UFP.

### C. - Conservation des bactériophages

Nous avons utilisé essentiellement deux modes de conservation.

1 - Lorsque les phages sont utilisés souvent, ils sont conservés en milieu RC à + 4°C à l'état de lysats filtrés sur membrane Millipore de porosité 0,22 µm. A intervalles réguliers, tous les 2 mois environ, les stocks de phages sont renouvelés.

2 - Pour les conservations plus longues de une à plusieurs années, les stocks sont conservés à - 20°C sous forme de lysats filtrés glycérolés à 50 p100 (V/V). A cette concentration en glycérol, la suspension phagique ne se solidifie pas, ce qui évite l'éclatement des têtes de phages.

Dans ces deux conditions, les phages de **R. meliloti** se conservent de façon satisfaisante. En effet, nous avons noté à + 4°C une perte d'environ une puissance de 10 par mois et de une puissance de 10 par an dans le cas de la conservation en milieu glycérolé à 50 p100.

## III. - MILIEUX DE CULTURE

### A. - Pour la culture des bactéries et la prolifération des phages

#### 1 - Le milieu RC de LAIRD (170), modifié par DELATTRE (93)

- |   |     |       |
|---|-----|-------|
| - MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O ..... | 0,2 | g     |
| - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....       | 1,0 | g     |
| - Extrait de levure .....                     | 1,0 | g     |
| - ED - QSP .....                              | 1   | litre |
| - pH 7,2 à 7,5                                |     |       |
| - Stérilisation 121°C, 20 min                 |     |       |

Lorsque ce milieu est utilisé solide, il est gélosé à 15 p1000. Ce milieu sera complété extemporanément par une source de carbone, en l'occurrence du fructose [HORNEZ *et al.* (134)] pour obtenir une concentration finale de 1 p100. Dans ce cas, on utilise une solution de fructose 40 p100, stérilisée à 105°C pendant 20 min. Lorsque ce milieu est employé pour la production de bactériophages, il est suppléé en  $\text{CaCl}_2$   $4 \times 10^{-4}$  M et  $\text{MgCl}_2$   $5 \times 10^{-4}$  M [WERQUIN *et al.* (281)].

## 2 - Le milieu TY de BERINGER (36)

- $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,88 g
- Tryptone Difco ..... 5,00 g
- Extrait de levure ..... 3,00 g
- ED - QSP ..... 1 litre
- pH 7,2 à 7,5
- Stérilisation 121°C, 20 min

## 3 - Gélose bactériophage à 7,5 p1000 d'agar utilisée pour la confection des stocks et la numération des phages [KRSMANOVIC-SIMIC *et* WERQUIN (166)]

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,45 g
- $\text{Na}_2\text{SO}_4, 10\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,06 g
- $\text{KNO}_3$  ..... 0,06 g
- $\text{FeCl}_3$  ..... 0,01 g
- $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,06 g
- $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,10 g
- Mannitol ..... 10 g
- Agar Difco ..... 7,5 g
- ED - QSP ..... 1 litre
- pH 7,2
- Stérilisation 105°C, 20 min

## B. - Utilisés pour la culture des Légumineuses

### 1 - Milieu de NICOL et THORNTON (205)

- $K_2HPO_4$ .....	0,5	g
- $MgSO_4, 7H_2O$ .....	0,2	g
- NaCl .....	0,1	g
- $FePO_4$ .....	1,0	g
- $Ca_3(PO_4)_2$ .....	2,0	g
- $FeCl_3, 6H_2O$ .....	0,01	g
- $NaNO_3$ .....	0,50	g
- ED - QSP .....	1	litre
- pH 6,8 - 7,2		
- Stérilisation 105°C, 30 min		

Pour les tests de nodulation *in vitro* des Légumineuses, ce milieu sera employé dépourvu de nitrate de sodium.

### 2 - Milieu de WRIGHT (291)

- $K_2HPO_4$ .....	0,5	g
- $MgSO_4, 7H_2O$ .....	0,2	g
- NaCl .....	0,2	g
- $CaSO_4, 7H_2O$ .....	0,1	g
- $CaCO_3$ .....	0,1	g
- Extrait de levure fraîche .....	100	ml
- Mannitol .....	10	g
- ED - QSP .....	1	litre
- pH 7,2 à 7,5		
- Stérilisation 121°C, 20 min		

L'extrait de levure fraîche est obtenu par autoclavage à 120°C pendant 20 min d'une suspension de levure fraîche de boulangerie à 10 p100 (P/V) dans l'eau distillée. La suspension est ensuite filtrée sur papier filtre jusqu'à colmatage de ce dernier. Le filtrat obtenu est jaune limpide et se conserve à température ambiante après avoir été autoclavé à 121°C pendant 20 min (communication personnelle de BRAKEL et COURTOIS).

**C. - Tampons****1 - Tampon de non prolifération (TNP) [COURTOIS (76)]**

- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,2 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ..... 1,0 g
- ED - QSP ..... 1 litre
- pH 7
- Stérilisation 121°C, 20 min

**2 - Tampon pour bactériophages [MANNASSE (191)]**

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ..... 1,42 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ..... 1,2 g
- $\text{MgSO}_4$  ..... 2,47 g
- ED - QSP ..... 1 litre
- pH 7

Le tampon est filtré sur membrane Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ .

**3 - Tampon de dialyse [WEBER et OSBORN (275)]**

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ..... 24,52 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ..... 7,01 g
- ED - QSP ..... 1 litre
- pH 7

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N S

C H A P I T R E I I

PRODUCTION DES PHAGES DE RHIZOBIUM



L'étude que nous avons réalisée sur les phages de **Rhizobium** exige la production d'une population parfois très importante de particules phagiques. C'est pourquoi, nous nous sommes d'abord intéressé aux techniques habituelles de production de phages sur milieu gélosé et en milieu liquide de faible volume. Nous nous sommes très vite rendu compte qu'elles ne nous permettaient pas d'obtenir un nombre de phages satisfaisant en particulier pour l'étude des ADN phagiques. Nous avons alors entrepris une étude physiologique et déterminé les conditions nous permettant d'obtenir une production optimale de phages en milieu liquide sous un faible volume. Ces conditions étant établies, nous les avons appliquées à la production de phages en grande quantité par la mise au point d'une technique originale de production en masse de phages de **R. meliloti**.

## I. - PRODUCTION DES PHAGES EN PETITE QUANTITE

Les bactériophages doivent être multipliés sur des bactéries en parfait état physiologique. Le mode d'obtention des phages dépend de l'usage que l'on veut en faire. Un stock de phages se fera sur boîte de Petri ou, à la rigueur, en milieu liquide mais sous un volume faible de l'ordre de quelques dizaines de millilitres.

### A. - En boîtes de Petri

Pour des manipulations ne nécessitant pas un nombre très important de phages, ou pour les produire en vue de leur conservation, la technique de la double couche selon ADAMS (9) est systématiquement employée (cf. Matériel et Méthodes). Cette technique nous a permis d'obtenir couramment des stocks contenant (à l'exception du phage  $\Phi 2011S$ ) entre  $1,2 \times 10^9$  et  $5 \times 10^{10}$  phages par millilitre (tableau 10). La technique de la double couche, pourtant très pratique, entraîne cependant une perte non négligeable de phages, ceux-ci restant emprisonnés dans la gélose et ne pouvant pas être récupérés.

### B. - En milieu liquide

L'obtention des phages en milieu liquide de petit volume reste d'un emploi restreint car les conditions optimales de culture des bactéries sont rarement

Phages isolés du sol	Titre du stock de phages (UFP/ml)	Phages isolés de souches lysogènes	Titre du stock de phages (UFP/ml)
CM1	$2,6 \times 10^{10}$	Φ2011S	$4,0 \times 10^8$
CM2	$2,6 \times 10^{10}$	Φ A161	$3,7 \times 10^9$
CM3	$4,0 \times 10^{10}$	Φ FM1	$3,6 \times 10^9$
CM4	$5,0 \times 10^{10}$	Φ LS5B	$4,5 \times 10^9$
CM5	$3,5 \times 10^{10}$	Φ M1-5	$6,0 \times 10^9$
CM6	$7,7 \times 10^9$	Φ M5N1	$5,0 \times 10^9$
CM7	$3,0 \times 10^9$	Φ M11S	$2,8 \times 10^{10}$
CM8	$3,5 \times 10^9$	Φ M14S	$8,5 \times 10^9$
CM9	$1,3 \times 10^{10}$	Φ M20S	$3,5 \times 10^9$
CM20	$3,5 \times 10^{10}$	Φ M23S	$6,5 \times 10^9$
CM21	$3,5 \times 10^9$	Φ M26S	$4,0 \times 10^9$
NM1	$4,0 \times 10^9$	Φ M27S	$1,2 \times 10^{10}$
NM2	$2,2 \times 10^9$		
NM3	$1,8 \times 10^{10}$		
NM4	$1,8 \times 10^{10}$		
NM6	$1,5 \times 10^9$		
NM7	$2,0 \times 10^9$		
NM8	$1,5 \times 10^{10}$		
NM9	$1,3 \times 10^{10}$		
MM1C	$3,5 \times 10^{10}$		
MM1H	$1,0 \times 10^9$		

Tableau 10 - Titre des stocks de phages obtenus sur milieu solide.

atteintes, le milieu restant toujours mal oxygéné. Dans ces conditions, la lyse tardant à se produire, on assiste souvent à l'apparition de mutants résistants aux phages et donc à un arrêt de la production phagique.

Que ce soit en milieu solide ou liquide, l'obtention rapide de phages permet, par simple étalement en double couche d'une dilution appropriée de chaque stock, d'observer des plages de lyse isolées donc d'en apprécier l'aspect (tableaux 11 et 12). A tout moment, on peut ainsi déceler toute modification morphologique de ces plages.

Bien que présentant quelques inconvénients (médiocre oxygénation du milieu, apparition de mutants résistants), la lyse bactérienne en milieu liquide reste la seule technique à laquelle on ait accès pour réaliser l'étude physiologique des relations bactérie-phage. Nous avons donc utilisé la culture en milieu liquide pour déterminer les meilleures conditions de l'adsorption phagique en étudiant successivement l'agitation, la multiplicité d'infection et la dépendance du couple phage-bactérie vis-à-vis d'ions bivalents.

### **C. - Application à l'étude des facteurs influençant l'adsorption**

#### **I - Rôle de l'agitation**

Les phages CM4, CM8, CM21, MM1H, NM1 et NM9, pris au hasard, ont été multipliés sur leur hôte respectif, en tube de 20/200 mm, en erlenmeyer de 300 ml ou en fiole conique de 7 ml sous des volumes respectifs de 10 ml, 50 ml et 5 ml avec une m.o.i. de l'ordre de 0,2 (1 phage pour 5 bactéries). Les lyses sont réalisées sous 3 agitations différentes : 170 balancements par minute en agitation rectiligne pour le bain-marie BIOLAFITTE ; 85 rotations par minute pour la table d'agitation GOURDON et enfin 85 mouvements angulaires par minute pour le biophotomètre BONET, HAURY et JOURDAN. Les cultures sont effectuées en milieu RC fructosé suppléé en  $\text{CaCl}_2$   $4 \times 10^{-4}$  M et  $\text{MgCl}_2$   $5 \times 10^{-4}$  M. Les résultats de ces expériences, c'est-à-dire le nombre de particules obtenues en fonction du temps de culture dans les conditions décrites ci-dessus, sont consignés dans le tableau 13.

Comme on pouvait s'y attendre, le système le plus efficace est celui faisant intervenir 85 rotations par minute en erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml

Phages isolés du sol	Aspect de la plage de lyse	Diamètre de la plage de lyse (mm)	Observations
CM1	claire	0,40 - 0,60	
CM2	claire	0,75 - 1,00	
CM3	claire	1,00 - 1,20	
CM4	claire	1,21 - 1,50	après 24 h de culture
CM5	claire	1,00 - 1,20	
CM6	claire	1,20	
CM7	claire	2,00	
CM8	claire	1,50	
CM9	claire	1,50 - 1,70	développement d'un halo après 24 h de culture
CM20	claire	0,80 - 1,00	
CM21	claire	1,00 - 1,20	
NM1	claire	2,50 - 3,00	
NM2	trouble	1,50	
NM3	claire	1,00	
NM4	claire	0,50 - 0,70	présence d'un petit halo
NM6	trouble	2,00	
NM7	claire	2,50	présence d'un halo
NM8	claire	1,00	
NM9	claire	2,00	développement d'un halo après 24 h de culture
MM1C	claire	1,00 - 1,50	halo très étroit après 24 h de culture
MM1H	claire	4,00	halo important de 1,5 mm après 24 h de culture

Tableau 11 - Aspect et dimension des plages de lyse des phages isolés du sol.

Phages isolés de bactéries lysogènes	Aspect de la plage de lyse	Diamètre de la plage de lyse (mm)	Observations
Φ 2011S	trouble à centre clair	3,00	
Φ A161	trouble	0,50	présence d'un halo qui se développe φ total de la plage plus de 2,00 mm
Φ FM1	trouble	0,20 - 0,50	
Φ LS5B	claire	0,20 - 0,50	
Φ M1-5	trouble à centre clair	2,00 - 3,00	
Φ M5N1	claire	1,50 - 2,00	
Φ M11S	claire	2,50	présence d'un halo
Φ M14S	claire	1,50 - 2,00	ressemble à Φ M5N1
Φ M20S	claire	2,50 - 3,00	présence d'un halo
Φ M23S	claire	2,50	présence d'un halo ressemble à Φ M11S
Φ M26S	trouble s'étalant en surface	2,00	présence d'un halo
Φ M27S	claire	2,00	

Tableau I2 - Aspect et dimension des plages de lyse des phages isolés de bactéries lysogènes.

Phage/hôte	UFP/ml					
	O*	Temps en heure				
		1	5	11	17	36
<b>Tube 20/200 mm</b>						
<b>170 balancements/min</b>						
CM4/M13S	$3,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$7,0 \times 10^9$	$10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$
CM8/M14S	$2,0 \times 10^6$	$10^9$	$7,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$2,9 \times 10^{10}$
CM21/M18S	$10^6$	$2,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^8$	$3,2 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$	$10^{10}$
MM1H/M14S	$1,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	$4,0 \times 10^9$	$6,0 \times 10^9$	$10^{10}$	$2,3 \times 10^{10}$
NM1/M9S	$1,5 \times 10^6$	$6,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$
NM9/M11S	$1,1 \times 10^6$	$10^7$	$3,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$10^{10}$
<b>Erlenmeyer de 300 ml</b>						
<b>85 rotations/min</b>						
CM4/M13S	$3,5 \times 10^6$	$9,5 \times 10^8$	$4,0 \times 10^9$	$3,4 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{10}$
CM8/M14S	$2,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^9$	$2,8 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^{10}$
CM21/M18S	$10^6$	$10^8$	$2,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$
MM1H/M14S	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^9$	$1,8 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^{10}$
NM1/M9S	$1,5 \times 10^6$	$9,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^9$	$4,2 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$
NM9/M11S	$1,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$	$2,3 \times 10^{10}$
<b>Fiolle conique de 7 ml</b>						
<b>85 mouvements/min</b>						
CM4/M13S	$3,5 \times 10^6$	$8,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{10}$
CM8/M14S	$2,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^{10}$
CM21/M18S	$10^6$	$2,0 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$5,0 \times 10^9$	$10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$
MM1H/M14S	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^{10}$
NM1/M9S	$1,5 \times 10^6$	$7,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{10}$
NM9/M11S	$1,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$5,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{10}$

Tableau 13 - Influence de l'agitation sur la production de phages.

de milieu. Des trois conditions réalisées ici, c'est celle qui assure une meilleure oxygénation du milieu. La lyse la moins efficace est celle réalisée en tube de 20/200. Quelles que soient les conditions de culture, la lyse bactérienne est en général rapide, le nombre des phages pouvant être multiplié par plusieurs milliers en une heure (phage CM8 multiplié sur M14S). Le maximum de phages est obtenu en général après une dizaine d'heures de culture et varie très peu ensuite. Des titres phagiques de  $10^{10}$  UFP/ml sont observés entre la 17ème et la 36ème heure, quel que soit le phage. Les phages CM8 et MM1H, associés à leur hôte respectif, présentent dans ces conditions un pouvoir lytique remarquable, la population phagique atteignant  $10^{10}$  UFP/ml bien avant les autres phages.

## 2 - Influence de la multiplicité d'infection (m.o.i.)

Au cours de l'infection phagique, l'adsorption peut s'effectuer, pour la plupart des phages, sur toute la surface de la bactérie, ou sur les flagelles ou les F-pili pour certains d'entre-eux. Un nombre très important de phages peuvent donc théoriquement s'adsorber sur la bactérie. La rapidité de la lyse ainsi que le nombre de phages formés doivent être influencés par le nombre de phages impliqués dans le processus, c'est-à-dire adsorbés au cours des quelques minutes qui suivent la mise en contact du phage et de son hôte.

Les cinq phages CM8, CM21, MM1H, NM4 et NM9 ont été multipliés sur leur hôte respectif à des m.o.i. différentes. La lyse est réalisée en agitation rotative en erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml de milieu RC fructosé suppléé en  $\text{CaCl}_2$   $4 \times 10^{-4}$  M et  $\text{MgCl}_2$   $5 \times 10^{-4}$  M. La production des phages est suivie par mesure de la turbidité de la culture et par dosage des phages dans le milieu. L'expérience est poursuivie 18 heures. Les résultats sont consignés dans le tableau 14 dans lequel nous n'avons porté que les concentrations en phages après 18 heures de lyse.

Le nombre maximum de phages obtenus dans nos conditions expérimentales se situe entre 1,3 et  $4 \times 10^{10}$  UFP/ml en 18 heures pour une m.o.i. de 5. Notons que pour une m.o.i. égale ou supérieure à 0,2, seuls les deux phages CM8 et MM1H titrent un nombre d'UFP/ml de l'ordre de  $10^{10}$ . Ils montrent, là encore, une aptitude à lyser leur hôte, supérieure à celle des autres phages.

Phage/Hôte	m.o.i.					
	0,1	0,2	1	5	10	20
CM8/M14S	$2,0 \times 10^9$	$10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^9$	$7,0 \times 10^8$
CM21/M18S	$1,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$9,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^9$	$6,2 \times 10^8$
MM1H/M14S	$1,1 \times 10^9$	$9,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^9$	$10^9$
NM4/M11S	$1,2 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$7,9 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$	$8,5 \times 10^8$
NM9/M11S	$1,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$6,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^9$	$7,3 \times 10^8$

Tableau 14 - Nombre de phages présents dans le milieu après 18 heures de lyse en fonction de la multiplicité d'infection employée.



A la vue de ces résultats, nous avons décidé, dans la suite de ce travail, d'utiliser systématiquement une m.o.i. comprise entre 1 et 3.

### 3 - Mise en évidence de la dépendance de certains de nos phages vis-à-vis du calcium et du magnésium

Au cours de nos premières investigations sur les phénomènes de lyse phagique en milieu liquide, nous nous sommes rendu compte que certains de nos phages ne lysaient pas **R. meliloti** en milieu RC fructosé à 1 p100. Dans ces conditions expérimentales, sur 18 phages étudiés, 11 étaient incapables de lyser **R. meliloti** en milieu liquide, les 7 autres en étant parfaitement capables [WERQUIN *et al.* (281)].

L'adsorption et même la pénétration de l'acide nucléique phagique requièrent la présence d'ions bivalents dans le milieu. Chez de nombreux phages, ces ions jouent un rôle primordial au cours de la première étape correspondant à la fixation du phage sur la bactérie. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ont été les plus souvent étudiés. L'adsorption chez les couples hôte-phages caudés n'est pas toujours sous la dépendance des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou  $\text{Mg}^{2+}$ , tandis que chez les Microviridés, il semble que leur présence soit toujours nécessaire. Afin d'obtenir des suspensions phagiques les plus concentrées possible pour tous les phages dont nous disposons, nous nous sommes intéressé au rôle que peuvent jouer ces ions au cours de la lyse de **R. meliloti**.

Pour cela, nous avons réalisé des lyses de 18 heures dans les conditions de m.o.i. et d'agitation décrites précédemment, en milieu RC fructosé à 1 p100 contenant des doses croissantes de  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$ . Nous présentons sur la figure 9 les résultats obtenus pour les 4 phages : CM1, CM2, NM3 et NM4.

Il s'avère que chaque couple bactériophage-hôte a besoin pour que la lyse soit efficace d'un ajout plus ou moins important d'ions bivalents. Ces exigences sont différentes d'un système à l'autre. Lorsque la lyse est obtenue, une concentration supérieure en ions bivalents n'en améliore pas sensiblement le rendement. Pour les quatre phages étudiés, les exigences en  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  se situent entre 0,8 et  $2,3 \times 10^{-4}$  M en  $\text{CaCl}_2$  et entre 1,0 et  $3,5 \times 10^{-4}$  M en  $\text{MgCl}_2$ .

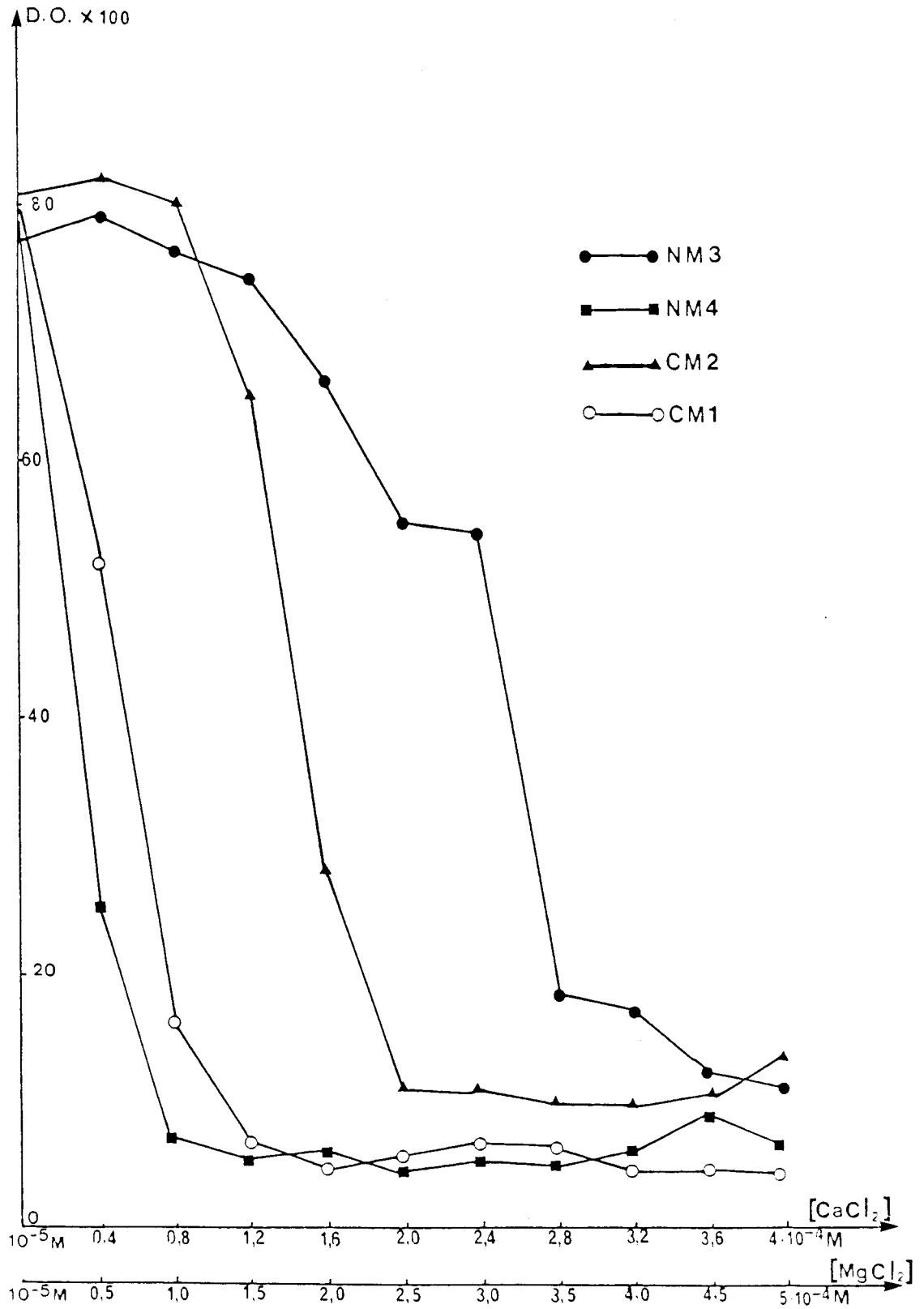


Figure 9 - Lyse de cultures de *Rhizobium meliloti* en milieu RC fructosé par différents bactériophages en fonction de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$ .

Dans nos conditions expérimentales, un ajout représentant une concentration en  $\text{CaCl}_2$  supérieure à  $8 \times 10^{-4}$  M amène une précipitation des phosphates mono et dipotassiques du milieu RC qui perturbe l'adsorption des phages. Pour couvrir les exigences de tous nos phages, nous avons décidé de compléter le milieu RC avec du  $\text{CaCl}_2$  et du  $\text{MgCl}_2$  aux concentrations respectives de  $4 \times 10^{-4}$  M et  $5 \times 10^{-4}$  M.

Afin de réaliser un suivi plus complet de la lyse phagique, nous l'avons étudiée en continu au biophotomètre. Pour cela, les phages sont ajoutés à une m.o.i. de 3 en l'absence ou en présence d'ions bivalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  aux concentrations définies précédemment. Nous avons porté dans le tableau 15 les résultats obtenus.

Lorsque le milieu de réaction contient à la fois du  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , tous les phages étudiés sont lysés en des temps compris entre 3 et 11 heures. En présence de calcium seul, tous les phages sauf 2 (NM8 et MMIC) sont lysés également. Chez les phages CM1, CM6, CM21, NM6 et NM9, la seule présence du calcium permet une lyse aussi complète que lorsque les deux ions sont ajoutés ensemble. Les trois phages CM4, CM7 et CM8 sont capables de lyser leur hôte en présence de  $\text{MgCl}_2$  seul mais les temps de lyse sont alors très longs et sans commune mesure avec ceux observés avec  $\text{CaCl}_2$  seul ou avec  $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$ . Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ajoutés ensemble sont absolument nécessaires au déclenchement de la lyse chez les phages NM8 et MMIC alors que chez tous les autres phages étudiés la lyse est de durée égale ou plus souvent inférieure à celle obtenue lorsqu'il y a ajout de l'un des deux ions.

Il ressort de cette étude que l'ion calcium est toujours indispensable à la lyse bactérienne. Par contre, l'ion magnésium, à de rares exceptions près, est bien moins nécessaire. Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence une action légèrement synergique de ces deux ions bivalents vis-à-vis des phages CM4, CM7 et CM8.

Les figures 10 et 11 donnent un aperçu des profils de lyse que nous avons obtenus pour les 5 phages les plus représentatifs :

Phages	ions bivalents ajoutés au milieu		
	Ca <sup>2+</sup> ( ) <sup>1</sup>	Mg <sup>2+</sup> ( ) <sup>1</sup>	Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup> ( ) <sup>1</sup>
CM1	+ ( 6,5)	-	+ ( 6,5)
CM2	+ ( 8,5)	-	+ ( 6,0)
CM3	+ ( 5,0)	-	+ ( 3,5)
CM4	+ ( 3,5)	+ (10,0)	+ ( 3,0)
CM5	+ ( 7,5)	-	+ ( 6,5)
CM6	+ ( 6,5)	-	+ ( 6,5)
CM7	+ ( 6,5)	+ (12,0)	+ ( 5,0)
CM8	+ ( 7,5)	+ (14,0)	+ ( 6,5)
CM9	+ ( 9,5)	-	+ ( 8,0)
CM20	+ (10,0)	-	+ ( 7,0)
CM21	+ ( 8,0)	-	+ ( 8,0)
NM1	+ (12,5)	-	+ (11,0)
NM2	+ ( 5,5)	-	+ ( 6,5)
NM3	+ ( 9,0)	-	+ ( 5,5)
NM4	+ (10,0)	-	+ ( 8,5)
NM6	+ ( 5,0)	-	+ ( 5,0)
NM7	+ ( 6,0)	-	+ ( 5,0)
NM8	-	-	+ (11,0)
NM9	+ (10,0)	-	+ (10,0)
MM1C	-	-	+ (11,0)
MM1H	+ (15,0)	-	+ (10,0)

Tableau 15 - Lyse bactérienne en l'absence ou en présence de CaCl<sub>2</sub> 4 x 10<sup>-4</sup> M et MgCl<sub>2</sub> 5 x 10<sup>-4</sup> M.

( )<sup>1</sup> temps qui s'écoule entre l'addition du phage et la lyse complète de la culture.  
 + lyse  
 - pas de lyse

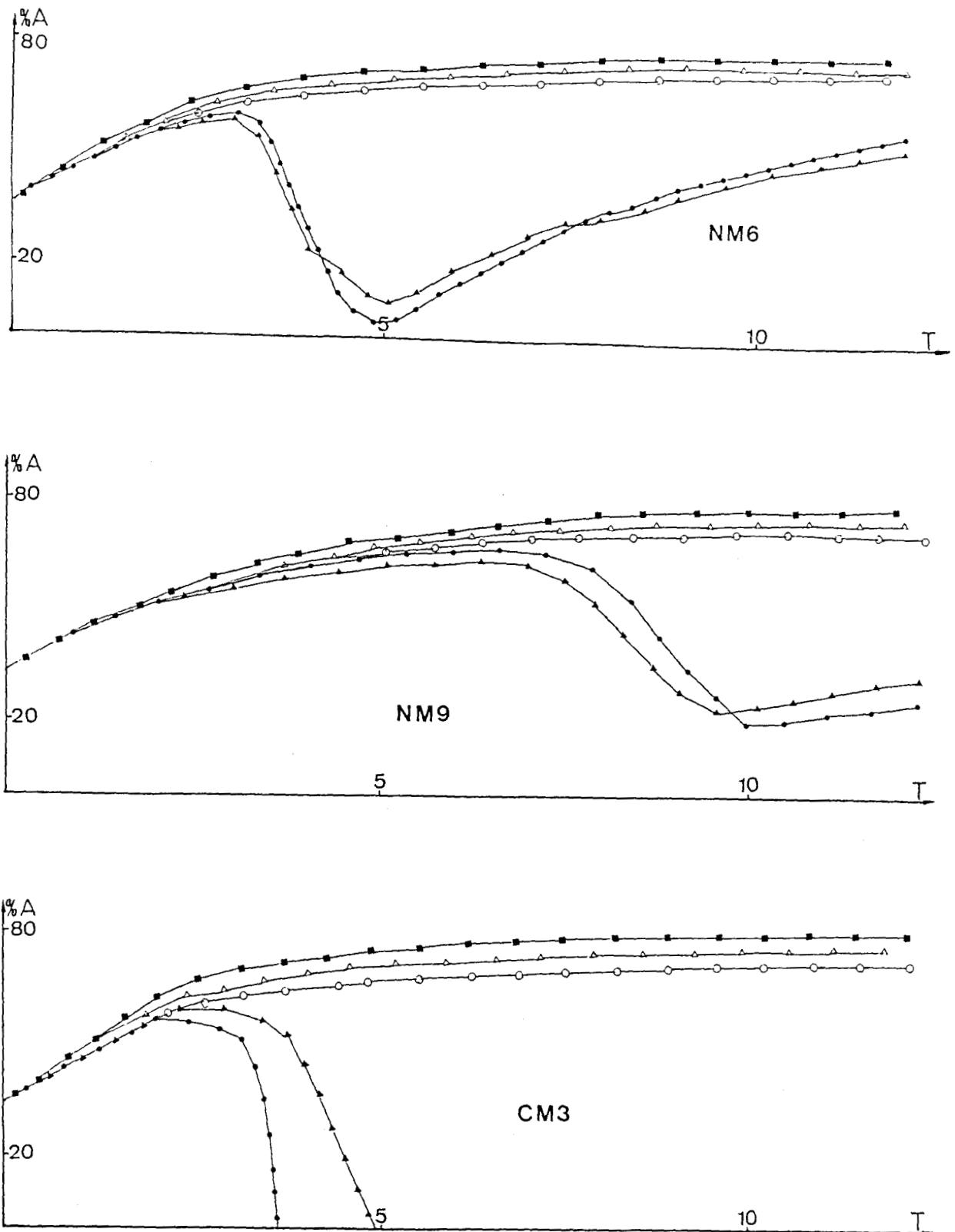


Figure 10 - Lyse de *R. meliloti* par les phages NM6, NM9 et CM3 en l'absence ou la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou  $\text{Mg}^{2+}$ .

