

Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Band: 11 (1958)
Heft: 3

Artikel: Transduction des caractères Gal par le bactériophage Lambda
Kapitel: Matériel et méthodes
Autor: Arber, Werner
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-738815>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 19.11.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

son défaut, ne peut être produit que par la coopération d'un phage ne portant pas le même défaut.

Phage transducteur : Phage qui porte l'exogénote et qui de ce fait, dans le cas du phage λ , est génétiquement déficient.

Lysat LFT : Lysat obtenu par induction d'une souche lysogène normale et contenant une faible proportion (10^{-4} à 10^{-6}) de phages transducteurs.

Lysat HFT : Lysat contenant des phages transducteurs et des phages normaux en quantités comparables.

Notations :

$\text{Gal}_x(\lambda)$: souche lysogène normale portant les caractères Gal_x ;

$\text{Gal}_x/\text{ex Gal}_y-\lambda$: souche syngénote lysogène déficiente, l'exogénote portant les caractères Gal_y ;

$\text{Gal}_x(\lambda)/\text{ex Gal}_y-\lambda$: souche syngénote lysogène normale (ces symboles n'impliquent pas qu'il y a nécessairement deux prophages entiers dans cette bactérie);

λdg : phage déficient transducteur du Gal.

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Milieux.

Milieu de culture: 1% Difco-Bacto-Tryptone avec 0,5% NaCl, complété après stérilisation par 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 6,9-7,1.

Milieu pour les dilutions: Tampon phosphatique: 0,7% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,4% NaCl, 0,3% KH_2PO_4 complété après stérilisation par 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 6,9.

Milieu d'adsorption pour λ : 0,01 M MgSO_4 en eau dist. (Kaiser, 1957).

Milieux gélosés pour l'étalement:

- a) pour le dénombrement des bactéries et des plages de phages: 1% Difco-Bacto-Tryptone avec 0,5% NaCl et 1,5% Bacto-Agar;

b) deux milieux indicateurs pour la fermentation du galactose:

1. EMB-galactose: 1% Difco-Bacto-Tryptone, 0,1% Yeast Extract, 0,5% NaCl, 1,5% Bacto-Agar et 0,25% d'un mélange de 20 g K_2HPO_4 , 4 g Eosine Y et 0,65 g bleu de méthylène; complété après stérilisation par 1% de galactose;
2. TTC-galactose: 1% Difco-Bacto-Tryptone, 0,5% NaCl, 1,5% Bacto-Agar, complété après stérilisation par 0,5% de galactose et 0,05% de 2, 3, 5-chlorure de triphenyl-tetrazolium (G. Kellenberger, communication personnelle).

Sur les boîtes EMB-galactose, les colonies Gal^+ sont rouge foncé après 24 à 36 heures d'incubation à 37° , tandis que les colonies Gal^- restent presque incolores.

Sur les boîtes TTC-galactose, qui n'ont été employées que pour les souches prototrophes pour les caractères autres que Gal, les colonies Gal^+ sont uniformément colorées en rouge après 12 à 20 heures d'incubation à 37° , tandis que les colonies Gal^- restent incolores ou — et cela surtout dans le cas des colonies isolées — montrent un centre légèrement rouge et un bord incolore.

Souches de bactéries.

Les souches suivantes, toutes dérivées de *Escherichia coli* K12, ont été utilisées:

- a) *Souches réceptrices*, sensibles à λ : J. Lederberg a mis à notre disposition la souche prototrophe W 3110, la souche W 3079 $F^- M^- Gal_1^- Gal_4^- S^R$ et les souches W 3101 Gal_1^- , W 3102 Gal_2^- et W 3104 Gal_4^- . Les trois dernières sont des dérivées de W 3110; elles ont été choisies parmi les survivantes sensibles à λ après irradiation aux UV de bactéries ségrégeantes Gal^- provenant de souches hétérogénètes lysogènes normales; ces dernières avaient été produites par transduction de W 3110 Gal^+ par des lysats HFT de souches homogénètes pour les caractères Gal^- en question. De la même manière, J. Weigle a produit la souche $Gal_1^- Gal_2^-$. Les caractères Gal_1^- , Gal_2^- et Gal_4^- sont ceux décrits par Morse, Lederberg et Lederberg (1956b). La souche 112 Gal_b^- est décrite par Wollman (1953). Dans la plupart des expériences $Gal_1^- Gal_2^-$ a été utilisée comme souche réceptrice. Elle ne produit pratiquement jamais de réversion, au contraire de 112 Gal_b^- , Gal_2^- et Gal_1^- ;
- b) *Les souches syngénètes lysogènes défectives* utilisées ont été obtenues par transduction à basse multiplicité d'infection

