

Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 11 (1958)
Heft: 3

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

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. 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. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

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. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

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. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 23.12.2025

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

TRANSDUCTION DES CARACTÈRES GAL PAR LE BACTÉRIOPHAGE LAMBDA¹

P A R

Werner ARBER

(Laboratoire de Biophysique, Université de Genève)

Kat.

(Avec 11 fig.)

INTRODUCTION

Le terme *transduction* a été choisi pour décrire le transfert de caractères du génome bactérien par un bactériophage: un phage s'étant développé dans une bactérie donatrice peut être capable de conférer certains des caractères génétiques de cette dernière à une bactérie réceptrice (Hartman, 1957). Dans la plupart des systèmes bactérie-phage pour lesquels on connaît la transduction, des caractères bactériens quelconques peuvent être transférés par le phage. Morse, Lederberg et Lederberg (1956a) ont cependant découvert un système où seuls des caractères Gal déterminant la fermentation du galactose peuvent être transférés: il s'agit du lysat obtenu par induction de la souche lysogène *Escherichia coli* K12 (λ).

Dans la bactérie K12 (λ), le bactériophage λ est fixé sous forme de prophage dans le génome bactérien près de la région Gal. Ceci a été démontré par Wollman (1953) et Lederberg et Lederberg (1953) à l'aide d'expériences de recombinaison génétique entre des bactéries lysogènes et des bactéries sensibles,

¹ Publication subventionnée par le Fonds Jacques et Nathalie Lebedinsky.

et par Jacob (1955) à l'aide d'une transduction simultanée de la région Gal et de la lysogénie pour λ par le phage 363.

Morse, Lederberg et Lederberg (1956a) ont trouvé qu'une très faible proportion (10^{-6}) des phages obtenus par induction au rayonnement UV de la souche K12 (λ) peuvent, en lysogénisant une bactérie réceptrice, lui communiquer les caractères Gal de la bactérie dont ils proviennent. Ces auteurs n'ont pas pu trouver d'autres caractères transférables, et n'ont pas réussi à trouver des transductions par un lysat obtenu après infection de K12 sensible avec λ .

Morse et al. ont montré que l'agent transducteur de Gal ne peut être qu'une particule phagique, car 1^o cet agent est adsorbé sur des bactéries réceptrices dans les mêmes proportions que le phage λ , 2^o il ne s'adsorbe pas sur les bactéries résistantes par adsorption à λ , 3^o il est inactivé par le sérum anti- λ , 4^o il n'est pas inactivé par la DNase et 5^o il procure à la bactérie transduite l'immunité envers λ .

Dans une bactérie qui a été transduite par λ , Morse, Lederberg et Lederberg (1956a et b) retrouvent, outre les caractères Gal apportés par le phage (caractères exogénotes), les anciens caractères Gal de la bactérie (caractères endogénotes): la bactérie transduite reste hyperploïde pour la région Gal. Lors de la division bactérienne, cette hyperploidie se maintient généralement; elle peut cependant se perdre par ségrégation. Ces auteurs appellent les bactéries hyperploïdes dans une région des syngénotes ou, plus précisément, des hétérogénotes si les caractères exogénotes et endogénotes sont différents les uns des autres et des homogénotes si les caractères exogénotes et endogénotes sont identiques.

Après induction au rayonnement UV, les bactéries lysogènes syngénotes pour la région Gal donnent des lysats qui transduisent les caractères Gal à haute fréquence (lysats HFT) tandis que le lysat de bactéries lysogènes normales transduit à basse fréquence (lysat LFT). Dans certaines conditions on trouve dans un lysat HFT autant de phages capables de transduire que de phages normaux, capables de former une plage. Morse, Lederberg et Lederberg (1956a) ont trouvé que les bactéries transduites par le lysat HFT sont toujours immunes

envers le phage λ . La plupart de ces souches sont lysogènes, mais ces auteurs trouvent aussi des souches qui ne produisent pas de phages tout en étant immunes.

Arber, Kellenberger et Weigle (1957) ont pu montrer que le phage λ transducteur est un phage génétiquement défectif. Le lysat HFT contient deux sortes de phages: des phages normaux actifs et des phages transducteurs génétiquement défectifs. La défectuosité du matériel génétique phagique peut s'expliquer par l'attachement des caractères bactériens Gal au génome phagique. La région du défaut peut être localisée par des expériences de recombinaison génétique. Nous avons montré que le phage génétiquement défectif est capable de tuer et de lyser les bactéries qu'il infecte, mais il ne peut pas entrer dans la phase végétative de multiplication. Sa capacité de lysogéniser une bactérie réceptrice est plus faible que celle du phage normal. D'une telle lysogénisation résultent uniquement des bactéries immunes ne produisant pas de phages infectieux et que nous appelons syngénotes lysogènes défectives. Après infection de la même bactérie par un phage normal actif et un phage génétiquement défectif, la multiplication des deux génomes est assurée. Le phage normal accomplit les fonctions qui manquent au phage défectif. Campbell (1957) a montré que la présence d'un phage normal augmente également l'efficacité de transduction. Les bactéries transduites sont alors syngénotes lysogènes normales.

La coopération entre phage génétiquement défectif et phage normal est un phénomène général, valable aussi pour d'autres phages génétiquement défectifs. En effet, Jacob, Fuerst et Wollman (1957), de même que Arber et Kellenberger (1958) ont montré depuis que les phages défectifs non transducteurs, eux aussi, ne sont produits que grâce à la collaboration entre deux phages.