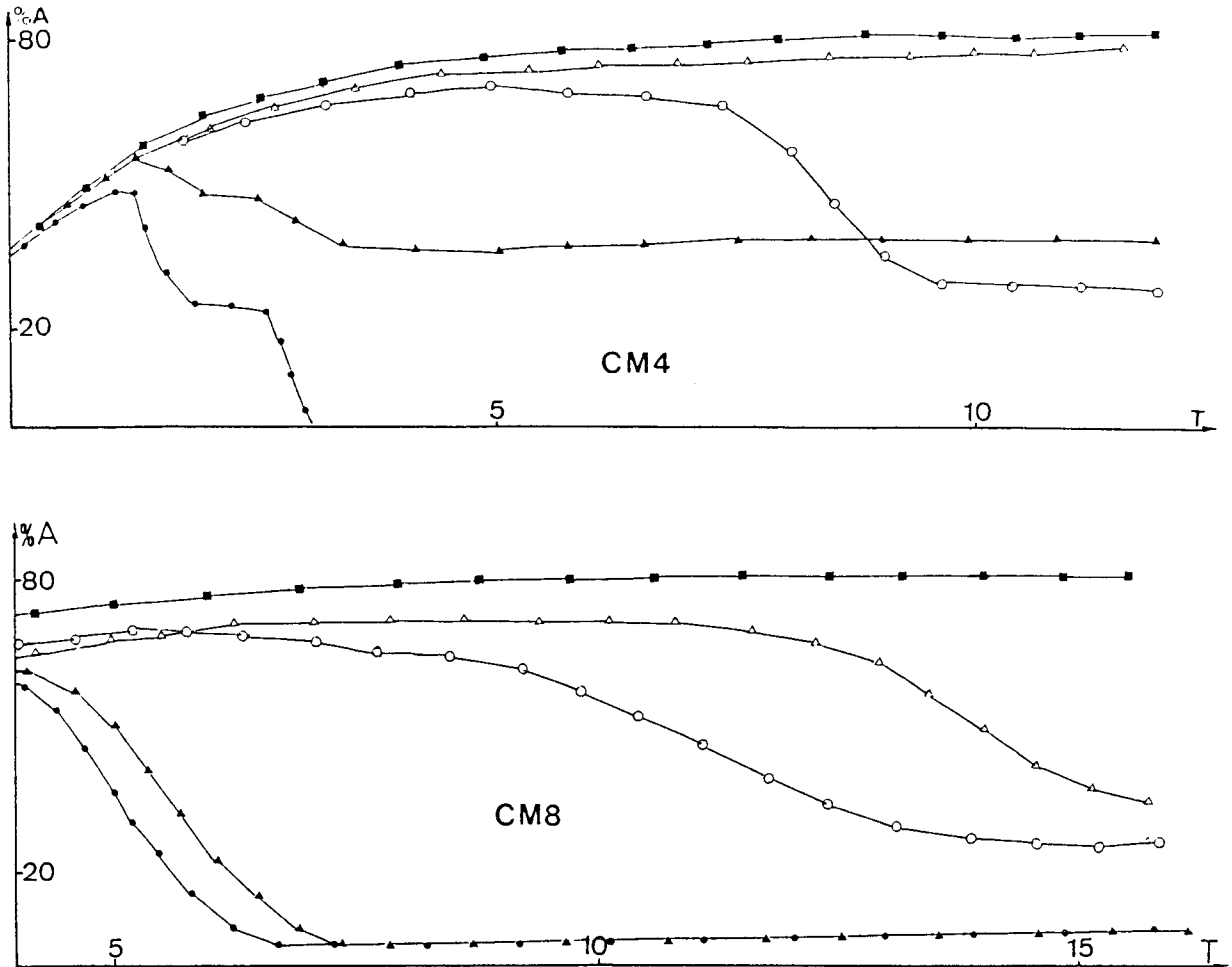


Figure 11 - Lyse de *R. meliloti* par les phages CM4 et CM8 en l'absence ou la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou  $\text{Mg}^{2+}$ .

Légende des figures 10 et 11 :

- |     |                                 |     |   |
|-----|---------------------------------|-----|---|
| —■— | TEMOIN (HOTE BACTERIEN)         | —●— | PHAGE + HOTE + $\text{Ca}^{2+}$ et $\text{Mg}^{2+}$ |
| —△— | PHAGE + HOTE                    | % A | ABSORBANCE (EN POURCENTAGE)                         |
| —○— | PHAGE + HOTE + $\text{Mg}^{2+}$ | T   | TEMPS (EN HEURES)                                   |
| —▲— | PHAGE + HOTE + $\text{Ca}^{2+}$ |     |   |

- phage NM6 : lyse rapide en 5 heures en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ .
- phage NM9 : lyse en 10 heures en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ ;
- phage CM3 : lyse rapide en 5 heures en présence de calcium et encore plus rapide (3 heures) en présence de  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$  ;
- phage CM4 : lyse très rapide en 3,5 heures en présence de  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ .  
Noter dans ce cas que la lyse est nette en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  seul mais d'une efficacité bien inférieure à celle obtenue en présence de  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ . Noter également que la lyse en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  seul est réelle, plus tardive que la précédente mais en fin de compte plus efficace ;
- phage CM8 : lyse de la culture bactérienne en 7 heures environ en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Lyse également en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  qui atteint son maximum au bout de 15 heures. Noter ici que le témoin hôte + phage (qui comme tous les autres témoins contient du  $\text{Mg}^{2+}$   $1 \times 10^{-4}$  M) commence à se lyser au bout d'une douzaine d'heures pour montrer une lyse pratiquement identique à celle de l'échantillon contenant les ions  $\text{Mg}^{2+}$  à  $4 \times 10^{-4}$  M. Des 21 phages étudiés, il est le seul qui présente ce phénomène de dépendance importante vis-à-vis du magnésium.

Nous avons déterminé, avec précision, trois paramètres importants influençant la lyse bactérienne. Pour obtenir un rendement convenable, les cultures bactériennes doivent être réalisées en erlenmeyer de 200 à 300 ml contenant environ 50 ml de culture en agitation rotative et à 30°C. Lorsque les lyses sont effectuées avec une m.o.i. comprise entre 1 et 3 et en présence de  $\text{CaCl}_2$   $4 \times 10^{-4}$  M et  $\text{MgCl}_2$   $5 \times 10^{-4}$  M, nous avons recueilli pour tous nos phages des suspensions titrant de l'ordre de  $10^{10}$  UFP/ml.

Dans les conditions décrites ci-dessus, nous avons apprécié le pourcentage d'adsorption en fonction du temps de contact et déterminé la valeur de la constante d'adsorption après 5 min de contact. Les valeurs de ces deux paramètres donnent en effet une idée précise du déroulement de l'adsorption. Cette étude a été réalisée avec 4 phages du groupe CM1 (CM1, CM3, CM20 et CM21), 4 phages du groupe NM1 (NM1, NM2, NM6 et NM7) et enfin le phage MMIC.

#### 4 - Détermination du pourcentage et de la constante d'adsorption

L'adsorption du phage représente la première étape du cycle infectieux. Elle dépend de la concentration initiale en bactéries et en phages, de la température, de la viscosité du milieu et de l'état physiologique de la bactérie-hôte. Dans de bonnes conditions de culture et en présence d'un excès de bactéries, le taux d'adsorption des phages suit l'équation du premier ordre suivante :

$$\frac{dP}{dt} = k B p$$

où  $k$  est la constante de vitesse,  $B$  la concentration en bactéries et  $P$  la concentration en phages.

Cette constante de vitesse  $k$ , qui doit être assimilée ici à la constante d'adsorption, est représentée par la formule :

$$k = \frac{2,3}{Bt} = \log \frac{P_0}{P}$$

pour laquelle  $P_0$  est la concentration en phages au temps 0 de la réaction,  $P$  représente le nombre de phages non adsorbés au temps  $t$  (en min),  $B$  exprime la concentration en bactéries (nombre de cellules par ml).

##### a) Technique employée

Pour calculer la valeur de  $k$ , la seule inconnue à déterminer est le nombre de phages non adsorbés au temps  $t$ . On réalise la manipulation suivante : une culture de **R. meliloti** en phase exponentielle de croissance est diluée dans du



milieu RC fructosé additionné de  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$  pour obtenir une densité optique de 0,2 (à 600 nm), ce qui correspond à  $2 \times 10^8$  bactéries/ml.

La suspension phagique utilisée est diluée pour obtenir  $2 \times 10^8$  UFP/ml. Dans un tube de réaction, on mélange 0,1 ml de suspension phagique et 0,9 ml de bactéries (ce qui correspond à une m.o.i. de 0,1). Immédiatement après le contact puis après 5 min et ensuite toutes les 10 min, on prélève 0,1 ml du mélange que l'on porte dans un tube contenant 9,4 ml de milieu RC additionné de 0,5 ml de chloroforme. Le chloroforme tue toutes les bactéries y compris celles sur lesquelles les phages sont adsorbés irréversiblement et épargne les phages non adsorbés. Le tube est centrifugé à 10 000 t/min pendant 10 min, ce qui a pour effet de sédimenter les bactéries tuées et les phages qui y sont adsorbés. Du surnageant contenant les phages intacts non adsorbés, on prélève 0,1 ml que l'on mélange à 0,3 ml de culture bactérienne. Après un contact de 20 min à température du laboratoire, l'échantillon est additionné de gélose bactériophage et coulé en double couche sur milieu RC gélosé fructosé. Après incubation, les plages de lyse qui apparaissent sur les boîtes correspondent à autant de phages non adsorbés. Connaissant le nombre de phages mis au départ, on peut en déduire le pourcentage des phages adsorbés en fonction du temps.

#### b) Résultats et conclusion

Les tableaux 16 et 17 donnent respectivement pour les neuf phages étudiés le nombre de particules non adsorbées et le pourcentage d'adsorption en fonction du temps. Le tableau 18 présente les valeurs de la constante d'adsorption  $k$  pour ces mêmes phages.

La première constatation que l'on peut faire est que les phages étudiés ici s'adsorbent très rapidement sur leur bactérie-hôte. En effet, le pourcentage d'adsorption au temps  $t = 0 + \epsilon$  ( $\epsilon$  étant le temps nécessaire pour réaliser l'expérience) est très élevé et s'échelonne entre 66 et 94 p100. D'autre part, plus on prolonge le temps de contact, plus les phages sont nombreux à s'adsorber. Certains comme les phages CM1, CM20, CM21 et MMIC sont adsorbés à plus de 99 p100 dès la vingtième minute. Ce caractère n'est pas spécifique aux phages du genre **Rhizobium** car dans la plupart des systèmes phage-hôte, 90 p100 des phages sont adsorbés après 10 min de contact

PHAGES										
Temps de contact en min	NM1	NM2	NM6	NM7	CM1	CM3	CM20	CM21	MMIC	
0 + ε (1)	6,12 x 10 <sup>6</sup>	6,74 x 10 <sup>6</sup>	3,24 x 10 <sup>6</sup>	3,52 x 10 <sup>6</sup>	1,06 x 10 <sup>6</sup>	1,16 x 10 <sup>6</sup>	4,15 x 10 <sup>6</sup>	1,21 x 10 <sup>6</sup>	3,84 x 10 <sup>6</sup>	
5	3,40 x 10 <sup>6</sup>	3,64 x 10 <sup>6</sup>	2,11 x 10 <sup>6</sup>	2,68 x 10 <sup>6</sup>	4,90 x 10 <sup>5</sup>	9,96 x 10 <sup>5</sup>	1,76 x 10 <sup>6</sup>	4,60 x 10 <sup>5</sup>	9,40 x 10 <sup>5</sup>	
10	2,00 x 10 <sup>6</sup>	2,76 x 10 <sup>6</sup>	1,64 x 10 <sup>6</sup>	2,50 x 10 <sup>6</sup>	6,00 x 10 <sup>4</sup>	6,96 x 10 <sup>5</sup>	5,30 x 10 <sup>5</sup>	1,80 x 10 <sup>5</sup>	1,40 x 10 <sup>5</sup>	
20	1,78 x 10 <sup>6</sup>	2,38 x 10 <sup>6</sup>	3,10 x 10 <sup>6</sup>	1,25 x 10 <sup>6</sup>	3,00 x 10 <sup>4</sup>	2,38 x 10 <sup>5</sup>	1,70 x 10 <sup>5</sup>	1,30 x 10 <sup>5</sup>	2,00 x 10 <sup>4</sup>	
30	1,16 x 10 <sup>6</sup>	2,02 x 10 <sup>6</sup>	1,00 x 10 <sup>5</sup>	9,80 x 10 <sup>5</sup>	1,00 x 10 <sup>4</sup>	1,10 x 10 <sup>5</sup>	1,10 x 10 <sup>5</sup>	8,00 x 10 <sup>4</sup>	1,00 x 10 <sup>4</sup>	
40	8,50 x 10 <sup>5</sup>	1,81 x 10 <sup>6</sup>	7,00 x 10 <sup>4</sup>	5,40 x 10 <sup>5</sup>	1,00 x 10 <sup>4</sup>	8,60 x 10 <sup>4</sup>	8,00 x 10 <sup>4</sup>	7,00 x 10 <sup>4</sup>	1,00 x 10 <sup>4</sup>	
50	4,40 x 10 <sup>5</sup>	1,68 x 10 <sup>6</sup>	7,00 x 10 <sup>4</sup>	2,60 x 10 <sup>5</sup>	1,00 x 10 <sup>3</sup>	5,80 x 10 <sup>4</sup>	7,00 x 10 <sup>4</sup>	6,00 x 10 <sup>4</sup>	1,00 x 10 <sup>3</sup>	
60	3,60 x 10 <sup>5</sup>	6,00 x 10 <sup>6</sup>	5,00 x 10 <sup>4</sup>	1,00 x 10 <sup>5</sup>	1,00 x 10 <sup>3</sup>	3,10 x 10 <sup>4</sup>	7,00 x 10 <sup>4</sup>	6,00 x 10 <sup>4</sup>	1,00 x 10 <sup>3</sup>	

Tableau 16 - Evaluation du nombre de particules non adsorbées en fonction du temps.

(1) ε : temps nécessaire à la manipulation.

Temps de contact en min	PHAGES										
	NM1	NM2	NM6	NM7	CM1	CM3	CM20	CM21	MMIC		
0 + $\epsilon$ (1)	69,4	66,3	83,8	82,4	94,7	94,2	79,3	94,0	81,8		
5	83,0	81,8	89,5	86,6	97,5	95,1	91,2	97,7	95,3		
10	90,0	86,2	91,8	87,5	99,6	96,5	97,3	99,1	99,3		
20	91,1	88,1	98,5	93,8	99,9	98,8	99,1	99,3	99,6		
30	94,2	89,9	99,5	95,1	99,9	99,4	99,5	99,6	99,8		
40	95,7	91,0	99,6	97,3	99,9	99,5	99,6	99,6	99,9		
50	97,8	94,6	99,6	98,7	100,0	99,7	99,7	99,7	100,0		
60	98,2	97,0	99,6	99,5	100,0	99,8	99,7	99,7	100,0		

Tableau 17 - Pourcentage d'adsorption des phages en fonction du temps.

(1)  $\epsilon$  : temps nécessaire à la manipulation.

Phages	NM1	NM2	NM6	NM7	CM1	CM3	CM20	CM21	MMIC
Constante d'absorption ( $10^{-9}$ ml/min)	1,96	1,88	2,50	2,22	4,10	3,32	2,69	4,17	3,38

Tableau 18 - Constante d'adsorption k calculée pour 5 min de contact.

[ACKERMANN et DUBOW (5)]. La constante d'adsorption  $k$ , calculée pour 5 min de contact a une valeur comprise entre 1,88 et  $4,17 \cdot 10^{-9}$  ml/min, ce qui est en accord avec les valeurs couramment rapportées dans la littérature. Chez les phages caudés, le taux d'adsorption varie en effet entre  $6,3 \cdot 10^{-12}$  ml/min et  $2,5 \cdot 10^{-5}$  ml/min avec une moyenne de  $10 \cdot 10^{-9}$  ml/min [ACKERMANN et DUBOW (5)].

## II. - PRODUCTION DES PHAGES EN GRANDE QUANTITE : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'OBTENTION DES PHAGES DE RHIZOBIUM EN FERMENTEUR [WERQUIN et al. (279)]

Les techniques d'obtention des phages, précédemment décrites, ne permettent d'obtenir que de faibles volumes de phages. Qu'il s'agisse de leur observation au microscope électronique ou de l'étude de leurs constituants, il est nécessaire de posséder des suspensions phagiques les plus concentrées possible. Nous avons mis au point une technique de production en masse de phages de **Rhizobium** en milieu liquide, suivie d'une concentration au polyéthylène glycol et d'une purification en gradient de chlorure de césium.

La production des phages a été réalisée dans un fermenteur F-7T conçu et réalisé à Toulouse par Setric Génie Industriel (figure 12). Il se compose d'une cuve de 4,5 l, d'un volume utile de 3 l environ, équipée des unités suivantes :

- mesure et régulation de température,
- agitation variable,
- mesure et régulation du pH,
- mesure de l'oxygène dissous,
- détection et régulation des mousses.

### A. - Préparation d'une fermentation

#### 1 - Préparation du matériel

Toutes les pièces constituant le fermenteur sont rigoureusement nettoyées au détergent, rincées à l'eau et remontées en veillant à l'intégrité et à la

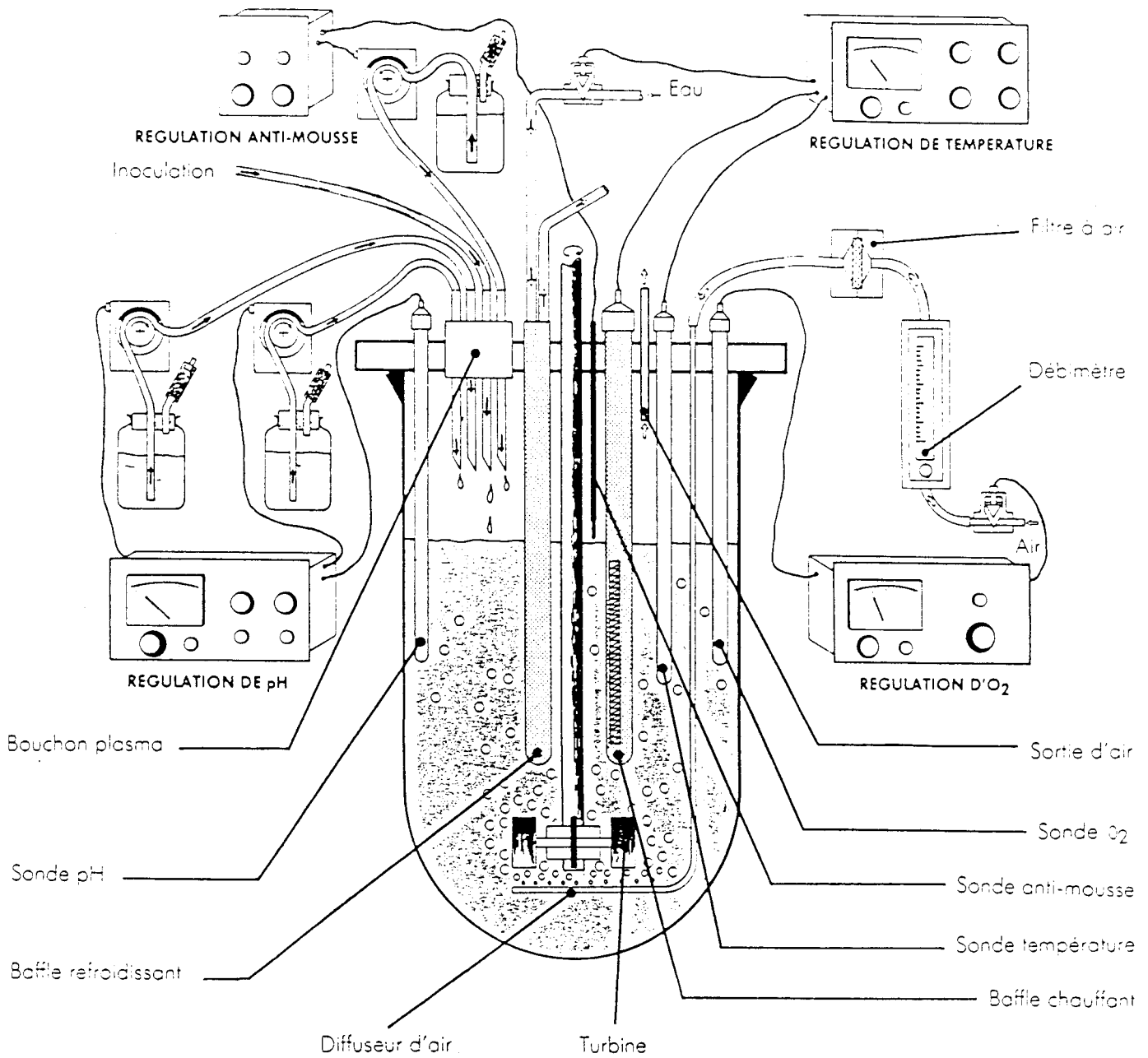


Figure 12 - Représentation schématique du fermenteur Setric de type F-7T.

position des différents joints. La cuve est chargée de 2,7 litres de milieu RC et l'ensemble est autoclavé à 121°C pendant 20 min.

## 2 - Réalisation de la préculture

La cuve de fermentation seraensemencée avec 300 ml de préculture, ce qui représente 10 p100 de son volume. La préculture est réalisée en milieu RC fructosé à 1 p100. Sa croissance s'effectue sur table d'agitation rotative à 30°C durant une période d'au moins 18 heures.

## 3 - Préparation du fermenteur

La cuve contenant le milieu de culture stérile est connectée au pupitre de commande et mise en régulation de température. La source de carbone, constituée de fructose à 40 p100, stérilisée séparément, est ajoutée au milieu pour obtenir une concentration finale de 1 p100. Le milieu est également suppléé par les solutions stériles suivantes :

- 75 ml de bactopeptone Difco à 10 p100 permettant d'obtenir une concentration de 0,25 p100 ;
- 30 ml de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à 1 p100 ce qui correspond à une concentration de  $5 \times 10^{-4}$  M ;
- 30 ml de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 0,6 p100 ce qui correspond à une concentration de  $4 \times 10^{-4}$  M.

## 4 - Ensemencement de la préculture et affichage des conditions de culture

La préculture de **R. meliloti** est injectée dans le fermenteur. Les conditions suivantes de culture seront identiques pour toutes les lyses bactériennes :

- température de croissance : 30°C ;
- vitesse d'agitation : 300 t/min ;
- aération : 1 l d'air par min ;
- calage du pourcentage d'oxygène dissous au temps 0 de la fermentation : 90 p100 ;

- la régulation du pH est inutile, celui-ci ne variant pratiquement pas au cours de la fermentation ;
- la régulation des mousses est également inutile, elles n'apparaissent qu'en fin de fermentation au moment de la lyse bactérienne.

## **5 - Préparation des phages**

Un stock important de phages (environ 70 boîtes de Petri) est réalisé par la technique de la double couche selon ADAMS. On obtient couramment de l'ordre de 120 ml de suspension phagique titrant environ  $10^9$  UFP/ml. Ces phages sont filtrés sur filtre Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  et placés dans une fiole conique stérile munie d'un système d'injection directe dans le fermenteur.

### **B. - Suivi de la fermentation et appréciation de la lyse**

La fermentation se déroule en deux étapes et la lyse bactérienne est appréciée grâce au suivi du pourcentage d'oxygène dissous dans le fermenteur (le débit d'air restant bien entendu constant au cours du temps) (fig. 13).

Immédiatement après l'injection de la préculture et lorsque le milieu est saturé en air, le pourcentage d'oxygène dissous est fixé à 90 p100 et calé sur cette valeur. Au cours de la croissance bactérienne, il y a consommation d'oxygène et donc diminution du pourcentage d'oxygène dissous dans le fermenteur. La culture est poursuivie dans ces conditions jusqu'à ce que la densité optique égale à 0,2 au départ ait doublé, soit dans la plupart des cas après 2 à 3 heures.

Le phage est alors injecté dans le fermenteur à une m.o.i. comprise entre 0,2 et 1 puis l'agitation et l'oxygénation sont arrêtées pendant 20 min, temps nécessaire à l'adsorption des phages sur les bactéries.

Après ce laps de temps, l'agitation et l'aération sont rétablies. L'observation du graphique, représentant le pourcentage d'oxygène dissous dans le fermenteur en fonction du temps, montre que les bactéries continuent de croître malgré la présence du phage et cela pendant encore environ une heure. Puis, plus ou moins brutalement, selon les phages étudiés, la courbe représentant le pourcentage d'oxygène dissous s'inverse et croît rapidement



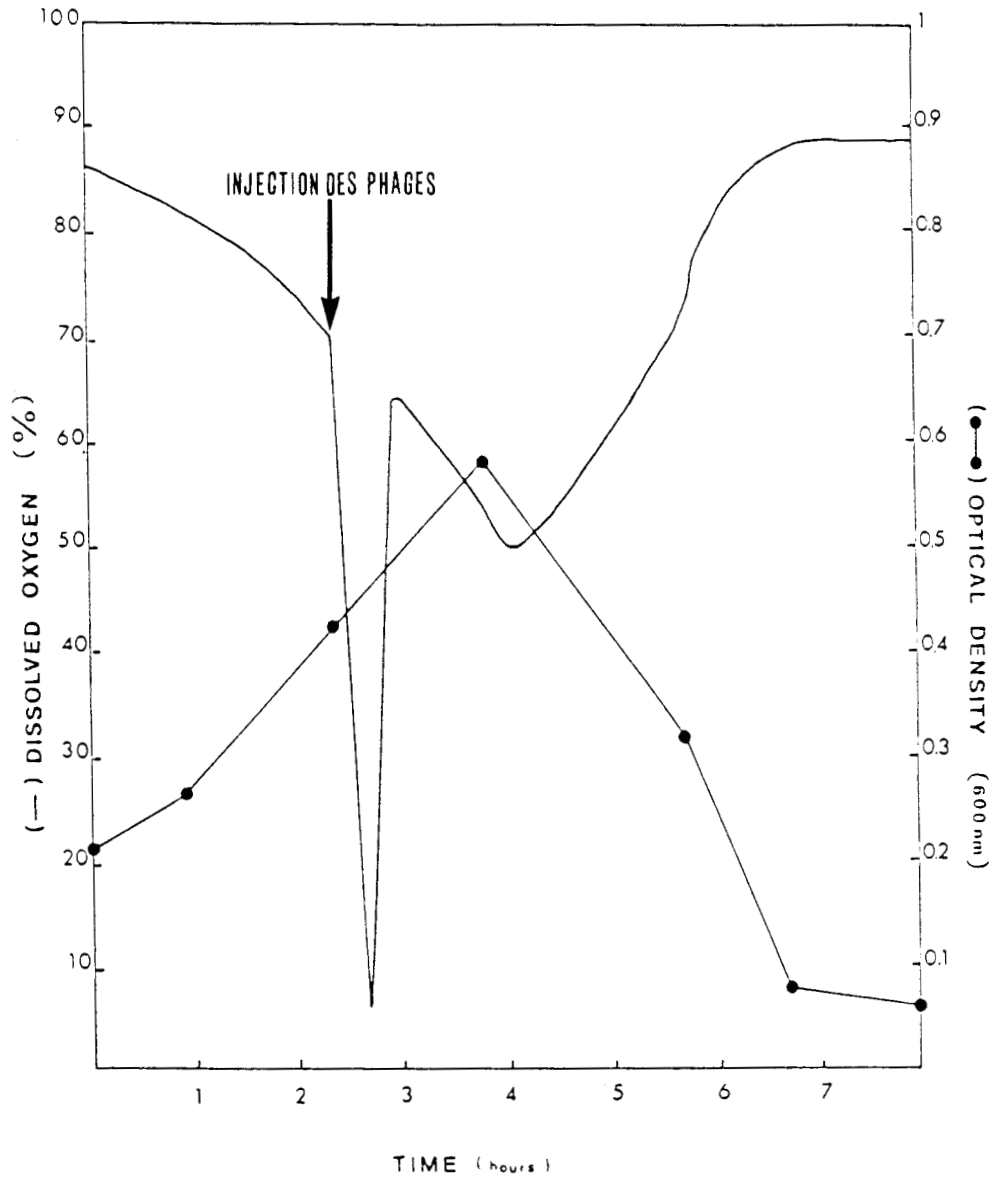


Figure 13 - Variations, en fonction du temps, du pourcentage d'oxygène dissous et de la densité optique d'une culture en fermenteur de *R. meliloti* M9S infectée par le phage NMI.

traduisant la lyse bactérienne. Le pourcentage d'oxygène dissous augmente jusqu'à atteindre pour certains phages une valeur supérieure à celle du départ reflétant une lyse quasi totale des bactéries. Parallèlement à l'estimation du pourcentage d'oxygène dissous, la densité optique de la culture est appréciée à 600 nm. Grâce à l'observation simultanée de ces deux variables, on peut savoir à tout instant l'état de la lyse bactérienne.

### C. - Concentration et purification des phages

#### 1 - Concentration

La technique utilisée est celle décrite par YAMAMOTO *et al.* (292). Elle repose sur la propriété qu'ont les phages de précipiter en présence de chlorure de sodium 0,5 M et de polyéthylène glycol 6000 (P.E.G.) à des concentrations comprises entre 2 et 10 p100. Pour notre part, nous avons utilisé une concentration en P.E.G. 6000 de 8 p100 qui nous a permis de recueillir le maximum de phages après précipitation (tableau 19).

Phages	Pourcentage de phages recouverts après une précipitation de 16 h sous un volume de 20 ml en présence de PEG 6000 à			
	6 p100	8 p100	10 p100	12 p 100
CM5	28,0	32,3	31,9	31,5
CM7	36,0	39,8	40,0	39,4
NM1	38,0	50,8	49,7	49,8
NM3	46,0	49,8	49,7	49,8
MM1C	37,0	51,7	47,8	44,2

Tableau 19 - Influence de la concentration en PEG 6000 sur la précipitation de 5 phages.