- (m.i.) de souches réceptrices sensibles avec un lysat HFT provenant d'une souche 112 Gal_b⁻ (λ)/ex Gal⁺-λ. Celle-ci a été obtenue par transduction de 112 Gal_b⁻ avec un lysat LFT de C600 Gal⁺ (λ). Cependant, pour certaines expériences génétiques, on a préparé des souches syngénètes lysogènes défectives en partant de lysats LFT de CR 63 (λh) et de C600 (λm₅);
- c) *Les souches syngénètes lysogènes normales* ont été obtenues par transduction à une m.i. d'environ deux phages par bactérie permettant l'infection simultanée par un phage normal et un phage transducteur;
- d) *Quatre souches lysogènes défectives non syngénètes* K12 (λ déf.) ont été utilisées pour les expériences de coopération entre deux prophages défectifs différents: C60 (λi1) et C33 (λ i2) (Appleyard, 1956), P14 (Jacob et Wollman, 1956a) et G2 (Arber et Kellenberger, 1958);
- e) Pour l'étalement des phages λ, *les souches indicatrices* C600 (Appleyard, 1954) et — pour les mutants λh — CR63 (Appleyard, McGregor et Baird, 1956) ont été utilisées.

Bactériophages.

Le bactériophage lambda du type décrit par Kaiser (1957) et quelques-uns de ses mutants ont été utilisés. Le mutant virulent λ2 a été décrit par Lederberg et Lederberg (1953); les mutants *m*₆, *m*₅, *g*₁⁺, *c* et *p*₄ ainsi que les quatre endroits *v*₁ à *v*₄ déterminant ensemble la virulence l'ont été par Jacob et Wollman (1954), le mutant *mi* par Kaiser (1955) et le mutant *h* par Appleyard, McGregor et Baird (1956). La figure 1 montre la disposition de ces marqueurs sur la carte des caractères génétiques de λ.

Les phages 82 et 434 apparentés à λ ont été décrits par Jacob et Wollman (1956b).

Les stocks de phages ont été préparés soit par lyse confluyente sur gélose, soit en milieu liquide, après infection de bactéries sensibles ou après induction de bactéries lysogènes.

Préparation d'un lysat HFT.

Un lysat obtenu par induction de la souche lysogène normale non syngénète W 3110 (λ) (lysate LFT) contient une proportion de 10⁻⁴ phages transducteurs par rapport aux phages normaux. Cette proportion a été déterminée en effectuant sur la souche sensible Gal₁⁻ Gal₄⁻ une transduction à faible multiplicité d'infection (= m.i.) du lysat LFT avec infection simultanée par des phages normaux (m.i. = 5).

Si les phages transducteurs du lysat LFT, adsorbés par des bactéries sensibles, lysogénisent ces dernières, on obtient des bactéries syngénètes: ce sont presque exclusivement des syngénètes lysogènes normales, lorsque la lysogénisation est effectuée à une m.i. de 0,1 ou plus. Après induction au rayonnement UV, ces souches syngénètes lysogènes normales donnent un lysat HFT qui contient des phages normaux et des phages transducteurs en quantités presque égales.

Les phages transducteurs d'un lysat HFT provenant d'une souche hétérogénète lysogène normale possèdent pour la plupart les caractères Gal exogénètes; certains cependant portent des caractères Gal endogénètes de la bactérie productrice (Morse, Lederberg et Lederberg, 1956b). Pour obtenir un lysat HFT de phages transducteurs portant tous les mêmes caractères Gal, il est nécessaire d'avoir des souches homogénètes.

Un lysat HFT (notre n° 78) a été utilisé dans la plupart des expériences décrites; il s'agit d'un lysat concentré par centrifugation provenant d'une souche 112 Gal₆⁻ (λ)/ex Gal⁺-λ induite; celle-ci a été obtenue par transduction par un lysat LFT de C600 Gal⁺ (λ) induite. Pour la souche réceptrice Gal₁⁻ Gal₂⁻ utilisée dans les expériences de transduction, le lysat HFT 78 se comportait comme purement Gal⁺, la souche 112 Gal₆⁻ Gal₁⁻ Gal₂⁻ (λ)/ex Gal⁺-λ étant homogénète pour les caractères Gal₁⁻ et Gal₂⁻. En effet, dans une expérience de transduction à petite m.i. on a trouvé 43 colonies lysogènes déficientes Gal⁺, mais aucune colonie lysogène déficiente Gal⁻.