Les différentes étapes du protocole expérimental sont les suivantes :

- 1 - la suspension phagique à traiter est placée à + 4°C pendant une nuit ;
- 2 - elle est centrifugée à 12 000 g pendant 15 min afin d'en éliminer les débris bactériens et les bactéries survivantes ;
- 3 - la solution est soumise à une digestion par la DNase et la RNase à raison de 1 µg de chaque enzyme par ml de lysat pendant 1 heure à 37°C ;
- 4 - centrifugation à 12 000 g pendant 15 min ;
- 5 - le surnageant est additionné de NaCl afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 M, puis laissé une nuit à + 4°C ;
- 6 - centrifugation à 12 000 g pendant 15 min ;
- 7 - la suspension phagique est additionnée de P.E.G. 6000 pour avoir une concentration de 8 p100. Elle est placée ensuite dans une ampoule à décanter et laissée à + 4°C pendant une période variant de un à plusieurs jours, temps nécessaire à la précipitation des phages ;
- 8 - le précipité est récupéré puis centrifugé à 2 000 g pendant 15 min. Le surnageant est écarté ;
- 9 - le complexe phages-PEG-ClNa est dissous dans 10 ml de tampon pour bactériophages. La dilution de ce précipité entraîne une dissociation du complexe ;
- 10 - centrifugation à 12 000 g pendant 15 min. Le culot est écarté ;
- 11 - le surnageant contenant les phages est centrifugé à 7 800 g pendant 90 min (34 000 t/min, rotor 60Ti. Ultracentrifugeuse BECKMAN L8-70M) ;
- 12 - le culot contenant les phages est dissous dans 14 ml de tampon pour bactériophages.

## 2 - Purification

La purification finale des phages peut être réalisée de différentes façons. Nous citerons la centrifugation en gradient de densité, l'ultrafiltration ou encore l'adsorption et l'élution, techniques employées séparément ou combinées. La centrifugation en gradient de densité est la plus utilisée et dans la plus grande partie des cas réalisée avec des solutions de chlorure de césium (CICs) ou de sucrose. Il existe deux méthodes de centrifugation en gradient de densité : les centrifugations zonale et isopycnique.

- La centrifugation zonale consiste à déposer l'échantillon au sommet d'un gradient de densité préformé ou constitué d'une superposition de couches de solution de CICs ou de sucrose de différentes densités.
- La centrifugation isopycnique, plus simple, consiste à traiter le mélange uniforme constitué de l'échantillon additionné de chlorure de césium pour obtenir une densité donnée.

Dans les deux cas, après centrifugation, les différents constituants de l'échantillon se réuniront dans des zones du gradient correspondant à leur densité respective.

Nos suspensions phagiques ont été traitées par centrifugation isopycnique. L'échantillon de 14 ml est additionné d'environ 9,3 g de CICs pour obtenir un indice de réfraction de 1,379 mesuré à 25°C à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE. La solution est centrifugée à 100 000 g pendant 15 h (33 000 t/min, Rotor SW 50.1. Ultracentrifugeuse BECKMAN L8-70M).

La bande visible contenant les bactériophages est récupérée par ponction du fond du tube. Elle est ensuite dialysée pendant 48 h à + 4°C contre du tampon phosphate dilué au 1/10, afin d'éliminer le chlorure de césium. La suspension phagique concentrée, ainsi obtenue, est dosée et conservée à - 20°C.

#### **D. - Résultats et conclusion**

Les 21 phages isolés du sol ont été multipliés en fermenteur, précipités en PEG 6 000 et purifiés en gradient de chlorure de césium. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 20.

Les paramètres de culture, en particulier la bonne oxygénation du milieu, nous ont permis d'atteindre rapidement la phase exponentielle de croissance.

L'apport de calcium et magnésium nous a mis dans des conditions propices à une lyse rapide. A de rares exceptions près, la lyse commence en effet 1h30 à 2 heures après l'ajout du phage et dure entre 4h20 et 4h50. Sauf pour les phages CM9 et NMI, le nombre de phages produits avoisine ou dépasse largement  $10^{13}$  particules. Ce que nous avons appelé "le facteur de multiplication" (qui n'a rien à voir avec le nombre de phages produits par cellules bactériennes), c'est-à-dire le nombre par lequel le nombre de phages du départ a été multiplié au cours de la lyse, présente des fluctuations importantes. Egal à 17 X pour le phage CM21, il atteint 147 X pour le phage NMI.

En ce qui concerne le pourcentage de phages retrouvés après précipitation, au PEG 6 000, les valeurs sont très sensiblement différentes de celles trouvées lors de l'essai préliminaire (tableau 19). Seulement 16 p100 du phage CM5 sont recouverts alors que 32 p100 l'étaient lorsque la précipitation était réalisée sous un volume de 20 ml.

Phages	Appartition de la lyse au bout de (en min)	Durée totale de la lyse (en min)	Phages introduits dans le fermenteur	Phages produits	Facteur de multiplication	% des phages retrouvés après précipitation*	% des phages récupérés après centrifugation*	en U.F.P/ml
CM1	90-100	280-300	$2,60 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^{13}$	x 70	70	54,0	$4,32 \times 10^{12}$
CM2	100-120	430-450	$6,50 \times 10^{11}$	$4,5 \times 10^{13}$	x 69	75	63,0	$2,83 \times 10^{13}$
CM3	160-180	200-230	$9,10 \times 10^{11}$	$6,5 \times 10^{13}$	x 72	40	32,0	$2,08 \times 10^{13}$
CM4	100-120	260-300	$2,80 \times 10^{11}$	$2,1 \times 10^{13}$	x 75	65	59,0	$1,23 \times 10^{13}$
CM5	80-105	240-270	$4,40 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^{13}$	x 109	16	2,5	$1,20 \times 10^{12}$
CM6	90-120	360-390	$3,30 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{13}$	x 48	49	45,0	$7,20 \times 10^{12}$
CM7	110-140	250-270	$7,40 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^{13}$	x 23	85	80,0	$1,36 \times 10^{13}$
CM8	120-150	270-300	$6,30 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{13}$	x 19	90	84,0	$1,00 \times 10^{13}$
CM9	110-140	440-460	$1,10 \times 10^{11}$	$8,2 \times 10^{12}$	x 75	77	69,0	$5,66 \times 10^{12}$
CM20	110-120	200-240	$6,45 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^{13}$	x 75	48	42,0	$2,01 \times 10^{13}$
CM21	110-140	240-270	$9,00 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{13}$	x 17	72	58,0	$8,70 \times 10^{12}$
NM1	100-120	240-270	$5,10 \times 10^{11}$	$7,5 \times 10^{12}$	x 147	48	30,0	$2,25 \times 10^{12}$
NM2	100-120	240-270	$3,70 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{13}$	x 31	45	43,0	$4,73 \times 10^{12}$
NM3	140-160	310-320	$3,60 \times 10^{11}$	$10,0 \times 10^{12}$	x 28	89	72,0	$7,20 \times 10^{12}$
NM4	100-110	280-300	$6,10 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{13}$	x 53	58	47,0	$1,50 \times 10^{13}$
NM6	100-120	240-270	$5,00 \times 10^{11}$	$2,5 \times 10^{13}$	x 50	22	18,5	$4,62 \times 10^{12}$
NM7	100-120	240-270	$1,00 \times 10^{12}$	$3,6 \times 10^{13}$	x 36	36	31,0	$1,11 \times 10^{13}$
NM8	105-130	310-340	$7,50 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{13}$	x 21	60	50,0	$8,00 \times 10^{12}$
NM9	80-100	200-220	$3,50 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{13}$	x 43	80	55,0	$8,25 \times 10^{12}$
MM1C	90-110	170-190	$6,30 \times 10^{11}$	$7,2 \times 10^{13}$	x 67	38	29,0	$1,21 \times 10^{13}$
MM1H	90-120	180-200	$3,20 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{13}$	x 72	42	30,0	$6,90 \times 10^{12}$

Tableau 20 - Multiplication en fermenteur des bactériophages de *R. melioli* : estimation de la durée de la lyse et du nombre de phages produits après précipitation au PEG 6000 et centrifugation en CICs.

\* par rapport aux phages produits.

C H A P I T R E III

C A R A C T E R I S A T I O N D E S P H A G E S

Les critères employés pour la caractérisation des phages sont très nombreux et de valeurs intrinsèques très différentes les uns des autres. En 1978, ACKERMANN **et al.** (4), proposent un guide de la caractérisation des phages dans lequel ils tentent de hiérarchiser ces critères. Ils définissent ainsi des critères de haut, moyen et bas niveau. Parmi les critères de haut niveau, on trouve en premier lieu la morphologie du virion. Viennent ensuite la nature de l'acide nucléique phagique, sa configuration (linéaire, circulaire, mono ou bicaténaire), sa masse et sa densité. Les critères de caractérisation classés moyens regroupent, entre autres, la spécificité d'hôte, l'hybridation, le profil de restriction de l'ADN, les propriétés antigéniques des virions et l'inactivation par le chloroforme, la chaleur ou la lumière ultraviolette. Enfin, les critères de caractérisation classés bas niveau englobent la dimension des plages de lyse, la vitesse d'adsorption, la durée de la phase de latence et le nombre de particules phagiques libérées par bactérie.

Nous étudierons dans ce travail quelques uns des critères définis plus haut en présentant successivement : les propriétés antigéniques de nos phages avec en application la détermination de la durée de la période de latence et du nombre de phages produits par bactérie ; suivront la spécificité d'hôte, la morphologie et les mensurations de nos phages. Enfin, nous étudierons les homologies existant entre les ADN des phages.

Historiquement, nos investigations sur les phages de **R. meliloti** ont donné lieu, en 1973, à la publication d'une étude succincte dont le résultat principal a été de montrer que nous étions en présence de phages caudés appartenant aux 3 premiers groupes de la classification de BRADLEY. Trois phages types : CMI, NMI et MMIH ont été alors utilisés pour préparer les immunsérums nécessaires à l'étude des relations sérologiques pouvant exister entre-eux.

## I. - RELATIONS SEROLOGIQUES

### A. - Préparation des immunsérums

#### 1 - Préparation des phages

Pour obtenir des sérums anti-phages possédant un titre élevé, il faut injecter à l'animal assez d'antigènes pour produire un stimulus immunologique adéquat.



Le lysat doit contenir entre  $10^7$  et  $10^{11}$  particules phagiques [WILLIAMS et CHASE (283)].

Les suspensions des phages CMI, NMI et MMIH, obtenues selon la méthode de la double couche, sont filtrées sur membrane Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  afin de les débarrasser de toutes bactéries ou débris bactériens qui pourraient interférer au cours de l'immunisation. Les suspensions sont ensuite dosées.

## 2 - Animaux expérimentaux

Le lapin est l'animal de laboratoire qui convient le mieux pour la production des immunosérums. Au moins trois sujets doivent être immunisés pour chaque antigène car l'immunisation peut varier dans des proportions de 1 à 10 pour un même antigène. La voie d'injection ne semble pas avoir d'importance si les titres phagiques utilisés sont élevés. Si le stock possède un titre faible ou si le phage se révèle être un antigène médiocre, la voie sous-cutanée est recommandée.

Nous avons utilisé des lapins mâles âgés de deux mois environ et pesant en moyenne deux kilogrammes.

## 3 - Conditions d'obtention et de conservation des immunosérums

Trois lapins pour chaque sérum sont inoculés par voie sous-cutanée avec 1 ml de suspension phagique titrant entre  $7 \times 10^9$  et  $1,7 \times 10^{10}$  UFP/ml additionné d'1 ml d'adjuvant de Freund. L'addition d'adjuvant à la suspension phagique n'est pas indispensable car beaucoup de phages constituent par eux-mêmes de bons antigènes, cependant, nous avons préféré l'employer pour plus de sécurité.

Les injections sont réalisées à raison de deux injections par semaine pendant 3 semaines. Une semaine après la dernière injection, 5 ml de sang sont prélevés au niveau de la veine marginale de l'oreille. On laisse le sang coaguler à 37°C pendant quelques heures puis une nuit à 4°C. Le lendemain, le sérum est recueilli par centrifugation et filtré sur membrane Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ . L'activité antivirale est appréciée et si elle se révèle satisfaisante, les animaux sont saignés par la carotide. Le sérum est recueilli et traité de la

même façon que précédemment et conservé au congélateur à  $-18^{\circ}\text{C}$  sous des volumes de 1 ml environ.

### **B. - Mise en évidence de l'activité antivirale des immunsérums**

Les dilutions du sérum et des phages sont réalisées en milieu RC fructosé à 1 p100. On dilue la suspension phagique dont le titre est connu de façon à obtenir environ  $10^7$  phages/ml. On en prélève 0,1 ml que l'on ajoute à 0,9 ml d'une dilution connue (1/100 ou 1/1000) du sérum. Le mélange est laissé en contact 5, 10, 20 ou 30 min selon le sérum et la dilution utilisée à la température ambiante. On prélève 0,05 ml du mélange de réaction que l'on ajoute à 5 ml de milieu RC fructosé à 1 p100 maintenu à  $40^{\circ}\text{C}$  pour arrêter la réaction d'inhibition sérum-phage. A partir de cette dilution  $10^{-2}$ , on réalise des dilutions  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ .

De chaque tube de dilution, on prend 0,1 ml auquel on ajoute 0,3 ml de bactéries sensibles au phage. Après un contact de 20 min à température ambiante, 3 ml de gélose bactériophage maintenue à  $45^{\circ}\text{C}$  sont ajoutés. Le tout est coulé en double couche sur des boîtes de Petri contenant du milieu RC gélosé fructosé à 1 p100. Parallèlement à cette manipulation, on fait un témoin ne contenant pas de sérum. Le tout est incubé une nuit à  $25^{\circ}\text{C}$ .

Dans le tube de réaction de départ, le sérum va inactiver une partie plus ou moins importante de phages. Ceux qui ne seront pas inhibés se fixeront sur les bactéries et après incubation engendreront des plages de lyse. En comparant le nombre de plages de lyse avec celles apparues sur la boîte témoin, on peut calculer facilement le pourcentage d'inhibition du sérum pour un temps donné et à une concentration donnée. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 21 suivant.

Sérum Dilution Temps de contact	Phages		
	CM1	NM1	MM1H
Anti CM1 1 p1000 15 min	91 p100	2 p100	2 p100
Anti NM1 1 p1000 10 min	2 p100	92 p100	2 p100
Anti MM1H 1 p100 10 min	9 p100	2 p100	98 p100

Tableau 21 - Pourcentages d'inhibition des phages CM1, NM1 et MM1H par leur propre immunsérum.

Ces valeurs montrent que les immunsérums obtenus sont spécifiques et que l'activité antivirale qu'ils déploient est très importante. Il n'y a pas de réaction d'inhibition croisée significative entre les 3 phages. A partir de telles données, il est possible de calculer la valeur K du sérum par rapport à n'importe quel phage. Cette valeur est donnée par la formule :

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

dans laquelle K est la constante de vitesse exprimée par min, D la dilution du sérum (100 pour un sérum dilué au 1/100, etc...), t est le temps en minutes, P<sub>0</sub> le nombre de phages présents au temps 0 et P le nombre de phages présents au temps t. Cette équation vaut pour des inactivations comprises entre 90 et 99 p100 des phages présents dans le mélange de réaction. La constante K est assimilée à la constante de neutralisation du sérum [ADAMS (9)].

### C. - Parentés sérologiques - Résultats et discussion

Afin d'étudier les relations sérologiques existant entre nos phages et d'ébaucher ainsi un début de classification, nous avons soumis les 21 phages isolés de la terre aux trois immunsérums dans les conditions expérimentales précédemment décrites. Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau 22.

L'étude des relations antigéniques montre que nous avons à faire à 3 groupes de phages bien distincts correspondant aux trois immunsérums. Parmi les 11 phages du type CM1, sept d'entre eux présentent des constantes de similitude (CS) très proches de 1, ce qui traduit une parenté évidente. Le phage CM4 présente, pour sa part, un CS de 0,5 environ. Quant aux autres phages CM2, CM6 et CM9, ils montrent peu ou pas du tout de similitude antigénique avec le phage CM1. Si l'on s'intéresse maintenant au type NM1, 4 phages sur 8 de ce groupe présentent des CS proches de 1 et 4 autres, les phages NM8, NM3, NM4 et NM9 sont peu ou pas du tout apparentés. Enfin, le 3ème groupe représenté par les deux phages MM1H et MM1C est homogène.

Afin de pousser plus avant nos investigations, nous avons réalisé des immunsérums à partir des phages CM2, CM6, NM4 et NM8 et étudié leur activité antivirale vis-à-vis des phages peu ou pas inhibés par les trois sérums précédents. Dans ce cas, les expériences sont menées en utilisant les immunsérums dilués au 1/100 pendant 15 min. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 23.

Plusieurs remarques peuvent être faites. Contrairement à ce que nous avons observé pour les immunsérums contre les phages CM1, NM1 et MM1H, nous n'obtenons pas ici des valeurs de K soit très élevées soit nulles. Ceci montre que nos sérums sont moins spécifiques vis-à-vis des différents phages traités. Cependant, on peut dire que le phage CM2 possède une affinité évidente pour le groupe des phages CM1 car le CS reste proche de 1. Il en est de même pour le phage NM4 dont l'immunsérum inhibe très nettement les phages du groupe NM1. Mis à part pour le phage CM2, qui est plus inhibé par l'immunsérum du phage NM4 que le phage NM4 l'est lui-même, les autres phages du type CM1 sont moins inhibés. Enfin, en ce qui concerne les phages CM6 et NM8, nous assistons à un phénomène déjà signalé chez les phages de

Type	Phage(s)	K ou CS des immunsérums*							
		CMI		NMI		MMIH			
		K	CS	K	CS	K	CS	K	CS
CMI	CM1, CM3, CM5, CM7 CM8, CM20, CM21	167-186	0,89-1,0	-	-	-	-	-	-
	CM4	90	0,49	-	-	-	-	-	-
	CM2, CM6	4,5-10	-	-	-	-	-	-	-
	CM9	-	-	-	-	-	-	-	-
NMI	NM1, NM2, NM6, NM7,	-	-	206-246	0,83-1,0	-	-	-	-
	NM8	7,6	-	1,6	-	1,0	-	-	-
	NM3, NM4, NM9	-	-	-	-	-	-	-	-
MMIH	MMIC, MMIH	-	-	-	-	37-39	0,96-1	-	-

Tableau 22 - Relations sérologiques.

\* K : constante de neutralisation ; CS : coefficient de similitude (valeur de K pour un phage hétérologue divisée par la valeur de K pour le phage homologue) ; - : inhibition ou similitude nulle.

## K ou CS des immunsérums\*

Type	Phages	CM2		CM6		NM4		NM8	
		K	CS	K	CS	K	CS	K	CS
CM1	CM2	195	1,00	135	> 1,00	135	> 1	157	> 1,00
	CM6	166	0,85	78	1,00	78	0,75	109	> 1,00
	CM9	154	0,79	83	> 1,00	73	0,70	82	> 1,00
NM1	NM3	119	0,61	100	> 1,00	100	0,96	80	> 1,00
	NM4	124	0,63	90	> 1,00	104	1,00	79	> 1,00
	NM8	100	0,51	104	> 1,00	103	0,99	66	1,00
	NM9	131	0,67	91	> 1,00	103	0,99	66	1,00

Tableau 23 - Relations sérologiques.

\* K : constante de neutralisation ; CS : coefficient de similitude (valeur de K pour un phage hétérologue divisée par la valeur de K pour le phage homologue).

**Rhizobium trifolii** et rapporté par STANIEWSKI **et al.** (253) et par ATKINS (14). Nous notons, en effet, que ces deux phages sont moins inhibés par leur propre sérum, les autres phages étant autant et même plus inhibés.

Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec les nombreuses observations selon lesquelles des phages morphologiquement différents ne sont pas sérologiquement apparentés tandis que des phages de même morphologie peuvent posséder ou non des parentés antigéniques [ACKERMANN **et al.** (4)].

#### D. - Application à la détermination de la durée de la période de latence et du nombre de phages produits par bactérie

##### 1 - Technique employée

La période de latence correspond au temps qui s'écoule entre l'adsorption du virus sur la cellule-hôte et la lyse de celle-ci. Le nombre moyen des virus nouvellement formés, libérés par cellule, est appelé "burst-size". Ces deux caractéristiques peuvent être appréciées simultanément en étudiant la multiplication phagique en une seule étape ou "single step growth experiment" mise au point par ELLIS et DELBRÜCK (102).

Nous nous sommes mis dans les conditions suivantes :

- adsorption d'au moins 80 p100 des phages en 5 min pour une m.o.i. de 0,1 ;
- au moins 90 p100 d'inhibition des phages non adsorbés en 5 min, soit une dilution de 1/100 de l'immunsérum correspondant ;
- culture bactérienne contenant  $8 \times 10^7$  bactéries/ml ;
- suspension phagique contenant  $8 \times 10^7$  phages/ml.

Le protocole de la manipulation est indiqué dans le tableau 24.

A des intervalles réguliers, on prélève 0,1 ml des tubes 4 et 5 que l'on coule selon la technique habituelle. Après une nuit d'incubation, les plages de lyse apparues sont comptées. L'expérience originelle de ELLIS et DELBRÜCK, réalisée en infectant **E. coli** B par le phage T2, prévoyait un prélèvement toutes les 2 min. La phase de latence de ce système était en effet estimée à 20 min. Ce n'est évidemment pas le cas dans nos systèmes. Nous avons décidé

Temps en minutes	Tubes	Mode opératoire	Nombre de bactéries supposées être infectées par ml <sup>(1)</sup>
0	1 : adsorption	0,1 ml du phage + 0,9 ml de la bactérie	x
5 <sup>(2)</sup>	2 : sérum	0,1 ml du tube 1 + 0,9 ml du sérum dilué	$x \cdot 10^{-1}$
10	3 : dilution	0,1 ml du tube 2 + 0,9 ml de RC	$x \cdot 10^{-2}$
11	4 : FGT <sup>(3)</sup>	0,1 ml du tube 3 + 3,9 ml de RC	$\frac{x}{4} \cdot 10^{-3}$
12	5 : SGT <sup>(4)</sup>	0,1 ml du tube 4 + 9,9 ml de RC	$\frac{x}{4} \cdot 10^{-5}$

Tableau 24 - Protocole de la manipulation de mise en évidence de la multiplication phagique en une seule étape.

- (1) Le nombre de bactéries supposées être infectées dépend du taux d'adsorption du phage.
- (2) Ce temps varie également en fonction du taux d'adsorption que l'on veut atteindre (ici supérieur à 80 p100). La manipulation doit être cependant réalisée avant la fin de la période de latence.
- (3) FGT : "First Growth Tube" ou premier tube de croissance.
- (4) SGT : "Second Growth Tube" ou second tube de croissance.



de réaliser des prélèvements toutes les 20 min dans le tube FGT en intercalant des prélèvements dans le tube SGT, ce qui nous a permis de suivre la lyse bactérienne de façon satisfaisante.

## 2 - Résultats

Les résultats obtenus pour les phages NM2 et CM20 sont consignés dans les tableaux 25 et 26. et représentés sur les deux courbes des figures 14 et 15.

Dans le tube noté FGT, le nombre de phages reste constant pendant un certain temps (entre 2h20 et 2h30 pour le phage NM2 et entre 4h20 et 4h30 pour le phage CM20) puis croît soudainement. Ce laps de temps correspond à la période de latence des phages cités. Au delà de cette période, les bactéries commencent à se lyser, ce qui se traduit par un accroissement continu et régulier du nombre de phages, que l'on suit facilement dans le tube marqué FGT. Cette phase de lyse terminée, le nombre de phages numérés restera constant au cours du temps.

Le nombre moyen  $N$  de phages numérés au cours de la période de latence multiplié par le facteur de dilution qui est dans notre cas de  $4 \times 10^4$ , nous donne le nombre de phages adsorbés donc de bactéries infectées par ml.

En ce qui concerne le phage NM2, nous obtenons  $166 \times 4 \times 10^4 = 6,64 \times 10^6$  bactéries infectées. Au départ, nous avons mis  $8 \times 10^6$  phages dans le tube 1.

Avant l'addition de l'immunsérum, c'est-à-dire environ 7 à 8 min après le contact, nous avons donc  $\frac{6,64 \times 10^6 \times 10^2}{8 \times 10^6} = 83 \%$  de phages adsorbés. Ce résultat est en accord avec celui obtenu précédemment (tableau 17).

Si l'on applique le même raisonnement au phage CM20, on obtient  $217 \times 4 \times 10^4 = 8,68 \times 10^6$  phages adsorbés, ce qui correspond à 108,5 p100 d'adsorption. Si l'on calcule pour, par exemple, 95 p100 d'adsorption, le nombre de phages CM20 qui aurait dû être dans le tube 1, on trouve  $8,2 \times 10^6$  phages. Aux erreurs de manipulations près, les résultats obtenus concordent avec ceux que l'on pouvait attendre.

Temps de prélèvement	FGT	SGT
0 h 20 min	177	
0 h 40 min	122	
1 h	191	
1 h 20 min	149	0
1 h 30 min		
1 h 40 min	150	1
1 h 50 min	194	1
2 h		
2 h 10 min	180	2
2 h 20 min		
2 h 30 min		2
2 h 40 min	346	4
2 h 50 min	462	7
3 h		
3 h 10 min	942	9
3 h 20 min		
3 h 30 min	964	15
3 h 40 min		
3 h 50 min		
4 h		
4 h 10 min		17
4 h 30 min		24
4 h 50 min		28
5 h 10 min		25
5 h 30		26
5 h 50 min		34
6 h 10 min		36
6 h 30 min		28
6 h 50 min		29
7 h 10 min		27
7 h 30 min		29
7 h 50 min		28
8 h 10 min		32
8 h 30 min		28
8 h 50 min		29
9 h 10 min		30

Tableau 25 - Multiplication phagique en une seule étape : suivi de l'apparition des plages de lyse du phage NM2 cultivé sur *R. meliloti* M9S, en fonction du temps (à partir des tubes FGT et SGT).

Temps de prélèvement	FGT	SGT
0 h 20 min	209	
0 h 40 min	178	
1 h	233	
1 h 20 min	206	0
1 h 30 min		
1 h 40 min	237	0
1 h 50 min	232	2
2 h		
2 h 10 min	218	2
2 h 20 min		
2 h 30 min	237	0
2 h 40 min		
2 h 50 min	208	2
3 h		
3 h 10 min	231	1
3 h 20 min		
3 h 30 min	208	2
3 h 40 min		
3 h 50 min	212	1
4 h		
4 h 10 min	215	3
4 h 20 min		
4 h 30 min	673	7
4 h 40 min		
4 h 50 min	832	9
5 h		
5 h 10 min		19
5 h 30 min		37
5 h 50 min		52
6 h 10 min		72
6 h 30 min		95
6 h 50 min		97
7 h 10 min		109
7 h 30 min		118
7 h 50 min		
8 h 10 min		133
8 h 30 min		132
8 h 50 min		124
9 h 10 min		127
9 h 30 min		127
9 h 50 min		125

Tableau 26 - Multiplication phagique en une seule étape : suivi de l'apparition des plages de lyse du phage CM20 cultivé sur *R. meliloti*, M18S, en fonction du temps (à partir des tubes FGT et SGT).

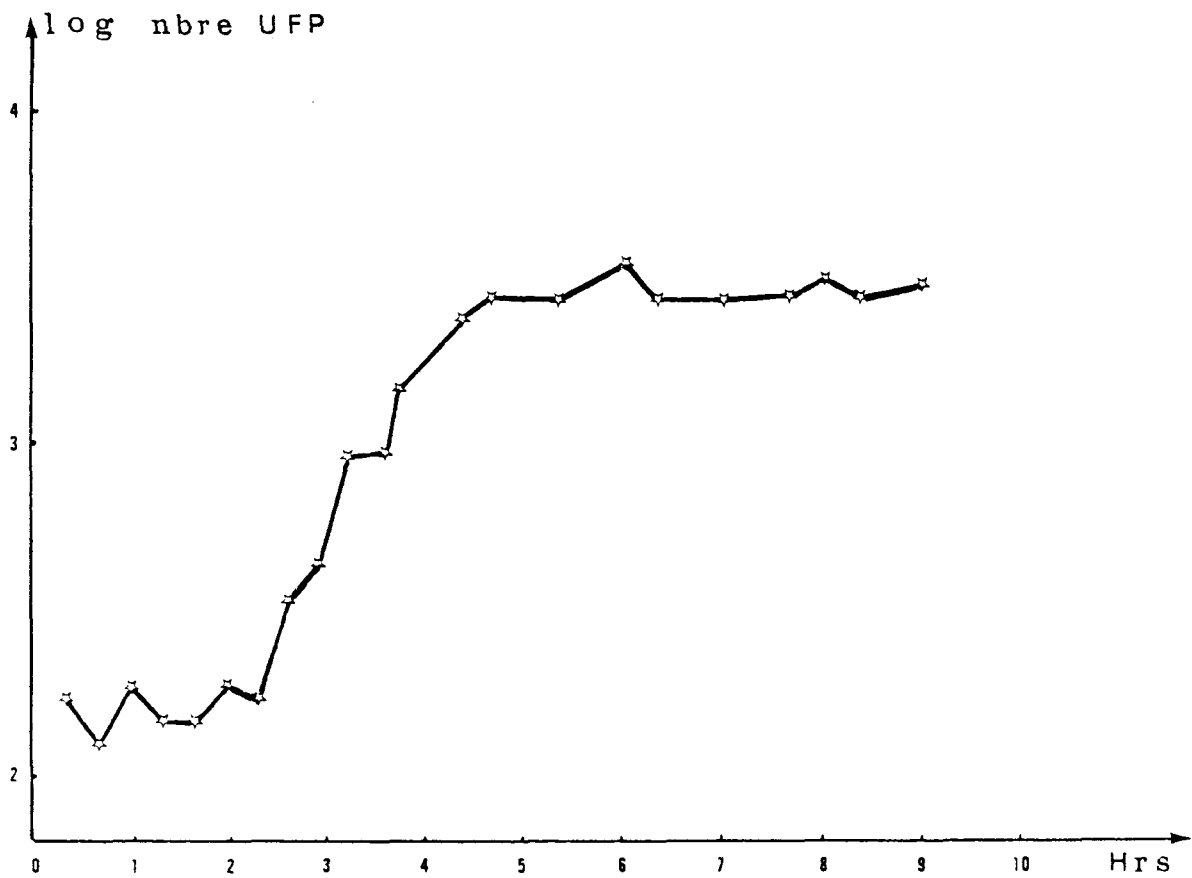


Figure 14 - Représentation graphique de la multiplication phagique en une seule étape du phage NM2 reproduit sur **R. meliloti** M9S.