On a utilisé également parfois les lysats des souches homogénètes Gal₁⁻ (λ)/ex Gal₁⁻-λ et Gal₂⁻ (λ)/ex Gal₂⁻-λ isolées parmi des ségrégeantes Gal⁻ en choisissant celles qui étaient encore capables de produire un lysat HFT.

Les techniques de travail avec les phages sont celles décrites par Adams (1950).

L'indicateur C600 pour le titrage de λ est préparé de la manière suivante: Une culture de 4 à 5 heures, aérée à 37°, ayant atteint 2 . 10⁹ bactéries/ml est centrifugée, reprise en 0,01 M MgSO₄ et aérée pendant 1 heure à 37°. Les bactéries ainsi carencées adsorbent très rapidement les phages λ. Pour la préadsorption de λ, 0,1 ml d'une dilution des phages est mélangé à 0,3 ml de l'indicateur carencé et mis à 45°. Après 15 minutes, on ajoute 2,5 ml de milieu gélosé (0,7% de Bacto-Agar) et on étale le tout sur gélose.

Dans les expériences de croisement on a procédé comme Kaiser (1955).

Pour surinfecter des bactéries après induction, on les carence pendant 1 heure à 37° en 0,01 M MgSO₄. Suivant l'expérience,

ce traitement de carence a lieu avant ou après l'induction. L'influence de la carence sur les bactéries induites est discutée dans les résultats. L'adsorption des phages λ sur des bactéries carencées, à une concentration de $2 \cdot 10^8$ cellules/ml, est de 95% ou plus en 10 minutes, à 37°.

Isolement et purification des souches.

La colonie à isoler est piquée avec une aiguille de platine et resuspendue dans 1 ml de tampon. Avec une anse de platine, une gouttelette est ensuite étalée en stries sur gélose. Après 24 heures d'incubation à 37°, une colonie isolée est repiquée. Généralement ce procédé est répété une ou deux fois.

Induction par irradiation au rayonnement UV.

Sauf indication spéciale, les bactéries lysogènes à induire sont traitées de la manière suivante: Les cultures aérées à 37° sont centrifugées quand elles ont atteint la concentration de $3 \cdot 10^8$ bactéries/ml, puis resuspendues dans le même volume de tampon ou de milieu d'adsorption. Soit immédiatement, soit après une heure de carence à 37°, on effectue l'irradiation des suspensions en couches d'une épaisseur d'environ 1 mm, à une distance de 100 cm de la lampe UV (Westinghouse Germicidal Lamp type W.L.782-30). Puis les bactéries irradiées sont diluées en milieu nutritif et aérées à 37°. Pour éviter la restauration par la lumière visible, toutes les expériences d'induction, de même que celles avec des phages irradiés sont faites dans une chambre éclairée à la lumière rouge clair.

Photorestauration.

Dans les expériences de photorestauration, le tube de croissance est placé dans un bain-marie à 37° à une distance de 13 cm de la lampe (G-E Sunlamp, 275 W).

Examen sérologique.

La méthode employée pour le titrage dans les lysats des souches lysogènes défectives du matériel neutralisant le sérum anti- λ est décrite ailleurs (Arber et Kellenberger, 1958).

Préparation pour la microscopie électronique.

La méthode de la filtration sur agar a été décrite pour l'examen des lysats et le comptage des stocks de phages

(Kellenberger et Arber, 1957) et pour l'examen des lyses individuelles (Kellenberger et Kellenberger, 1957).

Microscope électronique: Trüb-Täuber, type KM.

Test de l'immunité et de la lysogénie des souches.

1. *Par stries et par gouttes:*

a) Immunité envers λ : Au moyen d'une anse de platine une goutte du stock du mutant clair λ_c , d'une concentration d'environ 10^{10} phages/ml, est étalée en une strie à la surface d'une boîte gélosée. Ensuite une goutte de la culture à examiner est déposée en une strie perpendiculaire à la première. Après 16 heures d'incubation à 37° les stries des souches immunes sont ininterrompues, tandis que celles des souches sensibles montrent une zone de lyse à l'endroit où les stries se croisent. Pour reconnaître les mutants résistants par adsorption, on emploie la même technique en utilisant du mutant virulent λ_2 ;

b) Lysogénie active: Une goutte de la culture à étudier est déposée sur une boîte gélosée préalablementensemencée en nappe par des bactéries indicatrices. La boîte est alors irradiée par une dose de rayonnement UV optimale pour l'induction des bactéries lysogènes. Après 16 heures d'incubation à 37° , les bactéries lysogènes actives ont provoqué une zone de lyse, tandis que ni les bactéries lysogènes défectives ni les bactéries sensibles n'ont produit de zones de lyse.

2. *Par la méthode de réplique:*

La méthode des répliques sur velours introduite par Lederberg et Lederberg (1952), appliquée pour la distinction des colonies sensibles, lysogènes actives et lysogènes défectives par Appleyard (1956) et Weigle (1957) est utilisée avec quelques petites modifications.

Pour l'étude de la ségrégation des souches syngénètes lysogènes défectives, les cultures à étudier sont diluées et étalées à la surface d'une boîte EMB-galactose ou TTC-galactose de façon à obtenir environ 200 colonies par boîte. Après 16 heures d'incubation à 37° , les colonies ségrégeantes Gal⁻ sont repérées. On fait alors une réplique sur velours sur une boîte où environ $2 \cdot 10^9$ mutants clairs λ_c ont été préalablement étalés. La boîte est ensuite irradiée avec une faible dose de rayonnement UV (20 secondes) et incubée pendant 10 heures à 37° . Les colonies sensibles ont alors presque disparu tandis que les colonies immunes ont bien poussé. Sans irradiation UV, la différence est moins nette.

Pour distinguer les bactéries lysogènes normales des lysogènes défectives, une réplique est faite sur une boîte ensemencée en nappe par des bactéries indicatrices. Cette boîte est ensuite irradiée aux UV par la dose optimale d'induction (60 secondes). Après 16 heures d'incubation à 37°, les colonies lysogènes normales sont entourées par une zone de lyse tandis que les colonies lysogènes défectives ne montrent pas de zone de lyse, pas plus que les colonies sensibles.

Pour l'analyse des bactéries qui ont été soumises à la transduction et qui forment des mélanges de bactéries lysogènes normales, lysogènes défectives et sensibles (non infectées ou réfractaires), une première réplique est faite sur une boîte ensemencée en nappe par des bactéries indicatrices, puis une seconde sur une boîte contenant du λc .

Qualitativement, le *titrage de la transduction* d'un lysat HFT est obtenu, comme le décrivent Morse, Lederberg et Lederberg (1956b), en déposant une goutte du lysat à étudier sur des boîtes TTC-galactose contenant des bactéries réceptrices; on regarde s'il y a des colonies transduites en Gal⁺ à l'endroit du dépôt après 20 heures d'incubation. Pour tester les caractères Gal⁻ portés par des bactéries après transduction et ségrégation, on dépose une goutte d'un lysat HFT d'une souche homogénote lysogène normale sur la souche à tester et on regarde également s'il y a transduction ou pas. .

Méthodes de titration des phages transducteurs.

Le phage génétiquement défectif n'étant pas capable de former une plage de lyse sur une couche de bactéries sensibles, la méthode de titration des phages normaux n'est donc pas utilisable.

Si le défaut est *dg*, le phage peut transduire des bactéries et le nombre de bactéries transduites peut être une mesure du nombre des phages λdg dans un lysat. Si l'on connaît l'efficacité de lysogénisation, on peut alors calculer le titre des phages transducteurs. Mais cette efficacité est variable avec la m.i., ce qui est dû au phénomène de coopération lors de la lysogénisation entre λdg et un phage normal. On est donc obligé soit d'effectuer la transduction à très petite m.i., soit de surinfecter toutes les bactéries avec au moins un phage normal pour assurer la coopération. Cette dernière méthode a été utilisée le plus souvent: on infecte des bactéries réceptrices ($5 \cdot 10^8$ /ml) avec une m.i. de 10^{-2} à 10^{-3} en phages transducteurs par bactérie en les surinfectant simultanément avec des phages normaux d'un lysat ne contenant pas de phages capables de transduire les caractères Gal⁺ considérés (m.i. = 5). Après 30 minutes