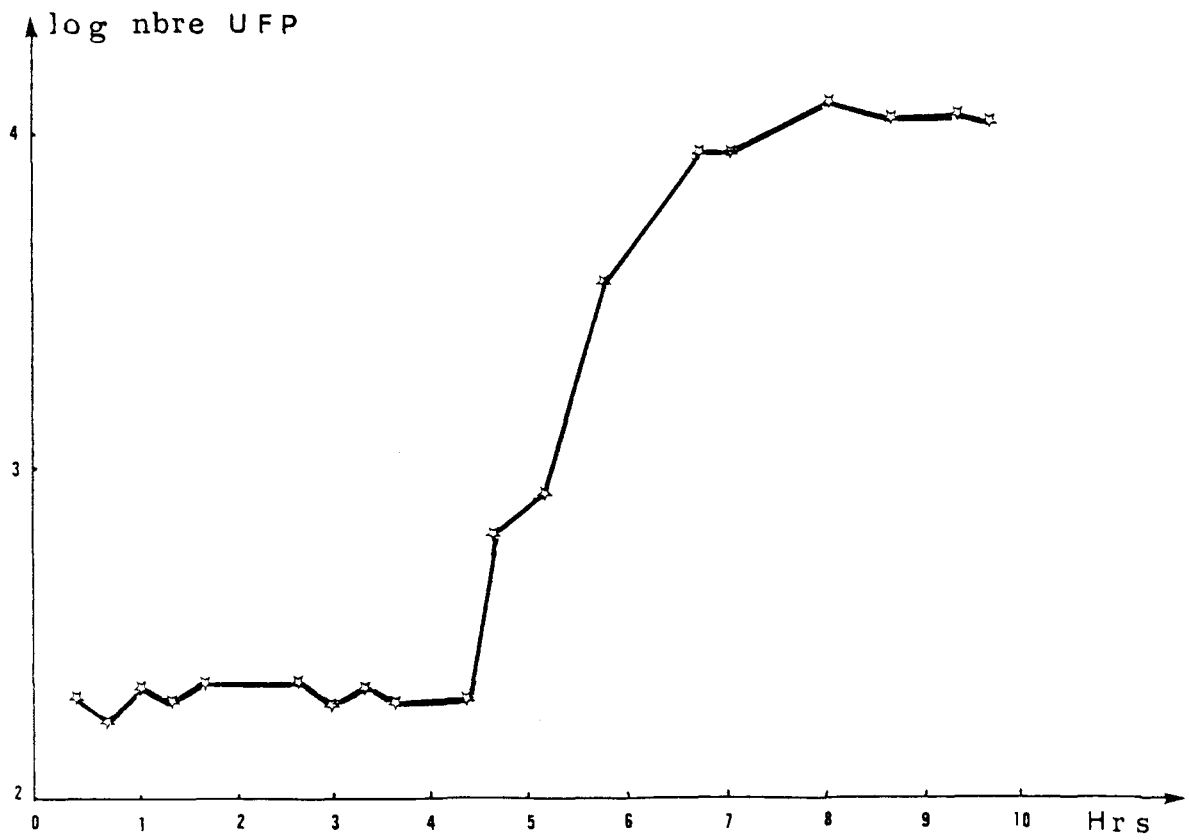


Figure 15 - Représentation graphique de la multiplication phagique en une seule étape du phage CM20 reproduit sur *R. meliloti* M18S.

Dès que toutes les bactéries infectées sont lysées, le nombre de phages demeure constant dans le tube SGT. Si  $N'$  est le nombre moyen de phages numérés à partir du tube SGT, le nombre de phages produits par bactérie s'écrit :  $\frac{100 N'}{N}$ .

Sur le tableau 27, nous avons reporté la durée de la phase de latence et le nombre moyen de phages produits par bactérie, pour les 9 phages étudiés ici.

Phages	Durée de la période de latence	Nombre de phages produits par bactérie
NM1	entre 2 h 00 et 2 h 20	16
NM2	entre 2 h 20 et 2 h 30	18
NM6	entre 2 h 00 et 2 h 20	19
NM7	entre 2 h 20 et 2 h 40	11
CM1	entre 3 h 40 et 4 h 00	57
CM20	entre 4 h 20 et 4 h 40	59
CM21	entre 2 h 00 et 2 h 20	58
CM3	entre 1 h 40 et 2 h 00	111
MMIC	entre 4 h 20 et 4 h 40	38

Tableau 27 - Durée de la phase de latence et nombre de phages libérés par bactérie pour 9 des phages isolés du sol.

Les résultats obtenus sont homogènes en ce qui concerne les phages à queue non contractile, NM1, NM2, NM6 et NM7 ; la période de latence est de l'ordre de 2 h 15 min et le nombre de phages produits par bactérie est de 16 en moyenne. Ces quatre phages étant étroitement apparentés, ce résultat n'a rien de surprenant [WERQUIN **et al.** (277)]. En ce qui concerne les phages à queue contractile, CM1, CM20 et CM21, le nombre de phages produits par bactérie est nettement plus élevé et identique pour les 3 phages. On note cependant des fluctuations dans la durée des périodes de latence. Chez le phage CM3, la phase de latence est très courte et le nombre de phages libérés est le double de celui observé chez les phages CM1, CM20 et CM21 pourtant morphologiquement très proches.

Dans la nature, les deux paramètres, qui sont la phase de latence et le nombre de phages produits par cellule, varient très fortement d'un phage à l'autre. Cette variation peut s'observer aussi bien pour un même phage sur deux hôtes sensiblement différents que dans des conditions d'infectivité ou de croissance différente de la cellule-hôte. Les phages caudés de bactéries à croissance rapide montrent des phases de latence, en général, courtes de l'ordre de 20 à 30 min. Les phages caudés de microorganismes tels les cyanobactéries, les **Rhizobia** et les **Vibrio** présentent au contraire des phases de latence très longues pouvant atteindre 30 à 40 heures pour les cyanophages [ACKERMANN et DUBOW (5)]. Quant au nombre de phages libérés par bactérie, là encore, il est sujet à de nombreuses fluctuations en relation avec le phage, l'hôte ou le système phage-hôte. Il varie entre 2 et 2 000 chez les phages caudés avec une moyenne de 50 à 100 et atteint jusqu'à 20 000 chez les Leviviridae.

## II. - SPECTRES LYTQUES OU SPECIFICITE D'HOTE (HOST-RANGE)

Le résultat de la cohabitation entre un phage et une bactérie quelconque peut se traduire par quatre situations :

- l'infection phagique aboutit à la lyse de la bactérie. La bactérie est sensible au phage. C'est le cas le plus simple ;
- la bactérie n'est pas lysée. Cette situation peut être due à différentes causes :
  - \* la souche bactérienne est résistante, c'est-à-dire que le phage ne reconnaît plus les récepteurs de surface de la bactérie. L'infection avorte donc ;
  - \* la bactérie est "immune" ; elle contient un ADN phagique dont l'expression est inhibée par la présence d'une répression cytoplasmique. C'est le cas d'une bactérie lysogène. Si le phage infectant est sensible au répresseur, il ne pourra pas développer son cycle lytique ;

- \* la bactérie possède un système de restriction-modification (R-M) actif et le phage infectant s'est reproduit auparavant dans une cellule ayant un système R-M différent. Son ADN, en pénétrant dans la bactérie, sera alors systématiquement détruit (les ADN échappant à la restriction le sont à une fréquence de l'ordre de  $10^{-3}$  si la bactérie ne possède qu'un seul système de restriction ; si plusieurs systèmes sont présents, cette fréquence peut atteindre  $10^{-6}$  à  $10^{-10}$ ).

Dès 1926, d'HERELLE (130) montrait que certaines souches de phages étaient spécifiques, s'adsorbant sur une seule espèce bactérienne. A l'opposé, d'autres souches de phages possédaient des "virulences multiples", étant capables de lyser des bactéries appartenant à des genres différents. Il isola ainsi une souche pure de phages capables de lyser à la fois plusieurs espèces de *Shigella*, *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi* B.

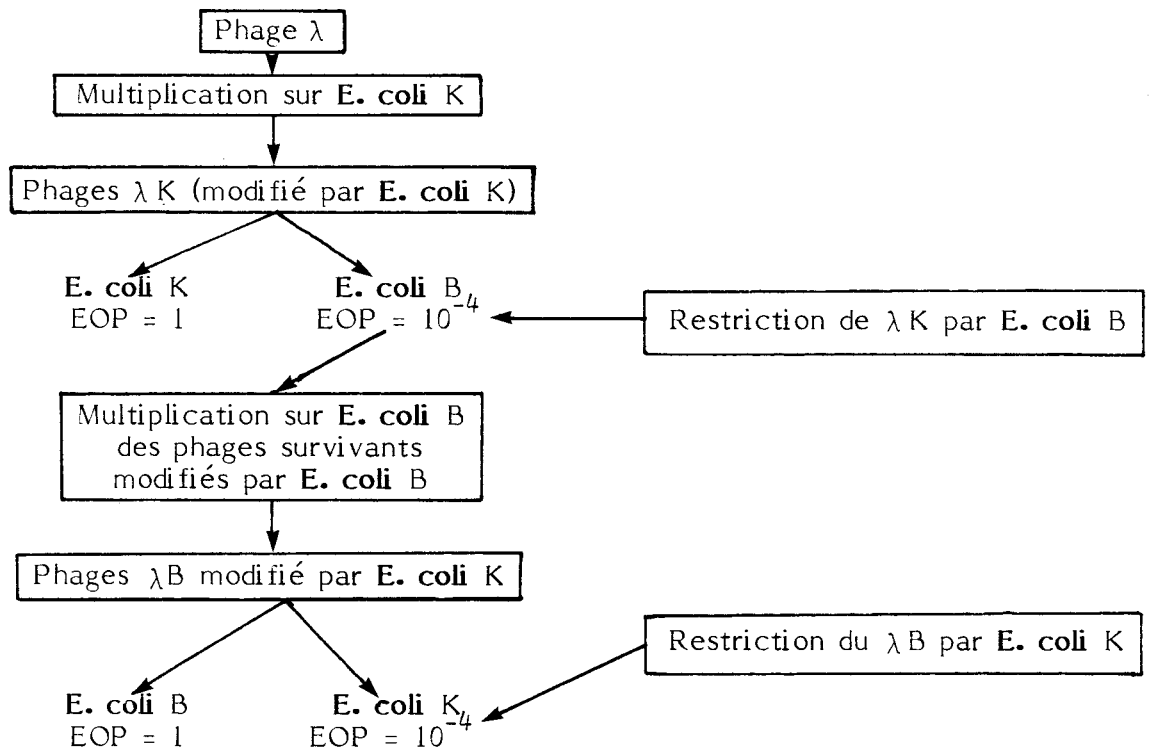
#### A. - Mise en évidence d'une restriction-modification contrôlée par l'hôte chez *Rhizobium meliloti*

Au cours de nos travaux préliminaires à l'établissement de la spécificité d'hôte, nous avons été gêné par la difficulté d'infecter certaines de nos souches par nos phages. Ceci nous a amené à soupçonner la présence d'un phénomène de restriction intense. Ce point particulier des relations bactérie-phage a été étudié en collaboration avec Monsieur Claude DEFIVES.

Soupçonnée dès 1953 par LURIA (185), qui avait observé que le développement phagique dans une bactérie dépendait de la souche dans laquelle les phages s'étaient multipliés auparavant, la restriction-modification contrôlée par l'hôte (R-M) fût décrite pour la première fois, en 1962, par ARBER et DUSSOIX (13) chez le phage  $\lambda$ . Soit un stock de phages  $\lambda$  réalisé sur une souche d'*E. coli* K (phage  $\lambda$  K). Ce stock est titré sur les souches *E. coli* K et *E. coli* B.

L'efficacité d'étalement ou EOP (pour "efficiency of plating") sera égale à 1 dans le cas de son étalement sur *E. coli* K mais très inférieure à 1 (de l'ordre de  $10^{-4}$ ) dans le cas de l'étalement de  $\lambda$  K sur *E. coli* B.

Tous les phages  $\lambda$  K ont pu se développer normalement sur la souche **E. coli** K, et n'ont pas été restreints car la souche K les avaient préalablement modifiés lors de la production du stock précédent. Par contre, ce même phage  $\lambda$  K a vu son développement très inhibé par la souche **E. coli** B. Il y a eu restriction. Cependant, à une fréquence très faible, un phage a échappé à cette restriction. Il n'a pas été reconnu comme étranger et a donc été modifié par la souche **E. coli** B. Ce phage survivant, multiplié sur **E. coli** B et étalé sur les deux **E. coli** K et B, donnera une EOP de 1 sur **E. coli** B et une EOP de l'ordre de  $10^{-4}$  sur **E. coli** K.



Une bactérie peut posséder plusieurs systèmes de R-M. Le système R-M est codé par l'ADN bactérien mais il a été également montré que les plasmides et les prophages peuvent posséder leur propre système de R-M [CHATTORAJ **et al.** (72), GATMAN **et al.** (113), SANDERS et KLAENHAMMER (233), JACOBY et SUTTON (136) (137)]. La R-M déployée par ces plasmides ou prophages viendrait ainsi renforcer la R-M développée par le génome bactérien. En ce qui concerne les **Rhizobia** de la collection du laboratoire, nous savons qu'ils possèdent tous un ou plusieurs plasmides [BECHET et GUILLAUME (27), PINET (216)] et un certain nombre d'entre eux des prophages



[WERQUIN **et al.** (276)]. Pour certaines souches, l'addition de plusieurs systèmes de R-M les rend pratiquement insensibles à l'infection phagique.

La restriction-modification, liée à l'hôte, est réalisée grâce à deux activités enzymatiques : celle d'une endonucléase qui agit sur une séquence cible et une méthylase dont le rôle est de méthyler une base de cette cible. Le phénomène se déroule en trois étapes : la reconnaissance de la séquence cible, le clivage et la modification de celle-ci.

Le phénomène de R-M correspond à une sorte de système immunitaire s'exerçant sur les ADN. Il peut servir de protection contre l'intrusion d'ADN provenant d'autres souches ou d'autres espèces et joue donc un rôle important dans le maintien de l'intégrité génétique d'une espèce.

Les systèmes de R-M répondant aux critères définis par LURIA (185) ont été mis en évidence chez de nombreux procaryotes même d'identification récente tels les **Legionella** [CHEN **et al.** (73)]. En 1985 et 1986, de tels systèmes ont également été découverts chez les archaeobactéries : **Methylophilus methylophorus** [BOYD **et al.** (46)] et **Sulfolobus acidocaldarius** [PRANGISMVILI **et al.** (217)] ainsi que chez des bactéries prototrophes telles **Anabaena flos-aquae** [WITEHEAD and BROWN (282)] et **Spirulina plateusis** [KAWAMURA **et al.** (149)]. En ce qui concerne le genre **Rhizobium**, trois enzymes de restriction sont répertoriés [ROBERTS (224)]. Il s'agit de R1eI isolée de **R. leguminosarum** 300, R1uI de **R. lupini** et RmeI de **R. meliloti**. Seule la séquence cible de R1uI a été déterminée [HEUMANN (132)].

Pour notre part, nous avons mis en évidence que les trois souches de **R. meliloti** M11S, M5N1 et M9S exerçaient une R-M typique sur le phage NM8 [DEFIVES **et al.** (92)]. Nous présentons ici, **in extenso**, la publication dont ce travail a fait l'objet.

## Phage growth restriction by *Rhizobium meliloti*

C. Defives, M. Werquin, M. Ouahal, L. Sahim and J. C. Derieux

Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Techniques, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

### Abstract

Three strains of *Rhizobium meliloti* showed a typical host controlled restriction-modification of rhizobiophage. The release of nucleotides in the medium indicated that the restriction occurred about 12 min after infection. Phage growth restriction was inhibited by heat or chloramphenicol but recovered after one bacterial generation time.

### Introduction

Host controlled phage growth restriction has been found in many bacterial species. It has also been reported in the *Rhizobium* genus. Heumann *et al.* (1984) showed that each class of *Rhizobium* was protected by a specific restriction and modification system.

These activities are coded by the chromosomal DNA but in some instances they could also be correlated with the presence of plasmids or prophages able to code for restriction-modification (Chattoraj *et al.*, 1977; Glatman *et al.*, 1980; Sanders and Klaenhammer, 1981; Jacoby and Sutton, 1977, 1982). Moreover, the discovery of extrachromosomal elements in *Rhizobium meliloti* (Bechet and Guillaume, 1978) opened up the possibility of a strong restriction if several systems are present in the cells.

This paper reports findings that suggest the presence of several RM systems in these cells and shows some modalities of phage growth restriction.

### Materials and methods

#### Bacteria

Three *R. meliloti* wild-type strains, *viz* M11S, M5N1 and M19S, were used. They were isolated in our laboratory and were symbiotic with alfalfa (*Medicago sativa* L.).

#### Bacteriophage

Bacteriophage  $\phi$ NM8 was isolated in screening soil samples for bacteriophages of *R. meliloti* (Krsmanovic-Simic and Werquin, 1973). It was deposited as  $\phi$ 4 in the Bacterial Virus Reference Center, 'Felix d'Herelle', Université Laval, Québec, Canada.

#### Media

*Rhizobium* complex medium (RC) and the overlay agar medium used for phage titration have been described previously (Werquin *et al.*, 1984). R minimal medium (Courtois *et al.*, 1975) contained the following (per litre): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; pH 7.2. It was supplemented by (per litre) biotin, 16  $\mu$ g; thiamine, 500  $\mu$ g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 60 mg; and fructose, 1.8 g.

**Phage assay**

Procedures of phage culture and assay for plaque formers were those of Adams (1959). They were carried out on RC agar medium and overlay agar. Modification types carried by phages were noted by Arber and Linn (1969). For example,  $\phi$ NM8 grown on *R. meliloti* M11S is named  $\phi$ NM8.M11S.

**Phage adsorption**

Adsorption of restricted phage was compared on permissive and non-permissive bacterial hosts. The reaction was stopped by 100-fold dilution with cold R medium containing chloroform, with subsequent centrifugation. Supernatants were assayed for unadsorbed phages by standard procedures (Adams, 1959).

**Detection of free nucleotides in the medium**

*R. meliloti* strains M5N1 and M11S grown in supplemented R medium were infected with  $\phi$ NM8 and incubated at 30°C with gentle shaking. Every 5 min, 2 ml fractions were withdrawn and centrifuged at 10,000  $\times g$  for 20 min. Supernatants were dialysed overnight against cold distilled water. The dialysable fraction was tested for absorbance at 260 nm with a Zeiss PMQII spectrophotometer.

**Effect of culture medium and bacterial growth step on phage growth restriction**

Bacterial growth was followed by optical density measurement at 600 nm. Aliquots of M5N1 growing cells in RC medium and R medium were withdrawn at time intervals, infected with dilutions of restricted phage  $\phi$ NM8.M11S. After 10 min for adsorption, the infected cultures were plated for plaque formers.

**Effect of heating on phage growth restriction**

Cells of *R. meliloti* M5N1 grown to about  $10^8$  cells/ml in RC medium with aeration were heated at 45°C for 1 to 3 min in a water bath, cooled to 30°C and infected with restricted phage  $\phi$ NM8.M11S. After 10 min for adsorption, the infected cultures were diluted and plated for plaque formers.

**Effect of chloramphenicol on phage growth restriction**

Growing cultures of *R. meliloti* M5N1 ( $10^8$  cells/ml) in RC medium with aeration received chloramphenicol at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml. After 15 min chloramphenicol was removed by centrifugation. Thereafter, at time intervals, cells were infected with restricted phage  $\phi$ NM8.M11S. After 10 min for adsorption, suspensions were plated for plaque formers.

**Results****Efficiency of plating (EOP) of phage NM8 grown on various *R. meliloti* strains**

EOP values for  $\phi$ NM8 grown on various strains of *R. meliloti* are shown in Table 1.  $\phi$ NM8 grown on *R. meliloti* M11S formed  $10^4$  and  $10^{10}$  times less plaques on *R. meliloti* M5N1 and M19S, respectively, than on *R. meliloti* M11S, indicating that these hosts restricted the bacteriophage.

**Table 1** Host controlled modification and restriction of  $\phi$ NM8 by three *R. meliloti* strains

Phage multiplied on: (indicator strain)	Strain assay against	Efficiency of plating
M11S	M11S	1
	M5N1	$10^{-4}$
	M19S	$10^{-10}$
M5N1	M5N1	1
	M11S	$10^{-5}$
	M19S	$10^{-6}$
M19S	M19S	1
	M5N1	$10^{-10}$
	M11S	1

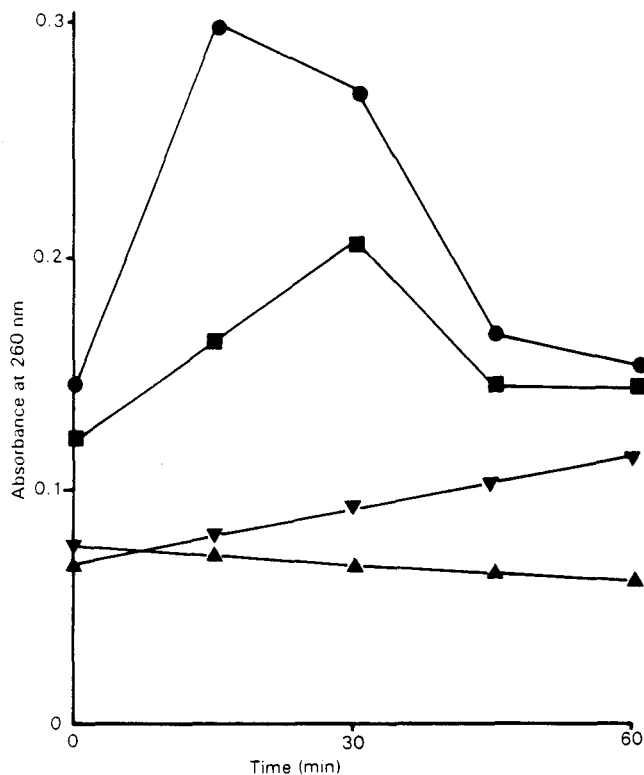
Bacteria were grown in RC medium for 20 h at 30°C. Plaques forming units were counted and results are reported as efficiency of plating relative to an EOP on indicator strain defined as 1.

Similar results were obtained when  $\phi$ NM8 was assayed for plaque-forming units on *R. meliloti* M11S and M19S, EOP values being  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$ , respectively. The restriction of  $\phi$ NM8 by *R. meliloti* M5N1 disappeared after one growth cycle of the bacteriophage on this strain. This is a typical feature of host-controlled modification.

These results were confirmed with  $\phi$ NM8 grown on *R. meliloti* M19S. The corresponding lysate gave a high EOP value on *R. meliloti* M11S, whereas *R. meliloti* M19S restricted the growth of  $\phi$ NM8 propagated on M11S. This indicates that these two strains play an identical part in their restriction system.

**Table 2** EOP of  $\phi$ NM8.M11S on heated cells of *R. meliloti* M5N1

	Duration of heating:			Without heating
	1 min	2 min	3 min	
EOP	$4 \times 10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$3 \times 10^{-5}$



**Figure 1** Absorbance at 260 nm of R medium dialysable fractions: ●, *R. meliloti* M5N1 infected with  $\phi$ NM8 grown on M11S; ■, *R. meliloti* M11S infected with  $\phi$ NM8 grown on M11S; ▼, uninfected *R. meliloti* M5N1; and ▲, uninfected *R. meliloti* M11S.

#### Absorbance of lysates of phage-infected *R. meliloti*

The release of nucleotides during restriction activity was demonstrated by measuring the absorbance at 260 nm in the dialysable fraction of *R. meliloti* M5N1, infected with  $\phi$ NM8 in a synthetic medium. As shown in Figure 1, a peak occurred quickly after the infection and was followed by a decrease after about 15 min. This was probably due to the incorporation of nucleotides by the non-permissive bacteria. For *R. meliloti* M11S infected with  $\phi$ NM8.M11S, a slight and late increase in absorbance was also observed. No explanation could be found for this phenomenon.

#### Adsorption of $\phi$ NM8

The adsorption pattern of  $\phi$ NM8.M11S on *R. meliloti* M11S and M5N1 is shown in Figure 2. Adsorption was very fast, 90% of phages being adsorbed on the permissive (*R. meliloti* M11S) and 83% on the non-permissive host (*R. meliloti* M5N1) in about 1 min. This difference is too small to explain the high divergence in plating efficiency of  $\phi$ NM8.M11S on the *R. meliloti* strains, indicating a restriction rather than a difference in adsorption.

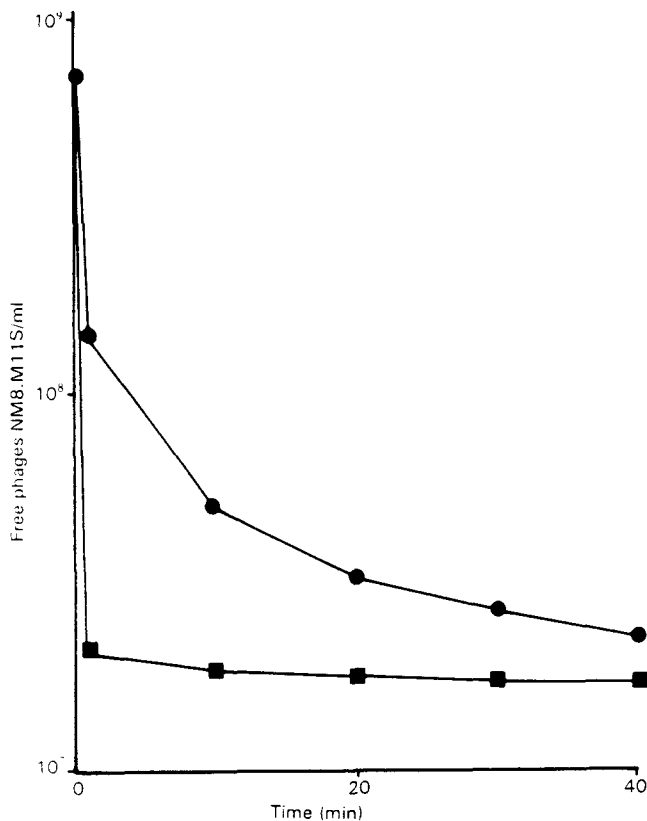
#### Effect of bacterial growth and culture media on EOP

The comparative effects of bacterial growth step and culture media on the EOP of the phage are shown in Figure 3. The curves indicate that *R. meliloti* M5N1 grown in RC medium was more restricting when the culture reached the exponential phase (the EOP value of  $\phi$ NM8.M11S decreased to  $3 \times 10^{-5}$ ). A similar result was obtained with data relative to the R synthetic medium, the difference being EOP.

#### Effect of heating host cells and recovery of restriction ability after heating

The results of exposure of *R. meliloti* host cells to heat are shown in Table 2. The EOP of  $\phi$ NM8.M11S increased with the length of the heat treatment, indicating a restriction decrease.

As time elapsed after heating and before phage infection and plating for plaque formers, the restriction ability was recovered. As shown in Table 3, the EOP decreased gradually with time, reaching the level of unheated cells in about 150 min. Since, under our conditions, the generation time of the cells was 150 min, the recovery appeared to be complete after about one generation.



**Figure 2** Adsorption of  $\phi$ NM8 grown on *R. meliloti* M11S to the ●, non-permissive host *R. meliloti* M5N1 and ■, the permissive host *R. meliloti* M11S.

**Table 3** Recovery of restriction ability by heated cells of *R. meliloti* M5N1

Time lapses between heating and plating (min)	Efficiency of plating of $\phi$ NM8.M11S
0	$4.0 \times 10^{-3}$
5	$3.5 \times 10^{-3}$
20	$3.1 \times 10^{-3}$
40	$2.7 \times 10^{-3}$
150	$3.0 \times 10^{-5}$
Unheated cells	$3.0 \times 10^{-5}$

**Effect of chloramphenicol on phage growth restriction**

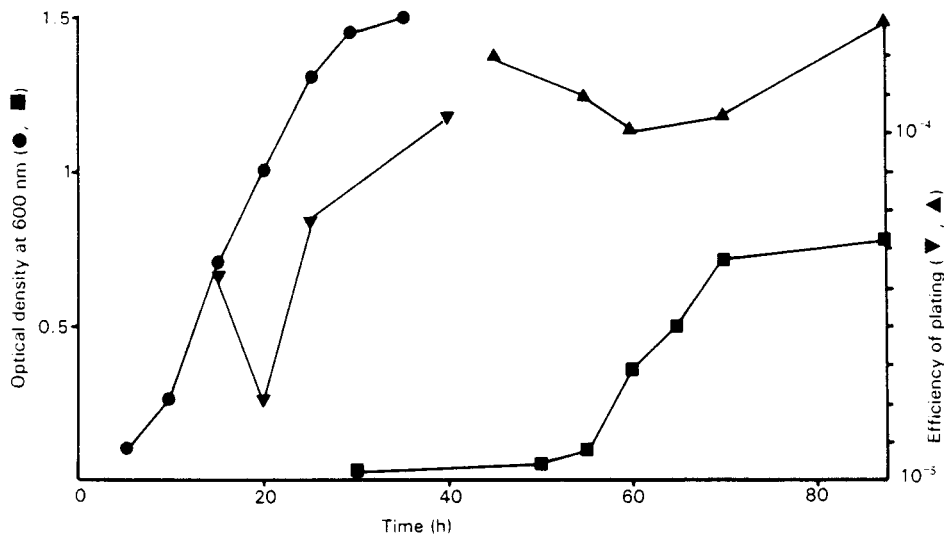
Table 4 illustrates the effect of chloramphenicol. For a treated culture, the EOP remained elevated for about 150 min, returning to the original level in one generation time.

**Discussion**

*R. meliloti* strains M11S, M5N1 and M19S were found to exert typical host controlled modification and restriction on rhizobiophage  $\phi$ NM8. As described by Heumann *et al.* (1984) we found a strong restriction by non-permissive hosts, with an important decrease of phage EOP, suggesting the presence in *R. meliloti* of several restriction-modification systems.

However  $\phi$ NM8.M19S was not restricted by *R. meliloti* M11S which restricted the phage  $\phi$ NM8.M5N1. On the other hand  $\phi$ NM8.M11S was restricted by *R. meliloti* M19S. This result could be explained by the presence in *R. meliloti* M19S of at least two restriction-modification systems, one of which was identical with those of *R. meliloti* M11S. Restriction activity was confirmed by the release of UV (260 nm) absorbing material in the medium where *R. meliloti* M5N1 was a non-permissive host for  $\phi$ NM8.M11S.

It was found that the efficiency of plating of  $\phi$ NM8.M11S was increased when *R. meliloti* M5N1 cells were heated before infection but the effect of heat decreased with the lapse of time between heating and plating. Chloramphenicol treatment before plating raised also the EOP. In these two cases, the EOP increased effect disappeared after about one generation suggesting that restriction systems were injured and could be restored by *de novo* bacterial synthesis. Restriction required protein synthesis and these systems were thermosensitive.



**Figure 3** Effects of *R. meliloti* M5N1 culture media and growth step on phage growth restriction. ●, Growth of *R. meliloti* on RC medium. ▼, EOP of  $\phi$ NM8.M11S on these cells. ■, Growth of *R. meliloti* on R medium. ▲, EOP of  $\phi$ NM8.M11S on these cells.

**Table 4** Recovery of restriction ability by *R. meliloti* M5N1 treated with chloramphenicol

Time intervals after treatment (min)	Efficiency of plating of $\phi$ NM8.M11S
0	$2.5 \times 10^{-3}$
5	$2.4 \times 10^{-3}$
20	$2.0 \times 10^{-3}$
40	$2.0 \times 10^{-3}$
150	$7.0 \times 10^{-5}$
Untreated cells	$3.0 \times 10^{-5}$



### Acknowledgements

We thank Dr Hans-Wolfgang Ackermann, Bacterial Virus Reference Center 'Félix d'Herelle', Université Laval, Québec, Canada, for critical review of this paper, and M. Delecourt for typing the manuscript.