d'adsorption à 37°, on étale des dilutions adéquates à la surface de boîtes TTC-galactose, et on détermine le nombre de colonies transduites Gal⁺ après 20 à 24 heures d'incubation à 37°. Dans ces conditions, l'efficacité de transduction est constante pour des m.i. en phages défectifs de 10⁻¹ à 10⁻⁴, ce qui a été trouvé aussi par Campbell (1957). Nous avons déterminé cette efficacité en comparant le nombre de phages de notre lysat HFT 78 effectuant une transduction dans les conditions indiquées avec le nombre de phages défectifs déterminé par d'autres méthodes (comptage au microscope électronique, transduction après irradiation du lysat HFT au rayonnement UV, nombre de particules du lysat HFT capables de tuer la bactérie réceptrice) et nous avons trouvé une efficacité de transduction de 20%. Ceci correspond à l'efficacité de lysogénisation d'un phage normal lorsqu'il infecte seul une bactérie sensible. Pour trouver le titre en phages transducteurs d'un lysat HFT, il faut donc multiplier par 5 le nombre des transductions effectuées.

Cette méthode permet de titrer des phages transducteurs par un procédé relativement simple. La précision obtenue n'est cependant pas aussi grande que celle de la titration des phages normaux; elle dépend en premier lieu de la détermination de l'efficacité de lysogénisation pour les phages en question. Cette efficacité étant une fonction des conditions physiologiques des bactéries réceptrices, il est indiqué, pour diminuer l'erreur, de faire en parallèle avec le titrage d'un lysat HFT inconnu celui d'un lysat HFT connu, dont le titre a été déterminé par plusieurs méthodes. De cette façon on élimine l'influence de l'état de la culture réceptrice et l'erreur est inférieure à 30% ainsi que l'ont montré des contrôles. C'est cette méthode qui a été utilisée pour les titrations importantes.

D'autres méthodes de titration ont été essayées, mais aucune n'a donné entière satisfaction. Ainsi nous avons tenté de nous servir de l'effet de la coopération lors de la multiplication lytique. En infectant simultanément des bactéries sensibles avec des phages transducteurs et des phages normaux, ou bien en infectant des bactéries lysogènes normales induites avec les phages transducteurs, les deux sortes de phages se propagent. Ainsi on peut multiplier également le phage transducteur et par là augmenter la possibilité de le détecter tôt ou tard par son effet transducteur dans la plage formée. Si la concentration des bactéries est telle que des phages transducteurs sortant de la première bactérie lysée s'adsorbent sur des bactéries voisines ayant reçu en même temps un phage normal, on trouve dans les plages de lyse de petits amas de colonies transduites sur les boîtes TTC-galactose. Par cette méthode on

obtient directement le nombre de phages transducteurs étalés sur les boîtes. Malheureusement, il s'est révélé que la concentration en bactéries est très difficile à choisir. Quand on dépasse une certaine quantité de bactéries, celles-ci ne sont pas multipliées après la première lyse; quand on n'en met pas assez, les bactéries sensibles ont le temps de former des microcolonies avant d'être atteintes par les phages libérés à une certaine distance: il n'y a pas alors infection multiple. Pour cette raison, cette méthode n'est pas indiquée pour l'usage courant, bien qu'elle ait donné occasionnellement le même titre que d'autres méthodes.

Une autre façon de déterminer la somme des titres en phages actifs et en phages transducteurs d'un lysat HFT se base sur la capacité des phages génétiquement défectifs de recombiner avec des phages apparentés 82 ou 434. Le lysat HFT est par exemple adsorbé sur des bactéries lysogènes normales K12 (434) induites par les UV. Après adsorption, mais avant la lyse, on étale en présence de bactéries K12 (434) non induites sur des boîtes gélosées. Les bactéries K12 (434) ayant été infectées par un phage λ actif forment une plage. Une plage se forme également à l'endroit où l'on a déposé une bactérie K12 (434) infectée par un phage λ défectif, à condition qu'au moins un λ recombinant actif puisse se produire. Cette condition n'est cependant pas toujours remplie.

Le comptage du lysat HFT au microscope électronique permet de déterminer le titre en phages morphologiquement intacts.

CHAPITRE II

EXAMEN DE SOUCHES SYNGÉNOTES LYSOGÈNES DÉFECTIVES

I. MANIFESTATIONS DU PROPHAGE DANS LES BACTÉRIES SYNGÉNOTES LYSOGÈNES DÉFECTIVES.

Dans les bactéries lysogènes normales le prophage se manifeste: *a*) par l'immunité de la bactérie envers un phage homologue infectant et *b*) par la libération de phages infectieux normaux lors de la lyse après induction soit spontanée soit provoquée par des agents inducteurs.