### References

- ADAMS M. H. 1959. *Bacteriophages*. Interscience Publishers Inc., New York.
- ARBER W. and Linn S. 1969. DNA modification and restriction. *A. Rev. Biochem.* **38** 467–500.
- BECHET M. et Guillaume J. B. 1978. Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **24** 960–6.
- CHATTORAJ D. K., Oberoi Y. K. and Bertani G. 1977. Restriction of bacteriophage P2 by the *Escherichia coli* RI plasmid, and *in vitro* cleavage of its DNA by the *EcoRI* endonuclease. *Virology* **81** 460–70.
- COURTOIS B., Derieux J. C. et Hornez J. P. 1975. Etude des polyosides de *Rhizobium* à croissance rapide. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **126B** 3–15.
- GLATMAN L. I., Moroz A. F., Yablokova B. A., Rebentish B. A. and Kcholmina G. V. 1980. A novel plasmid-mediated DNA restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Plasmid* **4** 115–16.
- HEUMANN W., Rösch A., Springer R., Wagner E. and Winkler K. P. 1984. In Rhizobiaceae five different species are produced by rearrangements of one genome, induced by DNA-damaging agents. *Mol. Gen. Genet.* **197** 425–36.
- JACOBY G. A. and Sutton L. 1977. Restriction and modification determined by a *Pseudomonas* R plasmid. *Plasmid* **1** 115–16.
- JACOBY G. A. and Sutton L. 1982. Restriction-modification systems determined by *Pseudomonas* plasmids. *Plasmid* **8** 141–7.
- KRSMANOVIC-SIMIC D. et Werquin M. 1973. Etude des bactériophages de *Rhizobium meliloti*. *C. r. Acad. Sci., Paris* **276** 2745–8.
- SANDERS M. E. and Klaenhammer T. R. 1981. Evidence for plasmid linkage of restriction and modification in *Streptococcus cremoris* KH. *Appl. Environ. Microbiol.* **42** 944–50.
- WERQUIN M., Defives C., Hassani L. and Andriantsimiavona-Otonia M. 1984. Large scale preparation of *Rhizobium meliloti* bacteriophages by fermenter culture. *J. Virol. Meth.* **8** 155–60.

Accepted 22 December 1985

Malgré la présence possible de systèmes de R-M et les inconvénients représentés par des mutations pouvant intervenir aussi bien chez les phages que chez les bactéries employées, l'établissement de la spécificité d'hôte reste un outil intéressant pour l'identification et le classement de souches phagiques. Nous avons réalisé l'activité lytique des 33 phages de notre collection vis-à-vis de 33 souches de **R. meliloti** et sur un groupe de 11 souches composé de 1 souche d'**Agrobacterium tumefaciens**, de 7 de **Bradyrhizobium japonicum**, de 1 de **R. loti** et enfin sur 2 souches de **Rhizobium** de **Galega officinalis**.

### **B. - Préparation des bactéries et des phages**

1 - Les bactéries sont cultivées sur milieu liquide RC fructosé à 1 p100 à 30°C sous agitation pendant 16 heures. La culture est alors diluée dans le même milieu et utilisée en double couche à une concentration d'environ  $8 \times 10^6$  bactéries par ml de gélose molle.

2 - Les phages sont préparés par culture sur boîte de Petri. Les titres obtenus varient selon les phages entre  $4 \times 10^8$  et  $5 \times 10^{10}$  UFP/ml. Il est très important qu'un nombre adéquat et constant de phages soit mis en contact avec les bactéries ; ce nombre devant être le même d'une souche à l'autre et, bien évidemment, d'une expérience à l'autre. Ainsi, LESLEY (175) propose d'appliquer un nombre de phages égal à 10 fois la dilution test standard.

### **C. - Détermination de la dilution test standard (Routine Test Dilution = RTD)**

Les boîtes de Petri, ensemencées avec la souche propagatrice du phage, sont partagées en 8 quartiers. Chacun d'eux reçoit 20  $\mu$ l de la suspension phagique pure et des différentes dilutions au 1/10 jusqu'à  $10^{-6}$ . Le 8ème quartier reçoit 20  $\mu$ l de milieu RC glucosé stérile. Ceci permettra, au cours de la lecture, de repérer les réactions faussement positives dues au phénomène de lavage.

Après un ressuyage de deux heures environ à température ambiante, les boîtes sont portées à l'étuve à 30°C. Les boîtes sont observées et les résultats notés après 24, 36 et 48 heures d'incubation. Toute lyse complète ou partielle du tapis bactérien est considérée comme une réaction positive. Cette expérience

Phages	Titre du stock de phages (UFP/ml)	RTD	Phages	Titre du stock de phages (UFP/ml)	RTD
CM1	$2,6 \times 10^{10}$	$10^{-4}$	Φ 2011S	$4,0 \times 10^8$	$10^{-4}$
CM2	$2,6 \times 10^{10}$	$10^{-4}$	Φ A161	$3,7 \times 10^9$	$10^{-4}$
CM3	$4,0 \times 10^{10}$	$10^{-4}$	Φ FM1	$3,6 \times 10^9$	$10^{-4}$
CM4	$5,0 \times 10^{10}$	$10^{-4}$	Φ LS5B	$4,5 \times 10^9$	$10^{-2}$
CM5	$3,5 \times 10^{10}$	$10^{-4}$	Φ M1-5	$6,0 \times 10^9$	$10^{-4}$
CM6	$7,7 \times 10^9$	$10^{-3}$	Φ M5N1	$5,0 \times 10^9$	$10^{-4}$
CM7	$3,0 \times 10^9$	$10^{-3}$	Φ M11S	$2,8 \times 10^{10}$	$10^{-4}$
CM8	$3,5 \times 10^9$	$10^{-3}$	Φ M14S	$8,5 \times 10^9$	$10^{-4}$
CM9	$1,3 \times 10^{10}$	$10^{-4}$	Φ M20S	$3,5 \times 10^9$	$10^{-5}$
CM20	$3,5 \times 10^{10}$	$10^{-4}$	Φ M23S	$6,5 \times 10^9$	$10^{-4}$
CM21	$3,5 \times 10^9$	$10^{-3}$	Φ M26S	$4,0 \times 10^9$	$10^{-4}$
NM1	$4,0 \times 10^9$	$10^{-4}$	Φ M27S	$1,2 \times 10^{10}$	$10^{-4}$
NM2	$2,2 \times 10^9$	$10^{-4}$			
NM3	$1,8 \times 10^{10}$	$10^{-4}$			
NM4	$1,8 \times 10^{10}$	$10^{-5}$			
NM6	$1,5 \times 10^9$	$10^{-4}$			
NM7	$2,0 \times 10^9$	$10^{-4}$			
NM8	$1,5 \times 10^{10}$	$10^{-4}$			
NM9	$1,3 \times 10^{10}$	$10^{-4}$			
MM1C	$3,5 \times 10^{10}$	$10^{-4}$			
MM1H	$1,0 \times 10^9$	$10^{-3}$			

Tableau 28 - Détermination de la dilution test standard (Routine Test Dilution = RTD).

a été réalisée 3 fois. On évalue ainsi facilement la RTD, c'est-à-dire la plus faible dilution du phage produisant une lyse de l'hôte (tableau 28).

#### **D. - Conditions expérimentales utilisées**

Les 44 souches bactériennes testées sont chacune ensemencées en double couche sur 3 boîtes de Petri carrées (110 x 15 mm) quadrillées en douze parties. 20 µl de la suspension de chaque phage titrant 10 x RTD sont ensuite déposés sur chacune des souches. Après séchage, les boîtes sont placées à l'étuve à 30°C. La lecture des résultats s'effectue comme précédemment après 24, 36 et 48 heures d'incubation. Toutes les manipulations ont été répétées 3 fois.

#### **E. - Résultats et conclusion**

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 29. Deux types principaux de spécificité d'hôte ont été observés. Les phages isolés du sol, en particulier tous les phages du morphotype CM1 et certains membres du morphotype NM8 ont une large activité lytique tandis que les phages isolés de bactéries lysent seulement quelques souches. Phages et bactéries peuvent être groupés grâce à leur spécificité d'hôte. Les différences de comportement entre les phages à l'intérieur d'un même morphotype sont fréquemment mineures et semblent refléter de faibles variations dans les titres phagiques, la dimension des plages de lyse ou dans la sensibilité aux phages des souches bactériennes testées. Seul le morphotype NM1 est totalement homogène, ses cinq membres ne lysant que 2 des 44 souches utilisées. Tous les autres groupes peuvent être subdivisés. Le morphotype CM1 comporte six sous-groupes. Cinq d'entre eux ont des spécificités d'hôte très voisines, cependant le sous-groupe constitué du seul phage CM4 diffère, ne lysant que quelques souches. Le morphotype NM8 apparaît être très hétérogène et comprend un groupe de phages isolés du sol (NM3, NM4, NM8 et NM9) dont la spécificité d'hôte est homogène voisinant avec des phages tempérés à spécificité d'hôte très dissemblable. Enfin, les deux phages à queue courte du morphotype MM1H diffèrent très nettement par leur activité lytique. Le phage MM1H provoque de nombreuses lyses partielles tandis que le phage MM1C ne lyse partiellement qu'une souche. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence, chez les souches sensibles au phage MM1H, de un ou plusieurs systèmes de restriction-modification. Les

**Tableau 29:** Host ranges of phages grouped by morphotype<sup>a</sup>

Bacteria	Lysis pattern <sup>b</sup> of the following phage morphotype:																			
	CM1					ΦM11S		NM1			NM8				MM1H					
	CM1, CM21	CM3, CM6, CM20	CM2, CM9	CM7, CM8	CM5	CM4	ΦM11S, ΦM23S	Φ2011	NM1, NM2, NM6, NM7, ΦM20S	NM3	NM4, NM8	NM9	ΦA161, ΦM1-5, ΦM26S	ΦFM1	ΦM5N1, ΦM14S	ΦM27S	ΦLS5B	MM1C	MM1H	
LS18, M20S	v	v	v	v	v															
M2S	CL	CL	v	v																
M3S	CL	CL													CL					
LS2A		CL	CL		CL	CL				CL	CL	CL						CL		
M5S	CL	CL	CL	CL	v	v				v	v							CL	v	
M11S	CL	CL	CL	CL	v	CL				CL	CL	CL							v	
M19S, M27S	CL	CL	CL	CL	v	v	CL			CL	CL	v							v	
444	CL	CL	CL	CL	CL	v	CL	CL		CL	CL	CL	CL		v	v	v	v	v	
L5-30	CL	CL	CL	CL	CL	CL	v	CL		CL	v		CL	v					v	
M13S	CL	CL	CL	CL	v		v		CL	CL	CL	CL					CL	v	v	
M9S	CL	CL	v	v	v				CL	v									v	
M22S, Rh21, U45		v	v	v	v					CL	v	v		CL					v	
M14S	CL	CL	CL	CL	CL														CL	CL
A161, E12, MVII-1, M5N1, M12S, M18S, M26S, M28S, 102F34, 2009	CL	CL	CL	CL	v															
Origin of phages	S	S	S	S	S	S	B	B	S or B	S	S	S	B	B	B	B	B	S	S	

<sup>a</sup> No lysis was observed on *R. meliloti* M1-5, M10S, M15S, M23S, M29S, and 2004 or on *A. tumefaciens* (1 strain), *B. japonicum* (7 strains), *R. loti* (1 strain) and *Galega rhizobia* (2 strains).

<sup>b</sup> Abbreviations: CL, confluent lysis; v, variable lysis (isolated plaques to semiconfluent lysis); S, soil; B, bacteria.

phages de notre collection ne lysent que des souches de **R. meliloti** et aucun des 11 autres genres bactériens testés. Ce résultat est en parfait accord avec la conclusion des travaux de STANIEWSKI (248) sur l'étroite spécificité des phages du genre **Rhizobium**.

### III. - MORPHOLOGIE ET MENSURATIONS DES PHAGES

L'identification et la classification des phages passent inéluctablement par leur observation au microscope électronique. C'est en 1940 que le microscope électronique a été pour la première fois utilisé à l'étude des phages par RUSKA (232) et par PFANKUCK et KAUSCHE (215).

Pour être convenablement observées, les particules phagiques doivent subir un traitement qui permet d'en augmenter le contraste. La technique employée, appelée "coloration négative" ou "méthode de contraste négatif" mise au point par BRENNER et HORNE (50), est maintenant universellement utilisée.

Cette technique consiste à envelopper les particules à observer d'une substance dense aux électrons (un sel de métal lourd) de telle sorte que l'échantillon apparaisse blanc sur fond noir au microscope électronique. Cette technique permet d'avoir une vue tridimensionnelle de l'objet et d'en apprécier plus facilement les dimensions. Le matériau dense aux électrons doit avoir une densité sensiblement double de celle des particules. Il doit être hautement soluble dans l'eau et la chaleur dégagée par le bombardement électronique ne doit pas en provoquer l'évaporation.

Parmi les produits employés pour les colorations négatives, ce sont les sels de potassium et de sodium de l'acide phosphotungstique d'une part et l'acétate d'urane, d'autre part, qui représentent la quasi totalité des utilisations.

Le phosphotungstate de potassium (PT) en solution aqueuse réagit peu ou pas du tout avec les particules phagiques, ne produisant de ce fait que des réactions de coloration négative. Le contraste est fréquemment faible et le bruit de fond est peu important. Sous l'effet du faisceau d'électrons, le colorant tend cependant à former des gouttelettes. Les têtes de phages, colorées au PT, s'arrondissent et s'aplatissent souvent, pouvant éclater chez

les phages particulièrement fragiles. Cependant, les angles et les faces des têtes sont plus facilement observables que lorsque l'on utilise l'acétate d'urane [ACKERMANN *et al.* (7)]. La résolution des queues phagiques est en général bonne ; cependant, les striations sont parfois difficiles à observer. Les queues non contractiles présentent en général un aspect courbé [ACKERMANN et DUBOW (5)].

Parmi les sels d'uranium, l'acétate d'urane (AU) en solution aqueuse est le plus employé. Il permet d'obtenir des colorations très fiables, très bien contrastées et à bruit de fond faible. Agissant comme un fixateur, l'AU préserve en général mieux les phages que le PT. Pour la même raison, les têtes à contours pentagonaux sont plus facilement observées que lors d'une coloration au PT. En général, les queues des phages restent rectilignes, leurs striations sont, ainsi que les fibres caudales, facilement visibles [ACKERMANN et DUBOW (5)].

Le principal désavantage de la coloration à l'acétate d'urane réside dans son caractère imprévisible. L'AU a, en effet, tendance à cristalliser sur la grille donnant naissance à des cristaux en forme d'aiguilles ou de lames de couteaux crantées. Dans certains cas, le phage lui-même sert de "starter" à la cristallisation et se trouve ainsi grossièrement déformé ; les têtes semblent posséder deux capsides et la structure de la queue n'est pas observable. D'autre part, et c'est le désavantage le plus important, l'AU cause de nombreuses colorations positives entraînant des rétrécissements très importants des têtes [ACKERMANN *et al.* (7)]. Dans une même préparation, on peut rencontrer côte à côte deux particules colorées, l'une négativement et l'autre positivement et il existe également des intermédiaires, ce qui rend d'autant plus difficile l'interprétation des images. Des précautions doivent donc être prises lors de la mensuration des phages.

D'autres techniques, telles l'ombrage ou les coupes ultrafines, réalisées dans des culots de phages, ont été également utilisées. Cependant, les traitements drastiques que subissent les préparations (déshydratation pour l'ombrage, déshydratation, fixation, inclusion et coloration dans le cas des coupes) font subir des déformations aux têtes de phages. L'utilisation des coupes ultrafines ne reste employée que pour l'observation du développement intracellulaire des virus ou des phages.

### **A. - Préparation des échantillons**

Les suspensions phagiques filtrées sur Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  sont centrifugées à 70 000 g pendant 90 min (ultracentrifugeuse Beckman L8-70M, rotor SW50-1). Le culot est lavé deux fois dans de l'acétate d'ammonium 0,1 M, pH 7,0 ou 5,0, également stérilisé par filtration. Les échantillons peuvent ainsi être conservés plusieurs jours à - 20°C dans les tubes de centrifugation en nitrate de cellulose.

### **B. - Colorations**

A l'aide d'une pipette Pasteur effilée, une microgoutte de chaque culot est déposée sur une grille porte objet, préalablement pourvue d'une membrane de Formvar (0,2 à 0,5 p100) ou de Collodion (0,5 à 4 p100) dans l'acétate d'isoamyle et renforcée de carbone évaporé sous vide (évaporateur EDWARDS 12E6). Les phages sont colorés avec des solutions aqueuses d'acétate d'urane  $4,7 \times 10^{-2}$  M, pH 4,5, ou de phosphotungstate de potassium  $7 \times 10^{-3}$  M, pH 7,2 additionnées de 50  $\mu\text{g}$  par ml de bacitracine qui fait office d'agent mouillant [GREGORY et PIRIE (120)]. Les grilles sont ensuite conservées à l'abri de la poussière dans une boîte de Petri.

### **C. - Observation des échantillons et microphotographies**

Les échantillons sont examinés au microscope électronique Phillips EMB300 sous une tension d'accélération de 60 KV en utilisant le diaphragme objectif de 30  $\mu\text{m}$ . Les particules phagiques sont photographiées à divers grossissements sur film KODAK 35 mm (KODAK FINE GRAIN POSITIVE FILM) puis les négatifs sont agrandis et tirés sur papier EKTAMATIC SC KODAK en utilisant un agrandisseur DURST S.45. Au moins deux clichés de cristaux de catalase, au même grossissement que l'échantillon, sont réalisés pour chaque film de 36 poses afin d'être en mesure de calibrer l'agrandisseur selon la technique proposée par LUFTIG (184).

Dans ce travail, la presque totalité des clichés ont été réalisés en employant un grossissement initial de 29 700 suivi d'un agrandissement d'exactly 10 fois, contrôlé et calibré avec les cristaux de catalase. En effet, il est reconnu



et admis qu'un grossissement final de 300 000 est idéal pour réaliser les photographies destinées aux mensurations des phages et à être présentées pour publication.

#### **D. - Résultats et conclusion**

Pour chaque suspension phagique et pour chaque coloration, au moins 20 particules doivent être photographiées. Lors de l'observation de phages morphologiquement identiques, la mesure de 5 particules suffit à condition que le total des particules observées par morphotype atteigne 20. Les mensurations doivent être effectuées sur des photographies et non pas sur des images projetées. Seuls les phages colorés négativement doivent être mesurés et tous les caractères morphologiques notés. Les dimensions des têtes phagiques sont relevées entre deux sommets opposés. Dans le cas de la mensuration de têtes isométriques, icosaédriques par exemple, la distance qui sépare les sommets de leurs opposés n'étant pratiquement jamais identique sur les microphotographies, il est nécessaire de relever les trois intervalles qui séparent deux sommets opposés et d'en faire la moyenne.

#### **I - Dimensions**

Chacun des 33 phages de notre collection a été coloré négativement à l'AU et au PT, observé et mesuré. Il serait fastidieux et inutile de reporter toutes les mesures que nous avons relevées pour chaque phage. Cependant, nous donnerons ici un aperçu du travail réalisé en prenant comme exemple le phage NMI (tableau 30).

Les mensurations des différents phages sont ensuite regroupées par morphotype et les dimensions sont définitivement établies en effectuant la moyenne des différentes mesures (tableaux 31 à 35).

Enfin, les différents phages sont ensuite réunis par famille pour donner les résultats définitifs (tableau 36).

Les dimensions des phages colorés à l'AU ou au PT concordent. Cependant, le diamètre de la tête du phage CMI apparaît plus important coloré au PT qu'à l'AU. Cette observation trouve son explication dans le fait que l'on assiste

Coloration		AU			PT				
Cliché n°	Tête		Queue		Cliché n°	Tête		Queue	
	S (cm)	L (cm)	L (cm)	D (cm)		S (cm)	L (cm)	L (cm)	D (cm)
387	- 28	6,15	3,40	0,30	- 19	6,35	3,50	0,25	
	- 28	5,90	3,50	0,25	- 20	6,60	3,60	0,30	
	- 29	5,80	3,30	0,25	383	6,45	3,60	0,25	
	- 30	6,10	3,30	0,25	- 21	6,60	3,60	0,25	
	- 30	6,05	3,50	0,30	- 22	6,60	3,60	0,25	
388	- 31	6,00	3,40	0,20	- 23	6,55	3,55	0,30	
	- 2	6,00	3,30	0,25	- 24	6,10	3,50	0,25	
	- 5	6,00	3,50	0,25	383	6,35	3,40	0,30	
	- 5	6,00	3,40	0,30	- 26	6,65	3,60	0,25	
	- 6	6,10	3,40	0,30	- 27	6,30	3,50	0,25	
	- 6	5,90	3,50	0,30	390	6,35	3,30	0,30	
388	- 6	6,10	3,40	0,25	- 4	6,55	3,45	0,30	
	- 6	6,10	3,50	0,30	391	6,45	3,20	0,25	
	- 3	6,00	3,50	0,30	- 2	5,95	3,45	0,25	
- 3	6,10	3,40	0,25	- 3	6,05	3,50	0,25		
390	- 3	5,80	3,30	0,25	- 4	6,35	3,40	0,25	
	- 3	5,90	3,50	0,30	- 5	5,90	3,35	0,30	
	- 3	5,90	3,60	0,25	391	6,50	3,25	0,25	
	- 1	6,00	3,10	0,25	- 7	6,40	3,30	0,25	
	- 2	6,00	3,30	0,30	- 9	6,35	3,50	0,25	
Somme	119,90	68,10	5,40		Somme	127,30	69,15	5,00	
: 3	40,00			: 3	42,43				
: 20	2,00	3,40	0,27	: 20	2,12	3,45	0,25		
: 297 x 10 <sup>-4</sup>				: 297 x 10 <sup>-4</sup>					
Dimensions	67,30 nm	114,00 nm	9,20 nm	Dimensions	71,40 nm	116,40 nm	8,41 nm		

Tableau 30 - Relevé des dimensions du phage NMI.

S (cm) représente la somme des 3 distances séparant 2 sommets opposés en cm ; L (cm), la longueur de la queue en cm ; D (cm), le diamètre de la queue en cm.

Phages	Origine	AU			PT				
		N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)	N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)
Φ CMI <sup>(b)</sup>	sol	7	96,6	4	101,8				
Φ CM2	"	8	106,2	7	111,0				
Φ CM3	"	20	99,0	20	101,5	20	104,3	21	95,4
Φ CM4	"	6	86,5	10	98,3				
Φ CM5	"	7	94,0	6	102,0	4	102,5	3	85,3
Φ CM6	"	2	105,0	2	110,0				
Φ CM7	"	5	108,0	5	108,0	4	111,0	4	91,0
Φ CM8	"	5	100,0	5	100,0	8	105,4	10	95,0
Φ CM9	"					5	106,4	5	103,0
Φ CM20	"	5	88,6	5	100,0	5	110,0	6	98,0
Φ CM21	"	7	94,6	6	101,5	6	114,0	6	96,0
Dimensions du morphotype		72	97,8	70	103,4	52	107,0	55	96,0

Tableau 31 - Mensurations des phages du morphotype CMI.

(a) : nombre de têtes et queues mesurées pour chaque phage et au total pour le morphotype ; (b) phage type.

Phages	Origine	AU				PT			
		N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)	N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)
Φ M11S <sup>(b)</sup>	tempéré	10	61,5	5	123,8				
Φ M23S	"	15	65,0	15	130,0	11	63,0	6	118,0
Φ 2011	"	6	68,0	6	127,0	9	65,0	7	122,0
Dimensions du morphotype		31	64,5	26	126,9	20	64,0	13	120,0

Tableau 32 - Mensurations des phages du morphotype ΦM11S.

(a) : nombre de têtes et queues mesurées pour chaque phage et au total pour le morphotype ; (b) phage type.

Phages	Origine	AU				PT			
		N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)	N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)
NM1	sol	20	67,3		114,0	20	71,5		116,4
NM2	"	5	68,5		105,0	6	68,5		106,0
NM6	"	9	69,0		115,0	9	76,5		116,0
NM7	"	6	68,7		104,0	5	71,0		111,0
Φ M20S	tempéré	15	74,0	10	104,0	8	68,7	6	108,0
Dimensions du morphotype		55	69,5	50	110,3	48	71,5	46	113,9

Tableau 33 - Mensurations des phages du morphotype NM1.

(a) : nombre de têtes et queues mesurées pour chaque phage et au total pour le morphotype ; (b) phage type.

Phages	Origine	AU			PT				
		N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)	N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)
NM3	sol	10	67,2	7	119,5				
NM4(b)	"	12	67,3	12	105,3				
NM8	"	10	60,8	10	114,4	10	63,0	10	117,0
NM9	"	7	61,4	5	104,0	10	64,3	10	114,8
ΦHI6I	tempéré	14	60,0	9	111,0				
ΦFM1	"	6	64,1	4	103,0				
ΦLS5B	"					19	63,4	13	99,6
ΦM1-5	"	7	63,0	4	100,6				
ΦM5 N1	"	5	58,0	4	108,0				
ΦM14S	"	7	66,0	6	110,0				
ΦM26S	"	11	68,2	12	120,0				
ΦM27S	"	3	66,0	3	108,0				
Dimensions du morphotype		92	63,9	76	110,9	39	63,5	33	109,3

Tableau 34 - Mensurations des phages du morphotype NM8.

(a) : nombre de têtes et queues mesurées pour chaque phage et au total pour le morphotype ; (b) phage type.

Phages	Origine	AU				PT			
		N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	N <sup>(a)</sup>	Queue (nm)	N <sup>(a)</sup>	Tête (nm)	Queue (nm)	
MMIC <sup>(b)</sup>	sol	13	61,2	4	13,0	5	56,0	5	13,0
MMIH	"	7	56,0	3	10,0				
Dimensions du morphotype		20	58,5	7	11,5	5	56,0	5	13,0

Tableau 35 - Mensurations des phages du morphotype MMIH.

(a) : nombre de têtes et queues mesurées pour chaque phage et au total pour le morphotype ; (b) phage type.

(a)  
Dimensions des phages colorés par :

Famille Phage type	Membres	AU			PT
		Tête (nm)	Queue (nm)	Queue (nm)	
<u>Myoviridae</u>					
CM1	CM2, CM3, CM4, CM5, CM6, CM7, CM8, CM9, CM20, CM21	98	103 x 17	107	96 x 16
<u>Siphoviridae</u>					
ΦM11S	ΦM23S, Φ2011	65	127 x 10	64	120 x 9
NM1	NM2, NM6, NM7, Φ M20S	70	110 x 8	72	114 x 8
NM8	NM3, NM4, NM9, Φ A161, ΦFM1, Φ LS5B, Φ M1-5, Φ M5 N1, Φ M14S Φ M26S, Φ M27S	64	111 x 8	64	109 x 8
<u>Podoviridae</u>					
MM1H	MM1C	59	12 x 8	56	13 x 8

Tableau 36 - Tableau récapitulatif des dimensions des 33 phages de *R. meliloti* étudiés.

(a) l'erreur est estimée à 2 ou 3 %.



souvent à un léger aplatissement des têtes phagiques en coloration à l'AU. Les phages colorés positivement à l'AU montrent toujours des têtes aux dimensions réduites et ne sont jamais mesurés.

## 2 - Morphologie et caractéristiques phagiques

Les résultats des observations au microscope électronique, après coloration à l'AU et au PT des 33 phages étudiés dans ce travail, sont consignés dans les planches suivantes et les légendes leur correspondant (planches 1 à 9).

Tous les phages possèdent des têtes isométriques, de longues queues contractiles ou non ou des queues courtes et correspondent aux trois premiers types morphologiques A, B et C de BRADLEY ou aux trois Familles des **Myoviridae**, **Siphoviridae** et **Podoviridae** selon MATTHEWS (196). Tous nos phages sont à tête icosaédrique comme le révèle la présence, sur la même préparation, de capsides à contours hexagonaux et pentagonaux.

### La Famille des **Myoviridae** (groupe A de BRADLEY) - planches 1, 2 et 3

Cette famille est représentée par le morphotype CMI constitué de 11 phages identiques possédant une tête icosaédrique de 57 nm de côté (mesuré sur les têtes à contours pentagonaux) et d'un diamètre de 98 nm ou 107 nm selon qu'il s'agit d'une observation après coloration à l'AU ou au PT. L'épaisseur de la capside a été estimée à 3 nm. Les capsomères sont indénombrables. Tous les phages montrent une queue contractile de structure complexe pourvue : d'un cou de 8 nm, d'un manchon présentant 22 striations mesurant 40 x 24 nm lorsqu'il est contracté, d'une plaque basale de 34 x 3 nm supportant 6 crampons en forme de massue mesurant 12 x 7 nm et au moins deux fibres caudales de 64 x 2 nm. Le cou possède un collier minuscule de 13 x 2 nm. Très souvent, les fibres caudales sont observées repliées le long de la queue.

### La Famille des **Siphoviridae** (groupe B de BRADLEY) - planches 4, 5, 6, 7 et 8

Elle regroupe les phages à queue longue et non contractile et est constituée de trois morphotypes de taille pratiquement semblable,  $\Phi$ M11S, NM1 et NM8.

Le morphotype  $\Phi$ M11S est constitué de 3 phages (planche 4). Leurs queues, qui apparaissent plus ou moins rigides sur les préparations colorées à l'AU et flexibles sur celles colorées au PT, présentent une structure de 27 nm de large pouvant correspondre à une plaque basale ornée d'une série de petits crampons de 10 x 5 nm. Le diamètre de la queue est de 10 nm en coloration à l'AU et de 9 nm en PT. La gaine de la queue possède environ 38 striations dont la périodicité est estimée à 2 ou 4 nm. La tête est icosaédrique de 32 nm de côté et d'un diamètre de 65 nm ou 64 nm selon qu'il s'agit d'une observation après coloration à l'AU ou au PT. Les capsomères sont indénombrables.

Le morphotype NM1 est constitué de 5 phages (planches 5 et 6). Ils montrent une tête icosaédrique de 33,7 nm de côté et d'un diamètre de 70 ou 72 nm selon la coloration. Les capsomères sont indénombrables mais leur agencement est néanmoins visible. Comme pour les phages du morphotype  $\Phi$ M11S, les queues apparaissent rigides en coloration à l'AU et flexibles en PT. D'un diamètre de 8 nm, elles présentent des barres transversales au nombre de 12 ou 13 en moyenne, de dimension 14 x 3 nm, et apparaissant avec une périodicité moyenne de 11 nm. L'extrémité de la queue est pourvue de 6 crampons en forme de masse de 14 x 8,5 nm.

Le morphotype NM8 (planches 7 et 8) est constitué de 12 phages à queue rigide et effilée de 8 nm de diamètre montrant 24 striations de 4 nm de périodicité. L'extrémité de la queue est pourvue de 3 crampons de 17 x 2,5 nm. La tête de ces phages est icosaédrique de 37 nm de côté et de 64 nm de diamètre quelle que soit la coloration. L'épaisseur de la capsid e a été estimée à 3 nm. Les capsomères sont indénombrables.

#### La Famille des **Podoviridae** (groupe C de BRADLEY) - planche 9

Elle est représentée par le morphotype MM1H constitué de 2 phages à tête icosaédrique de 33,5 nm de côté, de 59 nm en coloration à l'AU et 56 nm lorsque coloré au PT. La queue petite mesure 8 nm de diamètre, quelle que soit la coloration employée. Elle possède au moins deux crampons en forme de club de golf mesurant 12 x 7 nm.

En conclusion, l'aspect morphologique et les mensurations des bactériophages observés ici nous permettent de supposer que les cinq morphotypes décrits correspondent à 5 espèces différentes. Parmi ceux-ci, le morphotype CMI a été très souvent décrit et est maintenant considéré comme le phage le plus courant chez **R. meliloti**. Un phage du même type, le phage  $\Phi$ M12S, est d'ailleurs connu comme étant un phage transducteur [FINAN **et al.** (106)].

Les phages du morphotype NMI montrent un aspect peu ordinaire chez les phages de **Rhizobium** de par la présence de barres transversales sur la queue. Cette particularité a été observée chez quelques phages non apparentés d'**Acetobacter**, de **Dactylosporangium**, de **Streptomyces** et de **Vibrio** [STUTTARD et DWYER (257)].

Les phages des types NM8 et MMIH semblent appartenir respectivement aux espèces représentées par les phages 317 [LEY **et al.** (176)] et  $\Phi$ 2042 [PATEL (213)].

Le type  $\Phi$ M11S, par contre, ne correspond à aucun phage de **Rhizobium** décrit à ce jour et doit être considéré comme une nouvelle espèce [WERQUIN **et al.** (232)].

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

**Planche 1 : Phages de la Famille des Myoviridae (groupe A de BRADLEY)**

Morphotype CM1

Vue d'ensemble du phage CM3 coloré à l'AU. La plupart des particules sont intactes et présentent des têtes à contours hexagonaux.

Grossissement 92 400. La barre représente 100 nm.

planche 1



Planche 2 : Phages de la Famille des Myoviridae (groupe A de BRADLEY)

Morphotype CM1

- photo a** : phage CM3 coloré à l'AU présentant une tête hexagonale, une queue non contractée et au moins une fibre caudale repliée le long de la queue (flèche) ;
- photo b** : coloration au PT du phage CM20 montrant une face triangulaire de la tête ;
- photo c** : coloration à l'AU d'une particule du phage CM1 montrant les stries du manchon de la queue et la présence d'un collier (flèche). Trois des fibres caudales sont nettement visibles (flèches).
- photo d** : phage CM3 coloré à l'AU montrant une forme pentagonale indicatrice d'une structure icosaédrique de la tête ;
- photo e** : queue isolée du phage CM1 coloré au PT montrant 6 crampons et au moins deux fibres (flèches) ;
- photo f** : coloration au PT d'une particule du phage CM5 et d'une queue contractée (flèche).

Les 6 photos de cette planche sont au grossissement 297 000. La barre représente 100 nm.

planche 2



a



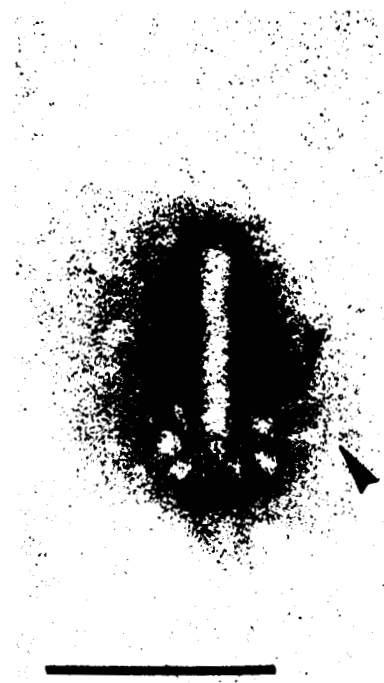
b



c



d



e



f



Planche 3 : Phages de la Famille des Myoviridae (groupe A de BRADLEY)

Morphotype CM1

**photo a** : coloration à l'AU du phage CM4 présentant deux aspects différents. En haut, particule intacte colorée parfaitement. En bas : tête à contour pentagonal. La queue est repliée sous la particule phagique (flèche) ;

**photo b** : phage CM3 coloré au PT montrant à la fois le collier situé contre la tête et la queue, les crampons caudaux et deux fibres caudales (flèches) ;

**photo c** : coloration à l'AU d'une particule anormale du phage CM5 possédant deux queues ;

**photo d** : phage CM7 coloré à l'AU montrant un aspect particulier de l'insertion de la queue ;

**photo e** : coloration positive du phage CM4 à l'AU induisant une réduction importante des dimensions de la tête.

Toutes les photos de cette planche sont au grossissement 297 000. La barre représente 100 nm.

planche 3



a



c



d



e

Planche 4 : Phages de la Famille des Siphoviridae (groupe B de BRADLEY)

Morphotype  $\Phi$ M11S

**photos a, b et c** : particules des phages  $\Phi$ 2011S,  $\Phi$  M11S et  $\Phi$ M23S respectivement, colorées à l'AU. Les queues sont plus ou moins rigides et apparaissent striées (surtout sur la photo a). Elles présentent à leur extrémité une structure pouvant correspondre à une plaque basale munie de petits crampons ;

**photo d** : vue de deux particules du phage  $\Phi$  M11S colorées à l'AU, l'une possédant une queue rectiligne, l'autre une queue courbée.

Ces quatre photos sont au grossissement 29 700. La barre représente 100 nm.

planche 4

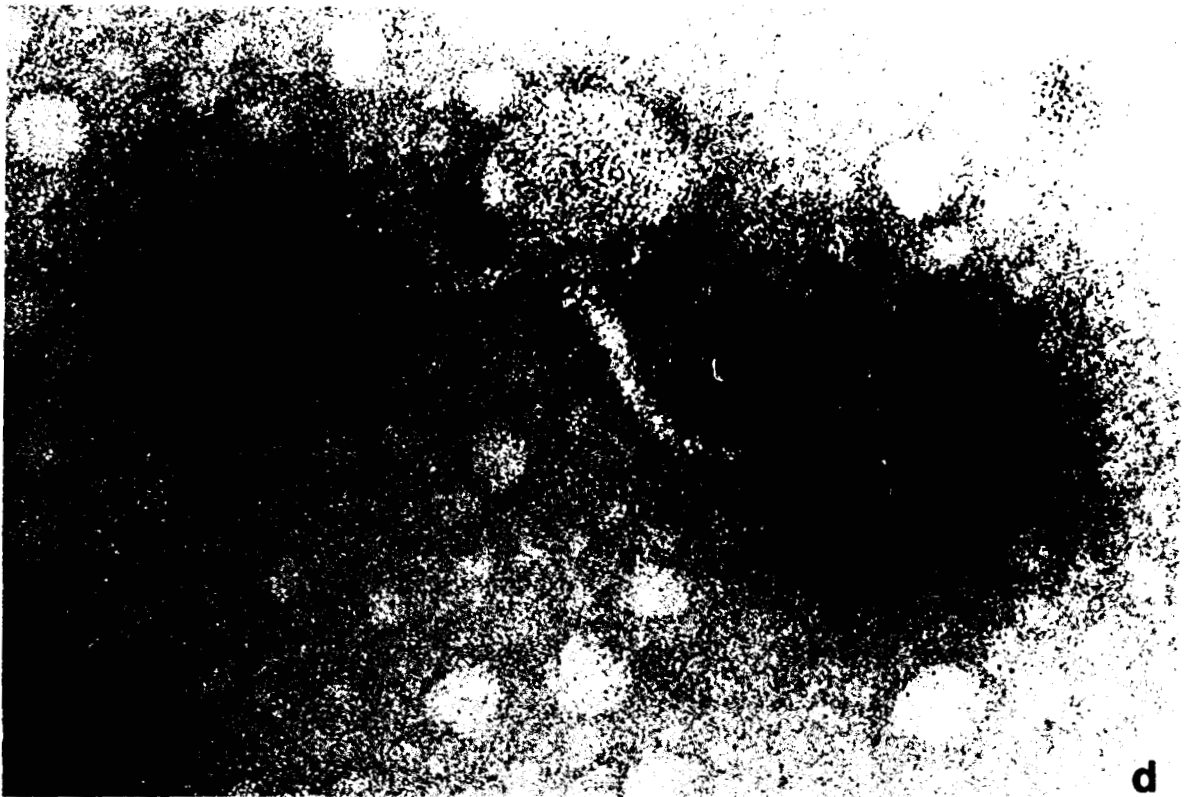
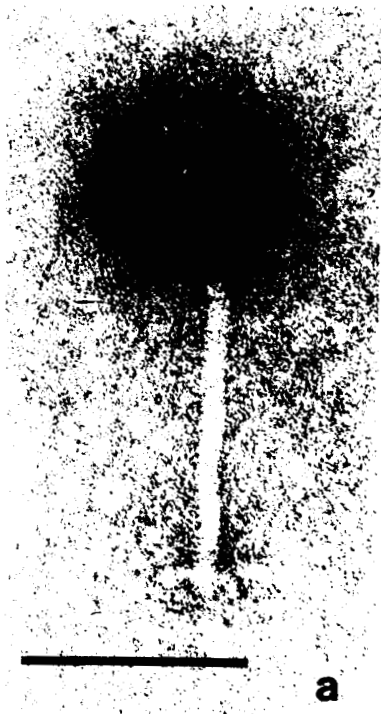


Planche 5 : Phages de la Famille des Siphoviridae (groupe B de BRADLEY)

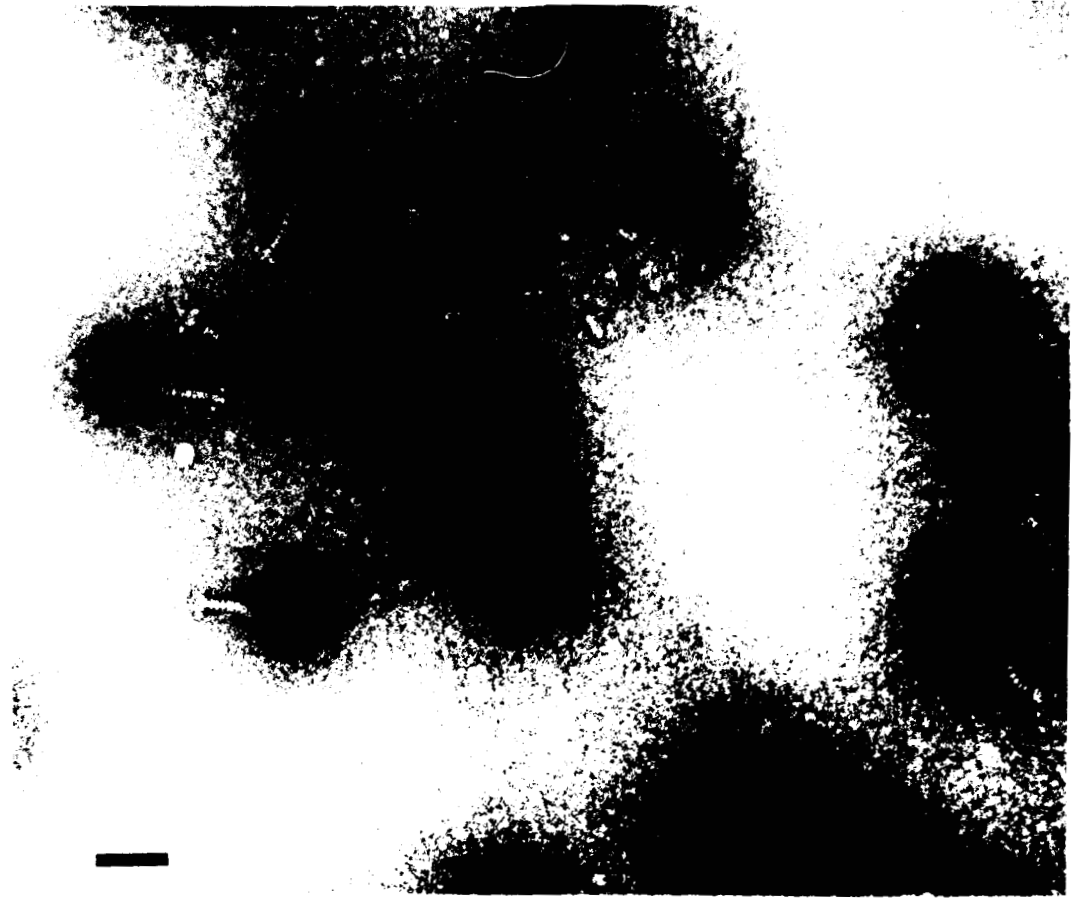
Morphotype NM1

**photo a :** Vue d'ensemble du phage NM1 coloré à l'AU. Les têtes sont pratiquement toutes en parfait état. Noter que l'on voit très nettement les barres transversales de la queue ainsi que les crampons.

**photo b :** Vue d'ensemble du phage  $\Phi$ M20S coloré à l'AU. Noter la présence de nombreux morceaux de flagelles bactériens et de plusieurs pré-têtes ou têtes vides de phages. Là encore, les barres transversales des queues apparaissent nettement.

Les deux photos de cette planche sont au grossissement 92 400. La barre représente 100 nm.

planche 5



**Planche 6 : Phages de la Famille des Siphoviridae (groupe B de BRADLEY)**

Morphotype NM1

**photo a** : très belle particule du phage NM1 colorée à l'AU. On peut y voir 15 barres transversales ;

**photo b** : même phage et même coloration. Présence de 13 barres caudales. Les crampons sont plus visibles que sur la photo a. En observant attentivement cette photographie, on devine l'agencement des capsomères de la tête ;

**photo c** : coloration positive à l'AU du phage NM2. Noter le rétrécissement très important des dimensions de la tête ; la queue n'est pratiquement plus visible ;

**photos d et e** : coloration au PT des phages NM1 et NM6 respectivement. Noter le nombre et la distribution différents des barres transversales entre les deux particules. Sur la photo e, on voit très nettement, surtout sur la partie droite, la forme des crampons caudaux ;

**photo f** : mauvaise coloration du phage NM2 au PT. L'ensemble de la particule est très détériorée.

Toutes les photos de cette planche ont été réalisées au grossissement 297 000. La barre représente 100 nm.

planche 6

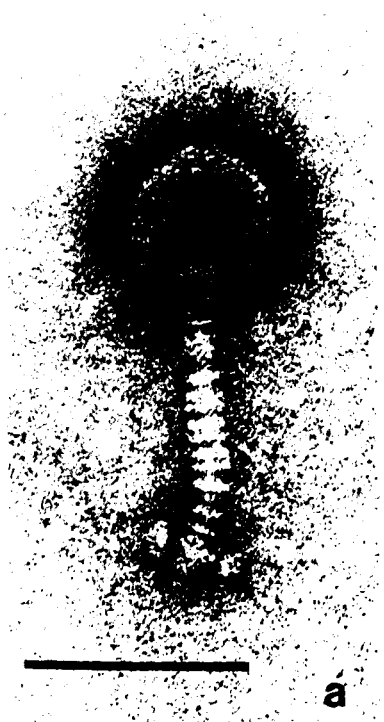




Planche 7 : Phages de la Famille des Siphoviridae (groupe B de BRADLEY)

Morphotype NM8

**photo a** : phage NM8 coloré à l'AU montrant une tête hexagonale, une queue sur laquelle on peut voir les nombreuses striations et deux appendices caudaux. Celui de gauche, plus épais, pourrait correspondre à l'accolement de deux des trois appendices fréquemment observés (flèche) ;

**photo b** : même phage coloré au PT. La queue du phage apparaît moins épaisse et plus longue que sur la photo a ;

**photo c** : 5 particules du phage  $\Phi$ M1-5 colorées à l'AU et adsorbées sur des débris bactériens ;

**photos d et e** : coloration à l'AU des phages  $\Phi$ M5N1 et  $\Phi$ M26S respectivement. Les queues de ces phages sont épaisses comme sur la photo a ;

**photo f** : phage  $\Phi$  A161 coloré à l'AU et adsorbé sur des débris bactériens.

Toutes les photos sont au grossissement 29 700 sauf la c et la f qui sont présentées au grossissement 48 500. La barre représente 100 nm.

planche 7



**Planche 8 : Phages de la Famille des Siphoviridae (groupe B de BRADLEY)**

Morphotype NM8

**photo a** : phage  $\Phi$ 5B coloré à l'AU. On devine la présence d'une fibre caudale (flèche) ;

**photo b** : même phage coloré au PT ;

**photo c** : coloration partiellement positive du phage  $\Phi$ 5B à l'AU montrant une diminution des dimensions de la tête du phage ;

**photo d** : coloration totalement positive du même phage ;

**photo e** : coloration au PT du phage NM4 ;

**photo f** : phage  $\Phi$  M26S coloré à l'AU.

Toutes les photos de cette planche sont au grossissement 297 000, sauf la e qui est à 174 900. La barre représente 100 nm.

planche 8

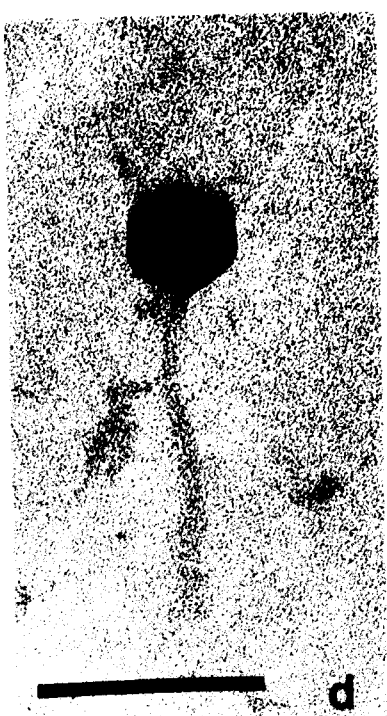
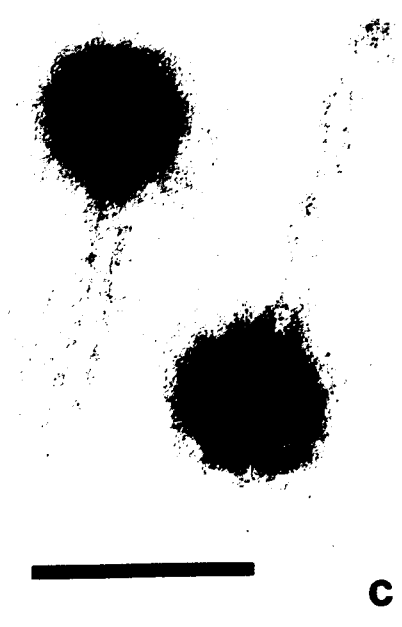


Planche 9 : Phages de la Famille des Podoviridae (groupe C de BRADLEY)

Morphotype MM1H

**photo a** : vue d'ensemble d'une préparation très riche en phages MM1C, colorée à l'AU. Les phages sont tellement tassés les uns contre les autres qu'ils en sont déformés ;

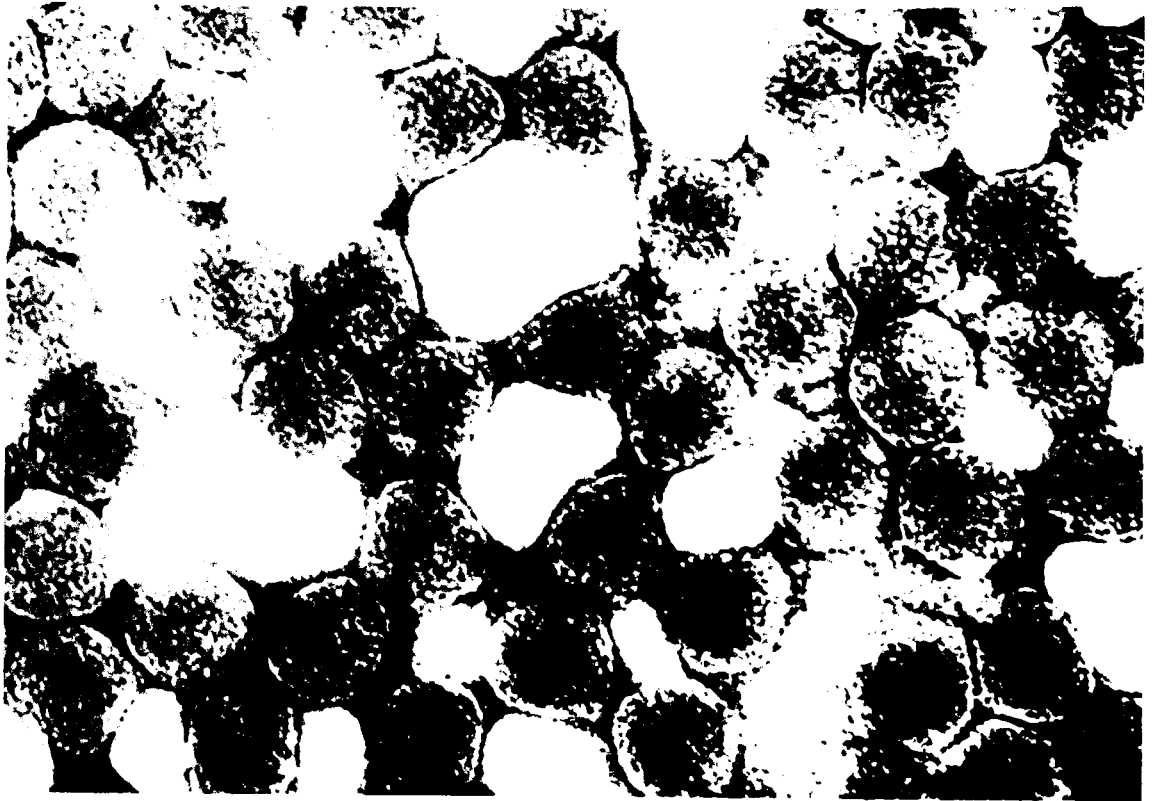
**photo b** : vue d'ensemble de particules du même phage, colorées également à l'AU, dont les têtes présentent des contours hexagonaux caractéristiques. Leurs queues courtes sont visibles (flèches) ;

**photo c** : forme pentagonale du phage MM1H coloré à l'AU ;

**photo d** : vue de détail du même phage coloré de la même façon. Les deux crampons caudaux sont visibles (flèches).

Toutes les photos de cette planche sont réalisées au grossissement 297 000. La barre représente 100 nm.

planche 9



b



d

#### IV. - HOMOLOGIES DES ADN

Afin d'apporter un argument supplémentaire en faveur de l'idée que nous avons affaire à 5 morphotypes différents et de cette façon confirmer le classement de nos phages, nous avons entrepris de rechercher s'il existait des homologues entre l'ADN des phages CM1,  $\Phi$ M11S, NM1, NM8 et MM1H et l'ADN du phage NM1 utilisé comme sonde marquée.

##### A. - Extraction et purification des ADN phagiques

Chacun des phages étudiés est produit en masse, concentré au PEG 6000 et purifié sur gradient de chlorure de césium comme décrit dans le chapitre II de ce travail. Les suspensions phagiques sont ensuite dialysées une nuit contre de l'eau distillée à + 4°C afin d'éliminer le chlorure de césium. La suspension est déprotéinisée et l'ADN extrait par une solution de phénol dans le tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) (2 fois), un mélange phénol-chloroforme (2 fois) et enfin plusieurs fois avec le chloroforme pur afin d'éliminer les dernières traces de phénol et de protéines. L'ADN est précipité avec 1/10 de son volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5 et 2,5 volumes d'éthanol à 95 p100 (V/V) dans un bain de carboglace/éthanol à - 70°C pendant 5 min. Après centrifugation, le culot d'ADN est rincé à l'éthanol à 70 p100 (V/V) froid, 2 à 3 fois afin de se débarrasser des sels, puis une fois avec de l'éthanol à 95 p100 (V/V). Le culot est lyophilisé ou laissé à l'air libre 15 min afin d'éliminer les traces d'alcool. Le culot d'ADN est ensuite redissous dans du tampon TE [RADLOFF *et al.* (218)].

##### B. - Détermination des masses moléculaires des ADN

De toutes les enzymes auxquelles nous avons soumis les ADN des 5 phages étudiés, BamHI, BstEII et Sall (Bethesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, Md.) ont produit des profils électrophorétiques convenables. En particulier, l'endonucléase Sall produit un nombre restreint de fragments d'ADN bien séparés et facilement observables sur électrophorèse en gel d'agarose. Nous l'avons donc retenu pour réaliser la suite de ce travail. Les digestions enzymatiques sont réalisées sous un volume de 20  $\mu$ l comprenant 1  $\mu$ g d'ADN, le tampon de réaction approprié et 3 fois la quantité d'enzymes nécessaire pour couper un  $\mu$ g d'ADN en 1 h à 37°C. Les fragments d'ADN

sont séparés par électrophorèse horizontale (Dankar Corp., Reading, Mass.) en gel d'agarose à 0,8 p100 dans du tampon TBE (Tris-base 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) [MEYERS *et al.* (198)]. Elle est réalisée sous un voltage de 2 V/cm pendant 18 h ou jusqu'à ce que le front du bromophénol atteigne l'extrémité du gel. Les bandes sont colorées au bromure d'éthidium (1 µg/ml) (International Biotechnologies, New Haven, Conn.) pendant 15 min et observées au transilluminateur en lumière ultra-violette. Les gels sont ensuite photographiés sur film Polaroid N° 52 ou 55 (Polaroid Corporation, Cambridge, Mass.).

De l'ADN de phage λ digéré par **HindIII** et une solution de fragments d'ADN de masse moléculaire connue (Bethesda Research Laboratories) sont utilisés comme témoin de masse moléculaire.

Les tailles des fragments d'ADN ainsi que les masses moléculaires des génomes phagiques ont été calculés par la méthode des moindres carrés selon SCHROEDER and BLATTNER (236).

### C. - Hybridations ADN-ADN

Une sonde d'1 µg d'ADN digérée par **Sall** est marquée au [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Corp. Oakville, Ontario, Canada) selon la technique de RIGBY *et al.* (223), connue sous le nom de "nick translation". Le marquage obtenu se situe entre  $1 \times 10^6$  et  $2 \times 10^6$  cpm. Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse sont transférés sur une membrane de nitrocellulose selon la technique de SOUTHERN (245), légèrement modifiée par l'emploi de formamide à 50 p100. La membrane est soumise à une température de 80°C pendant 2 h sous vide et est ensuite préhybridée pendant 2 heures à 42°C dans 10 ml d'une solution composée de 2,5 ml de tampon SSC 20 fois concentré (chlorure de sodium 3 M, citrate de sodium 0,3 M), 5 ml de formamide 100 p100 déionisée, 0,5 ml de réactif de DENHARDT (95) 100 fois concentré (Ficoll 2 p100, polyvinyl pyrrolidone 2 p100, fraction V de sérum albumine de boeuf 2 p100), 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,5 M et enfin 1 ml d'ADN à 1 µg/ml de sperme de saumon soniqué, pH 6,5 [SILHAVY *et al.* (242)]. La solution de préhybridation est écartée et remplacée par la solution d'hybridation, de même composition que la précédente mais contenant la sonde marquée, purifiée et dénaturée. L'hybridation est réalisée pendant une



nuit à 42°C. La membrane de nitrocellulose est ensuite lavée successivement 3 fois à 65°C selon THOMAS (260). Dans ces conditions, l'homologie entre les ADN atteint 90 à 95 p100. Le filtre humide est fixé sur du papier Whatman 3 MM (Whatman, Inc., Clifton, N.J.), recouvert d'un film de cellophane et autoradiographié à - 70°C contre un film Kodak X-0mat AR-2 (Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.) Les durées d'exposition peuvent varier de quelques heures à plusieurs jours et dépendent à la fois de l'intensité de marquage de la préparation et de l'intensité de la trace que l'on veut obtenir sur le film.

#### D. - Résultats et conclusion

Les ADN des phages CM1,  $\phi$  M11S, NM1, NM8 et MM1H digérés par *Sall* montrent des tracés électrophorétiques très différents indiquant que leurs génomes ne sont pas apparentés (planche 10, 1a). L'ADN du phage CM1 n'est pas clivé par *Sall* et apparaît donc après digestion sous forme d'une seule bande. Ce phénomène, déjà observé par JARVIS et MEYER (140) chez les phages de streptocoques lactiques, pourrait être dû à la présence dans les ADN de certains phages d'un nombre élevé de cytosines méthylées, entraînant une inhibition de certaines endonucléases [KESSLER et al. (151)]. Après centrifugation au chlorure de césium, le phage MM1H présente 2 bandes distinctes dont les ADN ont été traités séparément. Ces deux bandes contiennent bien deux phages du morphotype MM1H pouvant être reproduits sur la souche de *R. meliloti* M14S. Les profils électrophorétiques des digestions étant parfaitement identiques, on peut penser que la suspension de phages MM1H est hétérogène et constituée de deux variétés de particules de densité différente ; cependant, cette hétérogénéité ne provient certainement pas de leur ADN.

Après hybridation de l'électrophorégramme (planche 10, 1b) avec la sonde constituée de l'ADN du phage NM1 marqué au  $^{32}\text{P}$  et digéré par *Sall*, l'image obtenue montre que l'ADN du phage NM1 ne s'hybride qu'avec lui-même. Aucune parenté n'est révélée entre le phage du morphotype NM1 et les 4 autres morphotypes. Les cinq morphotypes isolés dans ce travail sont donc non seulement morphologiquement différents mais leurs acides nucléiques ne présentent aucune parenté entre eux.

Des résultats similaires, montrant une étroite corrélation entre les parentés existant entre les ADN et la morphologie, ont été obtenus par GRIMONT F. et GRIMONT P. (122) pour des phages d'entérobactéries du groupe C3 et par JARVIS (139) pour des phages de streptocoques lactiques.

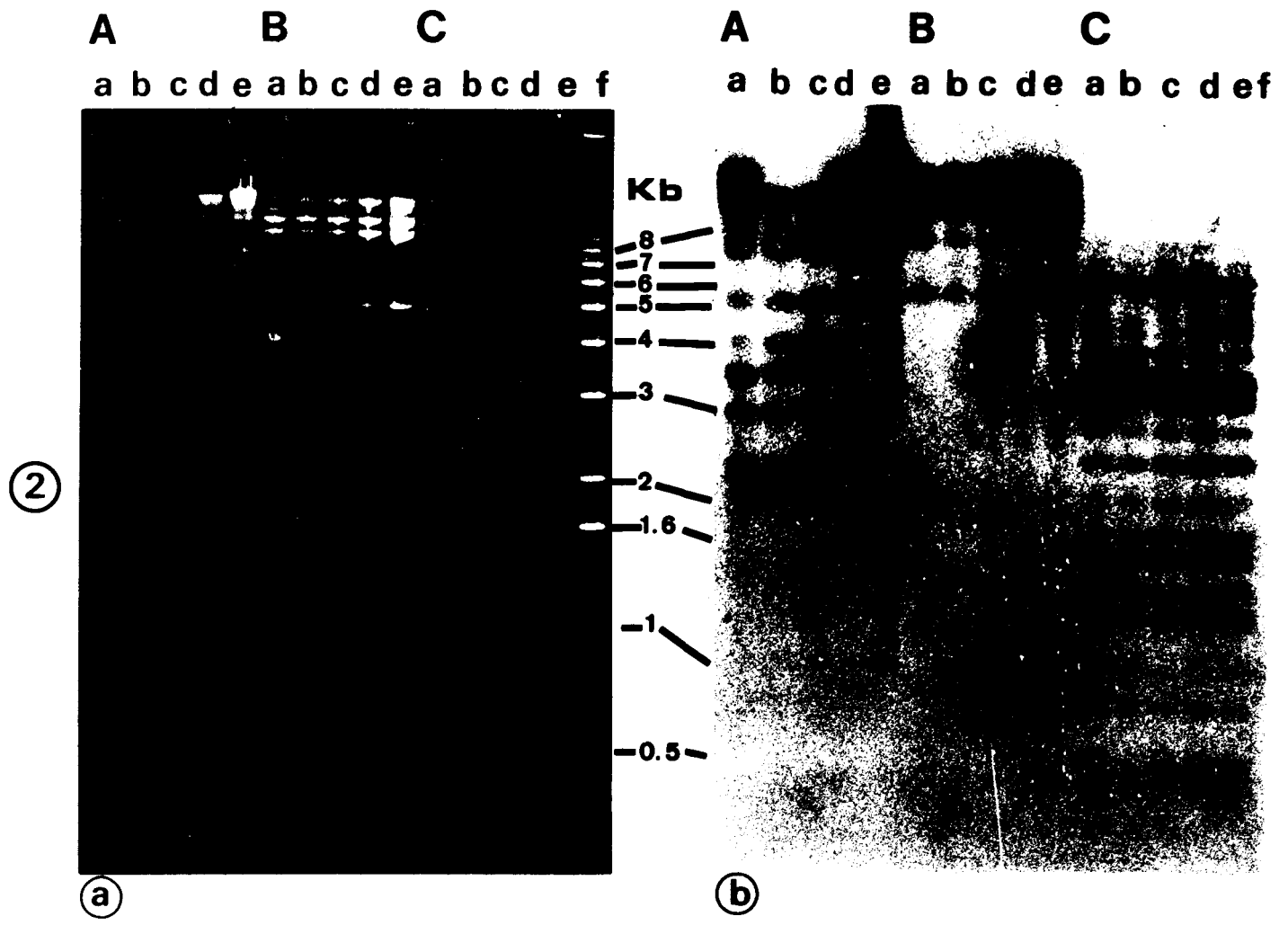
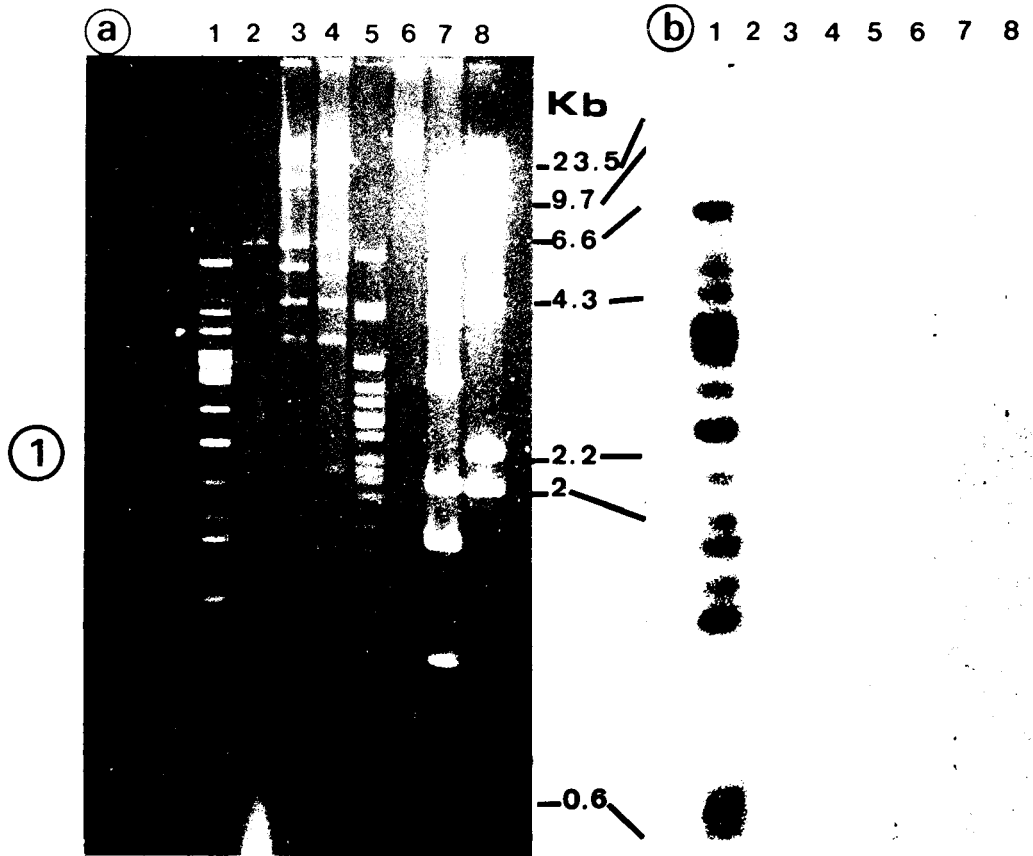
Les masses moléculaires des ADN des phages  $\Phi$ M11S, NM1, NM8 et MM1H ont été estimées à respectivement 42,2, 51,9, 28,9 et 40,5 Kb, ou  $28,1 \times 10^6$ ,  $34,5 \times 10^6$ ,  $19,3 \times 10^6$  et  $27,0 \times 10^6$  daltons. Sauf pour le phage NM8, ces données correspondent à des masses d'ADN dont les valeurs sont compatibles avec la taille de la capsid. Le contenu en ADN du phage NM8 apparaît être trop faible en regard de la taille de la tête. La masse moléculaire de l'ADN du phage CM1 n'a pu être déterminée avec exactitude.

Nous avons montré précédemment que le morphotype NM1, composé des phages NM1, NM2, NM6, NM7 et  $\Phi$ M20S, constituait au sein des 33 phages le groupe le plus homogène (voir les relations sérologiques, le spectre lytique et la morphologie de ces phages). Afin de confirmer cette homogénéité et de contrôler la parenté pouvant exister entre ces 5 phages, nous avons réalisé les hybridations entre leurs ADN et le phage NM1 pris comme sonde marquée. Les 5 ADN ont été soumis à l'action de 11 enzymes de restriction. Parmi celles-ci, **Clal**, **HindIII**, **KpnI**, **SmaI** et **XhoI** ne génèrent que quelques fragments. Par contre, **AvaI**, **BamHI**, **BstEII**, **EcoRI**, **SalI** et **SstI** donnent une dizaine de fragments. **BamHI**, **BstEII** et **SalI** ont été retenues pour la suite de ce travail car elles donnent des fragments bien visibles sur gel d'agarose (planche 10, 2a). Les profils de restriction obtenus sont identiques laissant présager que ces 5 phages sont identiques. L'ADN du phage NM1 digéré par **SalI** marqué au  $^{32}\text{P}$  et utilisé comme sonde est hybridé avec lui-même et les ADN digérés des 4 autres phages composant le morphotype NM1. La planche 10, 2b montre l'existence de multiples segments homologues indiquant la présence de nombreuses séquences communes entre les différents ADN. Il est évident que ces 5 phages sont identiques [WERQUIN et al. (277)].

## Planche 10

- 1-a** Electrophorèse en gel d'agarose d'ADN phagiques digérés par **Sall**. Puits : 1, phage NM1 ; 2, phage NM8 ; 3, phage MM1H (bande inférieure en CICs) ; 4, phage MM1H (bande supérieure en CICs) ; 5, phage  $\Phi$  M11S ; 6, phage CM1 ; 7, ADN marqueur ; 8, ADN de  $\lambda$  digéré par **HindIII**.
- 1-b** Historadiogramme obtenu après transfert des ADN du gel 1-a selon SOUTHERN suivi d'une hybridation avec de l'ADN du phage NM1 digéré par **Sall** et marqué au  $^{32}\text{P}$ . Les poids moléculaires en Kb des fragments sont indiqués entre les deux photographies.
- 2-a** Electrophorégramme d'ADN phagiques digérés par **BamHI**, **BstEII** et **Sall**. Puits Aa à Ae, digestion par **BamHI** de l'ADN des phages NM6, NM2, NM7, NM1 et  $\Phi$  M20S. Puits Ba à Be et Ca à Ce, digestion des mêmes ADN phagiques par **BstEII** et **Sall** respectivement. Puit f, ADN marqueur.
- 2-b** Autoradiogramme obtenu après transfert des ADN du gel 2-a selon SOUTHERN suivi d'une hybridation avec de l'ADN du phage NM1 digéré par **Sall** et marqué au  $^{32}\text{P}$ . Les masses moléculaires en Kb des fragments sont indiquées entre les deux photographies.

planche 10



CONCLUSION GENERALE

Les microorganismes des genres **Rhizobium** et **Bradyrhizobium** induisent chez les Légumineuses une symbiose active. L'association bactérie-plante provoque, dans la plupart des cas au niveau des racines, la formation de nodosités où s'établit grâce à la nitrogénase, la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac directement assimilable par la plante. Cette symbiose est d'une importance capitale pour la nutrition des êtres vivants car elle conditionne le développement d'espèces végétales alimentaires d'une grande importance économique présentes dans la plupart des écosystèmes (exception faite des écosystèmes de conditions extrêmes ou fortement carencés). L'efficacité de cette symbiose est cependant sujette à certaines fluctuations. Parmi les nombreuses étapes aboutissant à la fixation de l'azote, deux semblent être primordiales. Il s'agit de l'étape précédant la formation du nodule, c'est-à-dire les circonstances et les conditions de l'infection de la plante par la bactérie et de celle correspondant à l'expression dans la plante des gènes de la fixation de l'azote. L'infection s'effectue en effet au niveau du sol, substrat complexe s'il en est de par sa structure, sa composition, son hygrométrie, la présence de nombreux microorganismes et de leurs prédateurs naturels que sont les protozoaires et les bactériophages. En ce qui concerne l'expression dans la plante des gènes de la fixation de l'azote, l'intervention des deux partenaires de la symbiose, une plante et une bactérie, complique très sérieusement les investigations. En effet, si la connaissance parfaite des deux partenaires pris séparément semble être accessible, le résultat final de leur association reste encore, dans de nombreux cas, très imprévisible. Au niveau du sol, les bactériophages semblent jouer un rôle non négligeable dans la sélection des souches bactériennes. Parasites obligatoires des bactéries, ils sont également susceptibles, et c'est le deuxième rôle que l'on peut leur attribuer, de servir de vecteur de gènes impliqués dans la fixation de l'azote.

Le travail de Thèse sur les Bactériophages de **Rhizobium meliloti**, présenté ici, nous a permis de montrer que :

- Dans les échantillons de terre analysés provenant de la proche rhizosphère de pieds de luzerne, nous avons à chaque fois révélé la présence de bactériophages spécifiques de la bactérie symbiotique de cette Légumineuse. Il semble donc que dans des conditions normales de culture du macrosymbionte, les bactériophages soient toujours présents dans le sol. Nous avons ainsi isolé 21 phages spécifiques de **R. meliloti**.

- L'action d'agents mutagènes sur 46 souches de *R. meliloti* (20 provenant de notre laboratoire et 26 autres de laboratoires étrangers) nous a permis d'isoler 12 bactériophages tempérés. Dans nos conditions expérimentales, 26 p100 des souches étudiées se sont révélées lysogènes.
- Nos recherches sur l'infection de *R. meliloti* par nos phages nous ont permis, dans un premier temps, de déterminer avec précision les conditions optimales de la lyse sous un faible volume. Nous avons ainsi montré le rôle de l'agitation et de la valeur de la multiplicité d'infection.
- Nous avons également souligné la dépendance étroite des phages isolés du sol vis-à-vis des ions bivalents tels  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  et estimé à  $4 \times 10^{-4}$  M en  $\text{CaCl}_2$  et  $5 \times 10^{-4}$  M en  $\text{MgCl}_2$  les concentrations nécessaires à une lyse phagique satisfaisante.

Ces résultats ont abouti à la mise au point d'une technique originale de production de phages en fermenteur. Nous avons pu ainsi obtenir, après précipitation et centrifugation, des populations phagiques importantes comprises entre  $1,2 \times 10^{12}$  et  $2,8 \times 10^{13}$  UFP/ml.

- La caractérisation de nos phages a été menée grâce à la combinaison de quatre méthodes principales d'investigation : les relations sérologiques, la spécificité d'hôte, la mensuration des particules phagiques et enfin l'étude des ADN phagiques après digestion par des enzymes de restriction.

Nous avons produit des immunosérums dont la spécificité élevée nous a permis de classer, de manière satisfaisante, les phages isolés du sol. L'emploi de ces mêmes sérums nous a amené plus tard à placer le phage tempéré  $\phi$ M20S dans le morphotype NM1 et à soupçonner que les phages  $\phi$ M11S et NM8 (très peu ou pas inhibés par les immunosérums des autres morphotypes phagiques) devaient appartenir à des morphotypes différents.

- La spécificité d'hôte nous a permis de réaliser une classification plus fine de nos phages et d'étayer les hypothèses émises au cours de l'étude sérologique. Les 33 phages de notre collection ont pu être séparés en 5 morphotypes et conjointement les souches bactériennes en 14 lysotypes différents.

Nous avons également observé une spécificité étroite de nos souches phagiques vis-à-vis de *R. meliloti*.

- L'étude morphologique des phages et les hybridations ADN-ADN nous ont permis de démontrer définitivement que nous étions en présence de cinq morphotypes phagiques distincts. De la famille des **Myoviridae**, le morphotype CMI est constitué de 11 phages tous isolés du sol. Le morphotype  $\Phi$ M11S est représenté par trois phages tempérés ; le morphotype NM1 par cinq phages, quatre isolés du sol et un tempéré ; enfin le morphotype NM8 par quatre phages isolés du sol et huit phages tempérés. Ces trois morphotypes font partie de la famille des **Siphoviridae**. Enfin, le morphotype MM1H, de la famille des **Podoviridae**, est constitué de deux phages isolés du sol.

Il est remarquable de constater qu'aucun des phages tempérés que nous avons isolé ne fait partie des morphotypes CMI et MM1H. Par contre, le morphotype  $\Phi$ M11S n'est lui constitué que de phages tempérés.

Des travaux réalisés récemment par nos soins [WERQUIN *et al.* (277)] sur les phages du morphotype NM1 montrent que les 5 phages de ce groupe sont tempérés. Il n'est dès lors pas impossible de concevoir qu'un nombre important des phages isolés du sol le sont également.

Les dimensions des phages montrent que nous avons affaire à des phages de taille courante dont les ADN ont des masses moléculaires compatibles avec la taille de leur capsid. La masse moléculaire de l'ADN du phage NM8 apparaît cependant nettement sous-estimée. Nous supposons que lors de l'électrophorèse, après digestion avec **Sall**, certains petits fragments ayant migré trop loin, ils n'ont pu être visualisés et mesurés. Ceci étant, les phages du morphotype NM8 ont un aspect très semblable à celui du phage  $\lambda$  dont l'ADN a une masse moléculaire de 49 Kb ou 33 Mdal. On retrouve des ADN de masse voisine chez les phages des morphotypes  $\Phi$ M11S et NM1. Il semble qu'au moins les phages des morphotypes NM8,  $\Phi$ M11S et NM1, parmi lesquels nous avons démontré la présence de phages tempérés, pourraient être utilisés pour procéder à des transferts génétiques. Ils pourraient être pratiqués par transduction généralisée ou spécifique mais la plupart des auteurs s'accordent



pour dire que l'utilité des systèmes de transduction chez **R. meliloti** reste quelque peu limitée [KONDOROSI (158)].

A l'heure actuelle, l'étude des gènes impliqués dans la symbiose et leur expression chez **Rhizobium** se fait essentiellement en utilisant les phages comme vecteurs de plasmides de petite taille ou de cosmides. A cette fin, il serait possible d'utiliser certains de nos phages comme vecteurs de segments d'ADN plus longs ; c'est le souhait que nous formulons.

## PUBLICATIONS RELATIVES A LA THESE

- o O o -

Le travail de Thèse présenté ici a donné lieu aux publications suivantes :

- KRSMANOVIC-SIMIC D. et M. WERQUIN, 1973  
Etude des bactériophages de **Rhizobium meliloti**.  
C. R. Acad. Sci., Ser. D, **276** : 2745-2748.
- WERQUIN M., M. TAHAR BEN BRAHIM et D. KRSMANOVIC-SIMIC, 1977  
Etude des bactériophages de **Rhizobium meliloti**.  
C. R. Acad. Sci., Ser. D, **284** : 1851-1854.
- WERQUIN M., C. DEFIVES, L. HASSANI and M. ANDRIANTSIMIAVONA-OTONIA, 1984  
Large scale preparation of **Rhizobium meliloti** bacteriophages by fermenter culture.  
J. Virol. Methods **8** : 155-160.
- DEFIVES C., M. WERQUIN, M. OUAHAL, L. SAHIM and J.C. DERIEUX, 1986  
Phage growth restriction by **Rhizobium meliloti**.  
Microbios Letters **31** : 107-114.
- WERQUIN M., H.W. ACKERMANN and R.C. LEVESQUE, 1988  
A study of 33 bacteriophages of **Rhizobium meliloti**.  
Appl. Environ. Microbiol. **54** : 188-196.
- WERQUIN M., H.W. ACKERMANN and R.C. LEVESQUE, 1989  
Characteristics and comparative study of five **Rhizobium meliloti** bacteriophages.  
Current Microbiol. **18** : 307-311.

et aux communications suivantes :

- WERQUIN M. et D. KRSMANOVIC-SIMIC, 1973.  
Etude en microscopie électronique de bactériophages de **Rhizobium meliloti**.  
Colloque de la Société Française de Microscopie Electronique, Dijon.
- DEFIVES C. and M. WERQUIN, 1984  
Phages able to interfere in **Rhizobium meliloti** inoculum produced by fermentation.  
6th Int. Congr. Virol., Sendai (Japan).
- WERQUIN M., C. DEFIVES and M.H. SANIEZ, 1984  
Isolation and morphology of a bacteriophage which causes troubles during gluconic acid production by industrial fermentation.  
6th Int. Congr. Virol., Sendai (Japan).
- WERQUIN M., C. DEFIVES, S. BOUREY and H.W. ACKERMANN, 1987  
**Bradyrhizobium japonicum** : morphology and partial characterization.  
7th Int. Congr. Virol., Edmonton Alberta (Canada).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - ACKERMANN H.W., 1978. Natural groups of bacteriophages.  
**In** : C.R.C. Handbook of Microbiology, vol. 2, 2nd ed. Laskin A.I. and Lechevalier H.A. (Eds.), C.R.C. Press, Boca Raton, Fla. : 639.
- 2 - ACKERMANN H.W., 1985. Les virus des bactéries.  
**In** : Virologie médicale. Maurin J. (Ed.), Flammarion Médecine-Science, Paris : 196-210.
- 3 - ACKERMANN H.W., 1987  
Microbiol. Sci. **7** (4) : 214-218.
- 4 - ACKERMANN H.W., A. AUDURIER, L. BERTHIAUME, L.A. JONES, J.A. MAYO and A.K. VIDAVER, 1978  
Adv. Virus Res. **23** : 1-24.
- 5 - ACKERMANN H.W. and M.S. DUBOW, 1987. Viruses of Procaryotes.  
C.R.C. Press, Boca Raton, Fla.
- 6 - ACKERMANN H.W. and A. EISENSTARK, 1974  
Intervirology **3** : 201-219.
- 7 - ACKERMANN H.W., P. JOLICOEUR et L. BERTHIAUME, 1974  
Can. J. Microbiol. **20** : 1093-1099.
- 8 - ACKERMANN H.W., R. ROY, M. MARTIN, M.R.V. MURPHY and W.A. SMIRNOFF, 1978  
Can. J. Microbiol. **24** : 986-993.
- 9 - ADAMS M.H., 1959. Bacteriophages.  
Interscience Publishers Inc., New-York.
- 10 - ALBERSHEIM P. and J.S. WOLPERT, 1976  
Plant Physiol. **57** : supplement 416.
- 11 - APPLEBY C.A., 1974. Leghaemoglobin.  
**In** : The Biology of Nitrogen Fixation. Quispel A. (Ed.), North Holland, Amsterdam : 521-554.
- 12 - APPLEBY C.A., F.J. BERGERSEN, P.K. MACNICOL, G.L. TURNER, B.A. WITTENBERG and J.B. WITTENBERG, 1976. The role of leghaemoglobin in symbiotic N<sub>2</sub> fixation.  
**In** : Proceedings of First International Symposium on Nitrogen Fixation, Vol. 1. Newton W.F. and C.J. Nyman (Eds.), Washington State University Press, U.S.A. : 274-292.
- 13 - ARBER W. and D. DUSSOIX, 1962  
J. Mol. Biol. **5** : 18-36.
- 14 - ATKINS G.J., 1973  
J. Virol. **12** : 149-156.
- 15 - ATKINS G.J., 1973  
J. Virol. **12** : 157-164.

- 16 - AUSUBEL F.M., 1984  
**In** : Developmental genetics of the *Rhizobium*/Legume symbiosis. Microbial Development. Losich R. and L. Shapiro (Eds.), Cold Spring Harbor, New-York : 275-298.
- 17 - BALASSA G., 1963  
 Bact. Rev. **27** : 228-241.
- 18 - BALASSA R., 1954  
 Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. **2** : 51-78.
- 19 - BALDWIN I.L., E.B. FRED and E.G. HASTINGS, 1927  
 Botanical Gazette **83** : 217-243.
- 20 - BALTIMORE D., 1971  
 Bacteriol. Rev. **35** : 235-241.
- 21 - BANFALVI Z., E.S. RANDHAWA, E. KONDOROSI, A. KISS and A. KONDOROSI, 1983  
 Mol. Gen. Genet. **189** : 129-135.
- 22 - BANFALVI Z., V. SAKANYAN, C. KONCZ, A. KISS, I. DUSHA and A. KONDOROSI, 1981  
 Mol. Gen. Genet. **184** : 318-325.
- 23 - BARNET Y.M., 1972  
 J. Gen. Virol. **15** : 1-15.
- 24 - BARNET Y.M., 1980  
 Can. J. Microbiol. **26** : 572-576.
- 25 - BARRE-SINOUSSE F., J.C. CHERMANN, F. REY, M.T. NUGEYRE, S. CHAMARET, J. GRUEST, C. DAUGUET, C. AXLER-BLIN, F. BRUN-VEZINET, C. ROUZIOUX, W. ROSENBAUM and L. MONTAGNIER, 1983  
 Science **220** : 868-870.
- 26 - BAUER W.D., 1981  
 Ann. Rev. Plant Physiol. **32** : 407-441.
- 27 - BECHET M. et J.B. GUILLAUME, 1978  
 Can. J. Microbiol. **8 (24)** : 960-966.
- 28 - BECKING J.H., 1970  
 Int. J. Syst. Bact. **20** : 201-220.
- 29 - BECKING J.H., 1977. Dinitrogen-fixing associations in higher plants other than legumes.  
**In** : A Treatise on Dinitrogen Fixation, Section III Biology. Hardy R.W.F. and W.S. Silver (Eds.), Wiley, New-York : 185-275.
- 30 - BEIJERINCK M.W., 1888  
 Bot. Zei. **46** : 725-804.

- 31 - BEIJERINCK M.W., 1898  
Verh. K. Akad. Wet. **6** : 3-21.
- 32 - BEIJERINCK M.W., 1901  
Infektionskz Hyg. Abt. **II (7)** : 561-582.
- 33 - BERGERSEN F.J., 1977. Physiological chemistry of dinitrogen fixation by legumes.  
**In** : A Treatise on Dinitrogen Fixation, Section III, Biology. Hardy R.W.F. and W.S. Silver (Eds.), Wiley, New-York : 519-555.
- 34 - BERGERSEN F.J. and D.J. GOODCHILD, 1973  
Aust. J. Biol. Sci. **26** : 741-756.
- 35 - BERGEY'S Manual of determinative bacteriology, 1984  
Williams and Wilkins (Eds.), 9th ed., Vol. I, Baltimore/London, 964 p.
- 36 - BERINGER J.E., 1974  
J. Gen. Microbiol. **84** : 188-198.
- 37 - BITTON G., 1979. Adsorption of viruses to surfaces : technological and ecological implications.  
**In** : Adsorption of microorganisms to surfaces. Bitton G. and K.C. Marshall (Eds.), J. Wiley and Sons, Inc., New-York : 331-374.
- 38 - BLONDEAU R., 1981. Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Vuibert (ed.), Paris, 102 p.
- 39 - BOHLOOL B.B. and E.L. SCHMIDT, 1974  
Science **185** : 269-271.
- 40 - BORDET J. et M. CIUCA, 1921  
C. R. Séance Soc. Biol. **84** : 276-278.
- 41 - BOUCHER C., B. BERGERON, M. BARATE DE BERTALMIO and J. DENARIE, 1977  
J. Gen. Microbiol. **98** : 253-263.
- 42 - BOUSSINGAULT J.B., 1838  
Ann. Chim. Phys. **67** (ser.2) : 5-54.
- 43 - BOUSSINGAULT J.B., 1838  
Ann. Chim. Phys. **69** : 353-367.
- 44 - BOUSSINGAULT J.B., 1841  
Ann. Chim. Phys. **1** (ser.3) : 208-246.
- 45 - BOWEN G.D., 1980. Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology.  
**In** : Contemporary microbial ecology. Ellwood D.C., J.N. Hedger, M.J. Latham, J.M. Lynch and J.H. Slater (Eds.), Academic Press, Inc., London, Ltd., London : 283-304.

- 46 - BOYD A.C., I.G. CHARLES, J.W. KEYTE and W.J. BRAMMAR, 1986  
*Nucl. Acid. Res.* **14** : 5255-5274.
- 47 - BRADLEY D.E., 1965  
*J. Roy. Microsc. Soc.* **84** : 257-316.
- 48 - BRADLEY D.E., 1967  
*Bacteriol. Rev.* **31** : 230-314.
- 49 - BRADLEY D.E., 1971. A comparative study of the structure and biological properties of bacteriophages.  
**In** : Comparative Virology. Maramorosh K. and E. Kurstak (Eds.), Academic Press, New-York : 207-253.
- 50 - BRENNER S. and R.W. HORNE, 1959  
*Biochim. Biophys. Acta* **34** : 103-110.
- 51 - BUCHANAN-WOLLASTON A.V., 1979  
*J. Gen. Microbiol.* **112** : 135-142.
- 52 - BULLEN W.A., R.C. BURNS and J.R. LECOMTE, 1964  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17** : 265-271.
- 53 - BULLEN W.A., R.C. BURNS and J.R. LECOMTE, 1965  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **53** : 532-539.
- 54 - BULLEN W.A. and J.R. LECOMTE, 1966  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **56** : 979-986.
- 55 - BULLERJAHN G.S. and R.H. BENZINGER, 1982  
*J. Bact.* **150** : 421-424.
- 56 - BURG D., J. GUILLAUME and R. TAILLIEZ, 1982  
*Arch. Microbiol.* **133** : 162-163.
- 57 - BURKARDT H.J., G. RIESS and A. PÜHLER, 1979  
*J. Gen. Microbiol.* **114** : 341-348.
- 58 - BURNET F.M. and M. McKIE, 1929  
*Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **6** : 277-284.
- 59 - BURNS R.C., 1969  
*Biochim. Biophys. Acta* **171** : 253-259.
- 60 - BURRIS R.H., 1959  
*Proc. Roy. Soc. Biol. Sci.*, **172** (ser.B) : 339-354.
- 61 - BURRIS R.H., W.E. MAGEE and M.K. BACH, 1955  
*Ann. Acad. Sci.Fennicae, Series A2 Chemica*, **60** : 190-199.
- 62 - CALLAHAM D., P. DELTREDICI and J.G. TORREY, 1978  
*Science* **199** : 899-902.

- 63 - CALLAHAM D.A. and J.G. TORREY, 1981  
Can. J. Bot. **59** : 1647-1664.
- 64 - CAMPBELL R., 1977. Microbiol ecology.  
In : Basic Microbiology. Wiley J. and Sons (Ed.), A. Halsted Press  
Book, vol. 5, 148 p.
- 65 - CARNAHAN J.E., L.E. MORTENSON, H.F. MOWER and J.E.  
CASTLE, 1960  
Biochim. Biophys. Acta **44** : 520-535.
- 66 - CASADESUS J. and J. OLIVARES, 1979  
Mol. Gen. Genet. **174** : 203-209.
- 67 - CASJENS S. and J. KING, 1975  
Annu. Rev. Biochem. **44** : 555-611.
- 68 - CASSE E., C. BOUCHER, J.S. JULLIOT, M. MICHEL and J.  
DENARIE, 1979  
J. Gen. Microbiol. **113** : 229-242.
- 69 - CENTIFANTO Y.M. and W.S. SILVER, 1964  
J. Bacteriol. **88** : 776-781.
- 70 - CHAMBERLAND C., 1884  
C. R. Acad. Sci. Paris **99** : 247-248.
- 71 - CHANDLER M.R., 1978  
J. Exp. Bot. **29** : 749-755.
- 72 - CHATTORAJ D.K., Y.K. OBEROI and G. BERTANI, 1977  
Virology **81** : 460-470.
- 73 - CHEN G.C.C., A. BROWN and M.W. LEMA, 1986  
Can. J. Microbiol. **32** : 591-604.
- 74 - COLLINS J. and B. HOHN, 1978  
Proc. Natl. Acad. Sci. **75** : 4242-4246.
- 75 - McCOMB J.A., J. ELLIOT and M.J. DILWORTH, 1975  
Nature **256** : 409-410.
- 76 - COURTOIS B., 1975  
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°559, Université des Sciences et  
Techniques de Lille Flandres-Artois.
- 77 - CRAIGIE J. and C.H. YEN, 1938  
Can. J. Public Health **29** : 448-484.
- 78 - CURRIER W.W. and G.A. STROBEL, 1976  
Plant Physiol. **57** : 820-823.
- 79 - CUTTING J.A. and H.M. SCHULMAN, 1971  
Biochim. Biophys. Acta **229** : 58-62.



- 80 - DANGEARD P.A., 1926  
Botaniste **16** : 1-275.
- 81 - DANIEL R.M., A.W. LIMMER, K.W. STEELE and I.M. SMITH, 1982  
J. Gen. Microbiol. **128** : 1811-1815.
- 82 - DANSO S.K.A., S.O. KEYA and M. ALEXANDER, 1975  
Can. J. Microbiol. **21** : 884-895.
- 83 - DART P.J., 1977. Infection and development of leguminous nodules.  
**In** : A Treatise on Dinitrogen fixation, Section III Biology. Hardy R.W.F. and W.S. Silver (Eds.), Wiley-Interscience, New-York : 367-472.
- 84 - DATTA N., R.W. HEDGES, E.J. SHAW, R.B. SYKES and M.H. RICHMOND, 1971  
J. Bact. **108** : 1244-1249.
- 85 - DAZZO F.B., 1980. Lectins and their saccharide receptors as determinants of specificity in the **Rhizobium**-legume symbiosis.  
**In** : The cell surface : mediator of developmental processes. Subtloney S. and N.K. Wesselles (Eds.) : 277-304.
- 86 - DAZZO F.B. and W.J. BRILL, 1979  
J. Bacteriol. **137** : 1362-1373.
- 87 - DAZZO F.B. and E.M. HRABAK, 1981  
J. Supramol. Struct. Cell. Biochem. **16** : 133-138.
- 88 - DAZZO F.B. and D.H. HUBBELL, 1975  
Appl. Microbiol. **30** : 1017-1033.
- 89 - DAZZO F.B. and G.L. TRUCHET, 1983  
J. Membrane Biol. **73** : 1-16.
- 90 - DAZZO F.B., W.E. YANKE and W.J. BRILL, 1978  
Biochim. Biophys. Acta **539** : 276-286.
- 91 - DEFIVES C. and M. WERQUIN, 1984  
6th Int. Congr. Virol., Sendai, Japan, September 1 to 7.
- 92 - DEFIVES C., M. WERQUIN, M. OUAHAL, L. SAHIM and J.C. DERIEUX, 1986  
Microbios Letters **31** : 107-114.
- 93 - DELATTRE J.M., 1971  
Thèse de Docteur-Ingénieur n°121, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.
- 94 - DEMOLON A. et A. DUNEZ, 1935  
Ann. Agron. **5** : 89-111.
- 95 - DENHARDT D.T., 1966  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **23** : 641-646.

- 96 - DHAR B., B.D. SINGH, R.B. SINGH, R.M. SINGH, V.P. SINGH and J.S. SRIVASTAVA, 1978  
Arch. Microbiol. **119** : 263-267.
- 97 - DHAR B., B.D. SINGH, R.B. SINGH, J.S. SRIVASTAVA and R.M. SINGH, 1980  
Indian J. Exp. Biol. **18** : 1168-1170.
- 98 - DHAR B., B.D. SINGH, R.B. SINGH, J.S. SRIVASTAVA, V.P. SINGH and R.M. SINGH, 1979  
Acta Microbiol. Pol. **23** : 319-324.
- 99 - DITTA G., S. STANFIELD, D. CORBIN and D.R. HELINSKI, 1980  
Proc. Natl. Acad. Sci. **77** : 7347-7351.
- 100 - DOCTOR F.H. and V.V. MODI, 1976. Genetic transformation in **Rhizobium japonicum**.  
In : Symbiotic nitrogen fixation in plants. Nutman P.S. (Ed.), Cambridge Univ. Press, London, New-York, Melbourne : 69-76.
- 101 - DUCKWORTH D.H., 1976  
Bacteriol. Rev. **40** : 793-802.
- 102 - ELLIS E.L. and M. DELBRÜCK, 1939  
J. Gen. Physiol. **22** : 365-384.
- 103 - FEISS M., R.A. FISHER, M.A. CRAYTON and C. EGNER, 1977  
Virology **77** : 281-293.
- 104 - FEISS M. and D.A. SEIGELE, 1979  
Virology **92** : 190-200.
- 105 - FICHER TECHNIQUE de la fixation symbiotique de l'azote Légumineuse/**Rhizobium**, 1983  
Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (F.A.O.), II Syst.1, p, 7/7.
- 106 - FINAN T.M., E. HARTWIEG, K. LEMIEUX, K. BERGMAN, G.C. WALKER and E.R. SIGNER, 1984  
J. Bacteriol. **159** : 120-124.
- 107 - FORRAI T., E. VINCZE, Z. BANFALVI, G.B. KISS, G.S. RANDHAWA and A. KONDOROSI, 1983  
J. Bact. **153** : 635-643.
- 108 - FOX J.A., S.J. BOOTH and E.L. MARTIN, 1976  
Virology **73** : 557.
- 109 - FRANK B., 1889  
Ber. Deut. Bot. Ges. **7** : 332-346.
- 110 - FRIEDMAN A.M., S.R. LONG, S.E. BROWN, W.J. BUIKEMA and F.M. AUSUBEL, 1982  
Gene **18** : 289-296.

- 111 - FURUKAWA H., T. KUROIWA and S. MIZUSHIMA, 1983  
*J. Bacteriol.* **154** : 938-945.
- 112 - GABOR-HOTCHKISS M., 1972  
**In** : Uptake of informative molecules by living cells. Ledoux L. (Ed.), North-Holland, Amsterdam : 212-234.
- 113 - GATMAN L.I., A.F. MOROZ, B.A. YABLOKOVA, B.A. REBENTISH and G.V. KCHOLMINA, 1980  
*Plasmid* **4** : 115-116.
- 114 - GERRETSEN F.C., A. GRYNIS, J. SACK and N.L. SÖHNGEN, 1923  
*Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. II* **60** : 311-316.
- 115 - GODFREY C.A., D.R. COVENTRY and M.J. DILWORTH, 1975. Some aspects of leghaemoglobin biosynthesis.  
**In** : Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms. Stewart W.D.P. (Ed.) : 311-332.
- 116 - GOLEBIEWSKA J., A. SAWICKA and J. SWIATEK, 1976  
*Acta Microbiol. Polon.* **25** : 161-163.
- 117 - GOODCHILD D.J., 1977  
*Intern. Rev. Cytol., suppl.* **6** : 235-288.
- 118 - GRAHAM P.H., 1976. Identification and classification of root nodule bacteria.  
**In** : Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Nutman P.S. (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge : 99-112.
- 119 - MCGREGOR A.N. and M. ALEXANDER, 1972  
*Plant and Soil* **36** : 129-139.
- 120 - GREGORY D.W. and B.J.S. PIRIE, 1973  
*J. Microsc.* **99** : 251-265.
- 121 - GRIJNS A., 1927  
*Zentr. Bakteriolog. Abt. II* **71** : 248-251.
- 122 - GRIMONT F. and P.A.D. GRIMONT, 1981  
*Curr. Microbiol.* **6** : 65-69.
- 123 - HAACK A., 1964  
*Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg., Abt. II*, **117** : 343-366.
- 124 - HAMBLIN J. and S.P. KENT, 1973  
*Nature* **245NB** : 28-29.
- 125 - HARDY R.W.F. and U.D. HAVELKA, 1975  
*Science* **188** : 633-643.
- 126 - HARDY R.W.F. and E. KNIGHT Jr., 1966  
*Biochim. Biophys. Acta* **132** : 520-531.

- 127 - HASHEM F.M., ANGLE J.C. and P.A. RISTIANO, 1986  
Can. J. Microbiol. **32** : 326-329.
- 128 - HASSANI L., 1983  
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°1059, Université des Sciences et  
Techniques de Lille Flandres-Artois.
- 129 - d'HERELLE F., 1917  
C. R. Acad. Sci., Ser. D., **165** : 373-375.
- 130 - d'HERELLE F., 1926. The bacteriophage and its behavior.  
Williams and Wilkins (Eds), Baltimore : 358-377.
- 131 - HERSHEY A.D. and M. CHASE, 1952  
J. Gen. Physiol. **36** : 39-56.
- 132 - HEUMANN W., 1979  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **88** : 1-23.
- 133 - HOLMES F.O., 1948. Order Virales, the filterable viruses.  
In : Bergey's Manual of Determinative Biology, 6th ed. Breed R.S.,  
E.G.D. Murray and A.P. Hitchens (Eds), Williams and Wilkins,  
Baltimore : 1126-1286.
- 134 - HORNEZ J.P., B. COURTOIS et J.C. DERIEUX, 1976  
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, **283** : 1559-1562.
- 135 - IVANOWSKI D., 1892  
Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg, Nouv.Ser. 3, **35** : 67-70.
- 136 - JACOBY G.A. and L. SUTTON, 1977  
Plasmid **1** : 115-116.
- 137 - JACOBY G.A. and L. SUTTON, 1982  
Plasmid **8** : 141-147.
- 138 - JARVIS A.W., 1978  
Appl. Environ. Microbiol. **36** : 785-789.
- 139 - JARVIS A.W., 1984  
Appl. Environ. Microbiol. **47** : 343-349.
- 140 - JARVIS A.W. and J. MEYER, 1986  
Appl. Environ. Microbiol. **36** : 566-571.
- 141 - JARVIS B.D.W., C.E. PANKHURST and J.J. PATEL, 1982  
Int. J. Syst. Bacteriol. **32** : 378-380.
- 142 - JOHNSTON A.W.B., M.J. BIBB and J.E. BERINGER, 1978  
Mol. Gen. Genet. **165** : 323-330.
- 143 - JORDAN D.C., 1982  
Int. J. Syst. Bacteriol. **32** : 136-139.
- 144 - JULLIOT J.S. and P. BOISTARD, 1979  
Mol. Gen. Genet. **173** : 289-298.

- 145 - JULLIOT J.S., I. DUSHA, M.M. RENALIER, B. TERZAGHI, A.M. GARNERONE and P. BOISTARD, 1984  
Mol. Gen. Genet. **193** : 17-26.
- 146 - KAHN M.L. and C.R. TRIMBLIN, 1984  
J. Bact. **158** : 1070-1077.
- 147 - KASATIYA S.S. and P. NICOLLE, 1974. Phage typing.  
**In** : C.R.C. Handbook of Microbiology, Vol. 1, 2nd ed. Laskin A.I. and Lechevalier H.A. (Eds), CRC Press, Boca Raton, Fla. : 632-650
- 148 - KATO G., Y. MARUYAMA and M. NAKAMURA, 1980  
Agric. Biol. Chem. **44** : 2843-2855.
- 149 - KAWAMURA M., M. SAKAKIBARA, T. WATANABE, K. KITA, N. HIRAOKAN, A. OBAYASHI, M. TAKAGI and K. YANO, 1986  
Nucl. Acid Res. **14** : 1985-1990.
- 150 - KENNEDY I.R., J.A. MORRIS and L.E. MORTENSON, 1968  
Biochim. Biophys. Acta **153** : 777-786.
- 151 - KESSLER C., P.S. NEUMAIER and W. WOLF, 1985  
Gene **33** : 1-102.
- 152 - KHADGI-MURAT L.N., E.J. SMIRNOVA and Ya.I. RAUTENSTEIN, 1967  
Mikrobiologiya **36** : 140-143.
- 153 - KIJNE J.W., I.A.M. VAN DER SCHAAL and G.E. DE VRIES, 1980  
Plant Sci. Lett. **18** : 65-74.
- 154 - KIRCHNER O., 1896  
Biol. Pflanz **7** : 213-224.
- 155 - KISS G.B., K. DOBO, I. DUSHA, A. BREZNOVITS, L. OROSZ, E. VINCZE and A. KONDOROSI, 1980  
J. Bact. **141** : 121-218.
- 156 - KISS G.B. and Z. KALMAN, 1982  
J. Bact. **150** : 465-470.
- 157 - KLECZKOWSKA J., 1957  
Can. J. Microbiol. **3** : 171-180.
- 158 - KONDOROSI A., 1986. Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation by **Rhizobium meliloti**, vol. 4.  
**In** : Nitrogen fixation. Broughton W.J. and A. Pühler (Eds), Clarendon Press, Oxford : 245-279.
- 159 - KONDOROSI A., G.B. KISS, T. FORRAI, E. VINCZE and Z. BANFALVI, 1977  
Nature **268** : 525-527.

- 160 - KONDOROSI A., E. KONDOROSI, C.E. PANKHURST, W.J. BROUGHTON and Z. BANFALVI, 1982  
Mol. Gen. Genet. **188** : 433-439.
- 161 - KONDOROSI A., L. OROSZ, Z. SVAB and T. SIK, 1974  
Mol. Gen. Genet. **132** : 153-163.
- 162 - KONDOROSI A., E. VINCZE, A.W.B. JOHNSTON and J.E. BERINGER, 1980  
Mol. Gen. Genet. **178** : 403-408.
- 163 - KOWALCZUK E., A. SKORUPSKA and Z. LORKIEWICZ, 1981  
Mol. Gen. Genet. **183** : 388-391.
- 164 - KOWALSKI M., 1967  
Acta Microbiol. Pol. **16** : 7-12.
- 165 - KOWALSKI M., G.E. HAM, L.R. FREDERICK and I.C. ANDERSON, 1974  
Soil Sci. **118** : 221-228.
- 166 - KRSMANOVIC-SIMIC D. et M. WERQUIN, 1973  
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, **276** : 2745-2748.
- 167 - KUBO H., 1939  
Acta Phytochim. **11** : 195-200.
- 168 - KURTZ W.G.W. and T.A. LaRUE, 1975  
Nature **256** : 407-409.
- 169 - LAEMMLI U.K. and M. FAVRE, 1973  
J. Mol. Biol. **80** : 575-582.
- 170 - LAIRD D.G., 1932  
Arch. Mikrobiol. **3** : 159-193.
- 171 - LAMPORT D.T.A., 1978. Cell wall carbohydrates in relation to structure and function.  
In : Front. Plant. tissue Cult., Proc. Int. Congr. 4th. Thorpe Trevor A. (Ed.), Univ. Galgary, Galgary, Alberta : 235-244.
- 172 - LAWSON K.A., J.M. BARNET and C.A. McGILCHRIST, 1987  
Appl. Environ. Microbiol. **53** : 1125-1131.
- 173 - LECHEVALIER H.A. and M. SOLOTOROWSKY, 1965  
In : Three Centuries of Microbiology, Chap. 7 : From soil Microbiology to comparative Biochemistry. McGraw-Hill Book Company Inc.
- 174 - LES INOCULUMS de Légumineuses et leurs applications, 1985  
Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (F.A.O.), 63 p.
- 175 - LESLEY S.M., 1982  
Can. J. Microbiol. **28** : 180-189.

- 176 - LEY A.N., H.R. WARNER and P.L. KAHN, 1972  
Can. J. Microbiol. **18** : 375-384.
- 177 - LI D. and D.H. HUBBELL, 1969  
Can. J. Microbiol. **15** : 1133-1136.
- 178 - LIBBENGA K.P. and R.J. BOGERS, 1974. Root-nodule morphogenesis.  
**In** : The Biology of Nitrogen Fixation. Quispel A. (Ed.), North-Holland Publishing Co, Amsterdam : 430.
- 179 - LINDSTRÖM K., D.W. JARVIS, P.E. LINDSTRÖM and J.J. PATEL, 1983  
Can. J. Microbiol. **29** : 781-789.
- 180 - LONG S.R., W.J. BUIKEMA and F.M. AUSUBEL, 1982  
Nature **298** : 485-488.
- 181 - LOTZ W. and F. MAYER, 1972  
J. Virol. **9** : 160-173.
- 182 - LOTZ W. and F. MAYER, 1972  
Can. J. Microbiol. **18** : 1271-1274.
- 183 - LOTZ W. and H. PFISTER, 1975  
J. Virol. **16** : 725-728.
- 184 - LUFTIG R., 1967  
J. Ultrastruct. Res. **20** : 91-102.
- 185 - LURIA S.E., 1953  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **18** : 237-244.
- 186 - LURZ R., F. MAYER and W. LOTZ, 1975  
Arch. Microbiol. **104** : 171-178.
- 187 - LWOFF A., 1953  
Bacteriol. Rev. **17** : 269-337.
- 188 - LWOFF A. and A. GUTMANN, 1950  
Ann. Inst. Pasteur Paris **78** : 711-739.
- 189 - LWOFF A., R.W. HORNE and P. TOURNIER, 1962  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **27** : 51-62.
- 190 - MANILOFF J., J. DAS and J.R. CHRISTIENSEN, 1977  
Adv. Virus Res. **21** : 343-380.
- 191 - MANNASSE R.J., R.C. STAPLES, R.R. GRANADOS and E.G. BARNES, 1972  
Virology **47** : 375-384.
- 192 - MARANTZ L.A., L.N. MOSKALENKO and Ya.I. RAUTENSTEIN, 1973  
Mikrobiologiya **42** : 1088-1094.

- 193 - MARTIN M.O. and S.R. LONG  
J. Bacteriol. **159** : 125-129.
- 194 - MARVIN D.A. and B. HOHN, 1969  
J. Bacteriol. **33** : 172-209.
- 195 - MATTHEWS R.E.F., 1978  
Int. Congr. Virol., 4th. Center for Agricultural Publishing and  
Documentation, Wageningen, 622 p.
- 196 - MATTHEWS R.E.F., 1982  
Intervirology **17** : 1-199.
- 197 - MEADE H.M. and E.R. SIGNER, 1977  
Proc. Natl. Acad. Sci. **74** : 2076-2078.
- 198 - MEYERS J.H., D. SANCHEZ, L.P. ELWELL and S. FALKOW, 1976  
J. Bacteriol. **127** : 1529-1537.
- 199 - MORTENSON L.E., 1964  
Proc. Natl. Acad. Sci. **52** : 272-279.
- 200 - MORTENSON L.E., 1964  
Biochim. Biophys. Acta **81** : 473-478.
- 201 - MOSELEY W.K. and R.L. WINSLOW, 1959  
J. Dairy Sci. **42** : 906-912.
- 202 - MOSKALENKO L.N. and Ya.I. RAUTENSTEIN, 1969  
Mikrobiologiya **38** : 489-491.
- 203 - NAPOLI C.A. and D.H. HUBBELL, 1975  
Appl. Microbiol. **30** : 1003-1009.
- 204 - NEWTON J.W., P.W. WILSON and R.H. BURRIS, 1953  
J. Biol. Chem. **204** : 445-451.
- 205 - NICOL H. and H.G. THORNTON, 1941  
Proc. Roy. Soc. London, Ser.B, **130** : 32-59.
- 206 - NICOLLE P., 1967  
Bull. Acad. Natl. Med. Paris **151** : 404-409.
- 207 - OGATA S., 1980  
Biotechnol. Bioeng. **22 (suppl. 1)** : 177-193.
- 208 - OTSUJI N., M. SEKIGUCHI, T. IJIMA and Y. TAKAGI, 1959  
Nature **184** : 1079-1080.
- 209 - PAAU A.S., W.T. LEPS and W.J. BRILL, 1981  
Science **213** : 1513-1514.
- 210 - PAGAN J.D., J.J. CHILD, W.R. SCOWCROFT and A.H. GIBSON, 1975  
Nature **256** : 406-407.



- 211 - PALOMARES A., E. MONTOYA and J. OLIVARES, 1978  
*Microbios* **21** : 33-39.
- 212 - PATE J.S., 1977. Functional biology of dinitrogen fixation by legumes.  
*In* : A Treatise on Dinitrogen Fixation, Section III Biology. Hardy R.W.F. and W.S. Silver (Eds), Wileys-Interscience, New-York : 473-517.
- 213 - PATEL J.J., 1976  
*Can. J. Microbiol.* **22** : 204-212.
- 214 - PELCZAR M.J. Jr., E.C.S. CHAN and N.R. KRIEG, 1986  
*Microbiology*, 5ème ed., McGraw-Hill Book Company, New-York.
- 215 - PFANKUCH E. and G.A. KAUSCHE, 1940  
*Naturwissenschaften* **28** : 46.
- 216 - PINET X., 1980  
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.
- 217 - PRANGISMVILI D.A., R.P. VASHAKIDZE, M.G. CHELIDZE and I.Y. GABRIADZE, 1985  
*FEBS Lett.* **192** : 57-60.
- 218 - RADLOFF R., W. BAUER and J. VINOGRAD, 1967  
*Biochemistry* **57** : 1514-1521.
- 219 - RAUTENSTEIN Ya.I. and L.N. MOSKALENKO, 1970  
*Mikrobiologiya* **39** : 507-511.
- 220 - REANNEY D.C. and H.W. ACKERMANN, 1982  
*Adv. Virus Res.* **27** : 205-280.
- 221 - REPORTER M., D. RAVEED and G. NORRIS, 1975  
*Plant Sci. Lett.* **5** : 73-76.
- 222 - REYNOLDS P.H.S., M.J. BOLAND, D.G. BLEVINS, D.D. RANDALL and K.R. SCHUBERT, 1982  
*Trends Biochem. Sci.* **7** : 366-368.
- 223 - RIGBY P.W.J., M. DIECKMANN, C. RHODES and P. BERG, 1977  
*J. Mol. Biol.* **113** : 237-251.
- 224 - ROBERTS R.J., 1984  
*Nucleic Acids Res.* **12** : 167-191.
- 225 - ROPER M.M. and K.C. MARSHALL, 1978  
*J. Gen. Microbiol.* **106** : 187-189.
- 226 - ROSENBERG C., P. BOISTARD, J. DENARIE and F. CASSE-DELBART, 1981  
*Mol. Gen. Genet.* **184** : 326-333.

- 227 - ROUX E. and A. YERSIN, 1888  
Ann. Inst. Pasteur Paris **2** : 629-661.
- 228 - ROVIRA A.D., 1961  
Australian J. Agri. Res. **12** : 77-83.
- 229 - ROVIRA A.D., 1965. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms.  
**In** : Ecology of soil-borne Plant Pathogens. Bakker K.F. and W.C. Snyder (Eds), John Murray, London : 170-184.
- 230 - ROVIRA A.D., 1969  
Bot. Rev. **35** : 35-57.
- 231 - ROVIRA A.D. and J.R. HARRIS, 1961  
Plant and Soil **14** : 199-214.
- 232 - RUSKA H., 1940  
Naturwissenschaften **28** : 45-46.
- 233 - SANDERS M.E. and T.R. KLAENHAMMER, 1981  
Appl. Environ. Microbiol. **42** : 944-950.
- 234 - SCHLOESING T., 1868  
C. R. Acad. Sci. **66** : 237-239.
- 235 - SCHLOESING T., 1873  
C. R. Acad. Sci. **77** : 353-356.
- 236 - SCHROEDER J.L. and F.R. BLATTNER, 1978  
Gene **4** : 167-174.
- 237 - SELVARAJ G. and V.N. IYER, 1981  
Gene **15** : 279-283.
- 238 - SHANTHARAM S. and P.P. WONG, 1982  
App. Environ. Microbiol. **43** : 677-685.
- 239 - SHAPIRO J.A., 1976  
Appl. Environ. Microbiol. **32** : 179-182.
- 240 - SIK T., J. HARWATH and S. CHATTERJEE, 1980  
Mol. Gen. Genet. **178** : 511-516.
- 241 - SIK T. and L. OROSZ, 1971  
Pl. Soil, Spec. Vol., 57-62.
- 242 - SILHAVY T.J., M.L. BERMAN and L.W. ENQUIST, 1974  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York : 191-195.
- 243 - SILVER W.S., Y.M. CENTIFANTO and D.J.D. NICHOLAS, 1963  
Nature **199** : 396-397.

- 244 - SINGH R.B., B. DHAR and B.D. SINGH, 1980  
Arch. Virol. **64** : 17-24.
- 245 - SOUTHERN E.M., 1975  
J. Mol. Biol. **98** : 503-517.
- 246 - SPRENT J.I., 1972  
New Phytologist **71** : 603-611.
- 247 - STACEY G., L.A. POCRATSKY and V. PUVANESARAJAH, 1984  
Appl. Environ. Microbiol. **48** : 68-72.
- 248 - STANIEWSKI R., 1970  
Can. J. Microbiol. **16** : 1003-1009.
- 249 - STANIEWSKI R., 1980  
Acta Microbiol. Polon. **29** : 331-341.
- 250 - STANIEWSKI R., I. JURZYK and Z. LORKIEWICZ, 1973  
Acta Microbiol. Polon., Ser.A, **5** : 21-25.
- 251 - STANIEWSKI R. and W. KOWALSKA, 1974  
Acta Microbiol. Polon., Ser.A, **6** : 183-186.
- 252 - STANIEWSKI R., M. KOWALSKI, E. GOGACZ and F. SOKOLOWSKA,  
1962  
Acta Microbiol. Polon. **11** : 245-254.
- 253 - STANIEWSKI R., M. KOWALSKI and K. GORZKOWSKA, 1963  
Acta Microbiol. Polon. **12** : 184-187.
- 254 - STANIEWSKI R. and A. RUGALA, 1975  
Acta Microbiol. Polon., Ser.A, **3 (8)** : 151-160.
- 255 - STENT G.S., 1963. Molecular Biology of Bacterial Viruses.  
Freeman W.H. (Ed.), San Francisco.
- 256 - STEWART W.D.P., 1977  
Rev. Ambio **6** : 167-173.
- 257 - STUTTARD C. and M. DWYER, 1981  
J. Can Microbiol. **27** : 496-499.
- 258 - SUTTON W.D., C.E. PANKHURST and A.S. CRAIG, 1981  
Int. Rev. Cytol. **13** : 149-177.
- 259 - SVAB Z., A. KONDOROSI and L. OROSZ, 1978  
J. Gen. Microbiol. **2 (106)** : 321-327.
- 260 - THOMAS P.S., 1980  
Proc. Natl. Acad. Sci. **77** : 5201-5205.
- 261 - TIKHONENKO A.S., 1968. Ultrastructure of Bacterial Viruses.  
Izdadelstvo "Nauka", Moscou, Plenum Press, New-York, 1970.

- 262 - TRINICK M.J., 1973  
Nature **244** : 459-460.
- 263 - TURGEON B.G. and W.D. BAUER, 1982  
Can. J. Bot. **60** : 152-161.
- 264 - TWORT F.W., 1915  
Lancet **2** : 1241-1243.
- 265 - VANCE C.P., 1983  
Annu. Rev. Microbiol. **37** : 399-424.
- 266 - VANDECAVEYE S.C. and H. KATZNELSON, 1936  
J. Bacteriol. **31** : 465-477.
- 267 - VINCENT J.M., 1974. Root-nodule symbiosis with **Rhizobium**.  
In : The Biology of Nitrogen Fixation. Quispel A. (Ed.), North-Holland, Amsterdam : 265-341.
- 268 - VINCENT J.M., 1977. **Rhizobium** : General microbiology.  
In : A Treatise on Dinitrogen Fixation, Section III Biology. Hardy R.W.F. and W.S. Silver (Eds), Wiley-Interscience, New-York : 277-366.
- 269 - VINCENT J.M., 1980. Factors controlling the Legume-**Rhizobium** symbiosis.  
In : Nitrogen fixation. Newton W.E. and W.H. Orme-Johnston (Eds), Univ. Park Baltimore, University Park Press **2** : 103-129.
- 270 - VINCENT J.M., 1982. The genus **Rhizobium**.  
In : The Prokaryotes - A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Stazrr M.P., H. Stolp, H.G. Trupper, A. Balows and H.G. Shigel (Eds), Springer Verlag Berlin, Heidelberg and New-York : 818-841.
- 271 - VINCENT J.M. and B. HUMPHREY, 1970  
J. Gen. Microbiol. **63** : 379-382.
- 272 - VIRTANEN A.I., 1945  
Nature **155** : 747-748.
- 273 - VIRTANEN A.I. and T. LAINE, 1946  
Nature **19** : 25-29.
- 274 - WARINGTON R., 1888  
J. Chem. Soc. **53** : 727-755.
- 275 - WEBER K. and M. OSBORN, 1969  
J. Biol. Chem. **244** : 4406-4412.
- 276 - WERQUIN M., H.W. ACKERMANN and R.C. LEVESQUE, 1988  
Appl. Environ. Microbiol. **54** : 188-196.

- 277 - WERQUIN M., H.W. ACKERMANN and R.C. LEVESQUE, 1989  
Current Microbiol. **18** : 307-311.
- 278 - WERQUIN M., C. DEFIVES, S. BOUREY and H.W. ACKERMANN, 1987  
VIIe Congrès International de Virologie, Edmonton, Alberta (Canada).
- 279 - WERQUIN M., C. DEFIVES, L. HASSANI and M. ANDRIANTSIMIAVONA-  
OTONIA, 1984  
J. Virol. Methods **8** : 155-160.
- 280 - WERQUIN M., DEFIVES C. and M.H. SANIEZ, 1984  
6th Int. Congr. Virol., Sendai (Japan).
- 281 - WERQUIN M., M. TAHAR BEN BRAHIM and D. KRSMANOVIC-  
SIMIC, 1977  
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser.D, **284** : 1851-1854.
- 282 - WHITEHEAD P.R. and N.L. BROWN, 1985  
J. Gen. Microbiol. **131** : 951-959.
- 283 - WILLIAMS C.A. and M.W. CHASE, 1968. Methods in immunology and  
immunochemistry, vol. 1 : Preparation of antigens and antibodies.  
Academic Press, Inc., New-York.
- 284 - WILSON P.W., 1958. A symbiotic nitrogen fixation.  
In : Encyclopedia of plant physiology. Ruhland W. (Ed.), Springer  
Verlag, New-York, vol. **8** : 9-47.
- 285 - WINOGRADSKI S., 1889  
Ann. Inst. Pasteur **3** : 49-60.
- 286 - WINOGRADSKI S., 1890  
Ann. Inst. Pasteur **4** : 257-275.
- 287 - WINOGRADSKI S., 1902  
Zentralbl. Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten, Hyg. Abt II, **9** : 43-54.
- 288 - WITTEWER S.H., 1977  
Basic Life Sci. **9** : 515-519.
- 289 - WONG C.H., C.E. PANKHURST, A. KONDOROSI and W.J.  
BROUGHTON, 1983  
J. Cell. Biol. **97** : 787-794.
- 290 - WONG P.P. and R.H. BURRIS, 1972  
Proc. Natl. Acad. Sci. **69** : 672-675.
- 291 - WRIGHT W.H., 1926  
Soil Science **20** : 95-129.
- 292 - YAMAMOTO K.R., B.M. ALBERTS, R. BENZINGER, L. LAWHORNE  
and G. TREIBER, 1970  
Virology **40** : 734-744.

- 293 - YAO P.Y. and J.M. VINCENT, 1969  
Australian J. Biol. Sci. **22** : 413-423.
- 294 - YAO P.Y. and J.M. VINCENT, 1976  
Plant and Soil **45** : 1-16.
- 295 - ZAJAC E. and Z. LORKIEWICZ, 1983  
J. Gen. Microbiol. **129** : 3171-3176.
- 296 - ZELAZNA-KOWALSKA I. and Z. LORKIEWICZ, 1971  
Acta Microbiol. Polon., Ser.A, **3** : 21-28.
- 297 - ZELITCH I., E.D. ROSENBLUM, R.H. BURRIS and P.W. WILSON,  
1951  
J. Biol. Chem. **191** : 292-298.

UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE  
FLANDRES ARTOIS  
-----

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,  
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,  
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,  
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON, J. CORTOIS.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUCHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARO Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

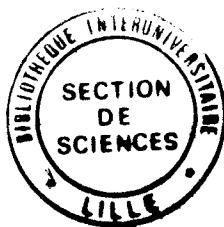


PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHANELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORNARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE Christian	Pétrologie
Mle LEGRAND Denise	Algèbre
Mle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. NESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. HESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre



## R E S U M E

Les microorganismes des genres **Rhizobium** et **Bradyrhizobium** induisent chez les Légumineuses une symbiose active aboutissant à l'assimilation de l'azote de l'air au niveau des nodules racinaires. Prédateurs naturels des bactéries, les bactériophages semblent jouer au niveau du sol un rôle non négligeable sur les souches bactériennes de la rhizosphère et pourraient être impliqués dans le transfert des gènes de la fixation de l'azote. Leur utilisation pratique pour la sélection de souches efficaces ou en génétique en tant que vecteur de gènes passe inéluctablement par la connaissance de ces phages et de leur physiologie.

Le travail de Thèse réalisé nous a permis :

- d'isoler 33 bactériophages de **Rhizobium meliloti** ; 21 d'entre-eux à partir du sol du Nord de la France et 12 autres par action d'agents mutagènes sur 46 souches de **R. meliloti** ;
- de déterminer avec précision les conditions optimales de la lyse phagique en montrant le rôle de l'agitation, de la multiplicité d'infection et des ions bivalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ;
- de mettre au point une technique originale de production de phages en fermenteur de petit volume permettant d'obtenir des suspensions phagiques titrant  $10^{12}$  à  $10^{13}$  UFP/ml ;
- de caractériser nos phages en associant l'étude morphologique au microscope électronique, la spécificité d'hôte, les relations sérologiques, les profils de restriction, l'homologie et les masses de leurs ADN.

Tous les phages étudiés possèdent une tête icosaédrique et une queue contractile ou non. Ils correspondent à 5 morphotypes différents non apparentés correspondant aux familles des Myoviridées (morphotype CM1, 11 phages), des Siphoviridées (morphotypes  $\Phi$ M11S, 3 phages ; NM1, 5 phages ; NM8, 12 phages) et des Podoviridées (morphotype MM1H, 2 phages).

Le type phagique NM1 est peu commun de par la présence de barres transversales sur la queue. Les phages du morphotype  $\Phi$ M11S ne correspondent à aucun autre phage de **R. meliloti** décrit à ce jour et représentent donc une nouvelle espèce.

Les phages tempérés étudiés, en particulier les phages des morphotypes  $\Phi$ M11S et NM1 présentent un aspect et des ADN de masses moléculaires voisines des phages transducteurs connus permettant d'espérer les utiliser comme vecteurs de segments d'ADN.