Dans le présent travail nous exposons des expériences dont les résultats ont déjà été en partie résumés dans une publication précédente (Arber, Kellenberger et Weigle, 1957):

Nous allons comparer les propriétés des souches syngénotes lysogènes défectives avec celles des souches lysogènes normales K12 (λ) et des souches lysogènes défectives K12 (λ déf.) déjà

connues (Appleyard, 1956; Jacob et Wollman, 1956a; Whitfield et Appleyard, 1957; Jacob, Fuerst et Wollman, 1957; Arber et Kellenberger, 1958). Des études concernant l'inductibilité et les produits de lyse vont être exposées. Par surinfection avec des phages normaux de bactéries syngénotes lysogènes défectives induites, il est possible de récupérer certains marqueurs génétiques du prophage défectif transducteur.

Nous montrerons que la perte de l'hyperploïdie dans la région Gal est toujours liée à la disparition de l'immunité conférée à la bactérie lysogène défective par le phage transducteur. Les caractères Gal de la bactérie ségrégeante peuvent être de provenance endogénote ou exogénote.

On étudiera en fonction de la multiplicité d'infection par un lysat HFT: *a)* les colonies lysogénisées et transduites et *b)* les lysats obtenus après un cycle de multiplication. Ces expériences vont permettre d'apporter la preuve de la défectuosité des phages transducteurs et de démontrer le phénomène de coopération entre phages normaux et phages génétiquement défectifs.

Cette coopération, collaboration ou assistance, soit pour la multiplication des phages, soit pour la lysogénération, sera ensuite étudiée. On montrera que la collaboration est également possible entre le phage λ transducteur et des phages apparentés à λ ou des phages λ génétiquement défectifs, pourvu que le défaut ne se situe pas au même endroit dans les deux phages collaborants.

Les propriétés du phage transducteur irradié au rayonnement UV seront étudiées dans un dernier chapitre. On trouvera que les bactéries transduites par un lysat HFT irradié sont restées sensibles à λ et ont incorporé d'une façon stable les caractères Gal apportés par le phage. Il s'agit donc d'un mécanisme de fixation des caractères transduits autre que dans le cas de la transduction par le phage non irradié, dont résultent des bactéries syngénotes lysogènes défectives.

TERMINOLOGIE

La plupart des termes et des symboles employés ici ont été définis par Morse, Lederberg et Lederberg (1956b).

Les souches appelées « immunes » par Morse, Lederberg et Lederberg (1956a) seront appelées ici syngénotes lysogènes défectives, tandis que les souches lysogènes produisant des phages normaux actifs seront appelées lysogènes normales (ou lysogènes actives).

Les particules phagiques ayant dans leur génome un défaut qui ne leur permet pas de se multiplier sans l'assistance d'un autre phage seront appelés phages génétiquement défectifs ou plus brièvement phages défectifs.

Dans la liste suivante on définira quelques termes employés dans ce travail :

Bactérie lysogène normale (ou lysogène active) : Bactérie qui perpétue héréditairement un prophage. Ce dernier peut donner lieu au développement de phages normaux actifs.

Bactérie lysogène défective : Bactérie lysogène dont le prophage porte un défaut, qui empêche la production de phages infectieux.

Transduction : Transfert de caractères génétiques d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par un phage.

Exogénote : Les caractères génétiques bactériens transférés lors d'une transduction.

Endogénote : La partie homologue de l'exogénote sur le chromosome de la bactérie réceptrice.

Bactérie syngénote : Bactérie contenant en plus de son chromosome normal un exogénote. Elle est donc hyperploïde pour un fragment du chromosome.

Bactérie hétérogénote : Bactérie syngénote dont l'exogénote et l'endogénote diffèrent dans un ou plusieurs caractères.

Bactérie homogénote : Bactérie syngénote dont l'exogénote et l'endogénote sont identiques.

Prophage défectif : Matériel génétique phagique qui est perpétué dans la bactérie lysogène défective et qui porte un défaut empêchant le développement de phages infectieux.

Phage (génétiquement) défectif : Particule infectieuse portant le génotype du prophage défectif. Le phage défectif, de par

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 défectif.

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 ;

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

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

λdg : phage défectif 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 K₂HPO₄, 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⁻ Gal₁⁻ Gal₄⁻ S^R et les souches W 3101 Gal₁⁻, W 3102 Gal₂⁻ et W 3104 Gal₄⁻. 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 ségrégantes Gal⁻ provenant de souches hétérogénées lysogènes normales; ces dernières avaient été produites par transduction de W 3110 Gal⁺ par des lysats HFT de souches homogénées pour les caractères Gal⁻ en question. De la même manière, J. Weigle a produit la souche Gal₁⁻ Gal₂⁻. Les caractères Gal₁⁻, Gal₂⁻ et Gal₄⁻ sont ceux décrits par Morse, Lederberg et Lederberg (1956b). La souche 112 Gal_b⁻ est décrite par Wollman (1953). Dans la plupart des expériences Gal₁⁻ Gal₂⁻ a été utilisée comme souche réceptrice. Elle ne produit pratiquement jamais de réversion, au contraire de 112 Gal_b⁻, Gal₂⁻ et Gal₁⁻;
- b) *Les souches syngénotes 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 syngénotes lysogènes défectives en partant de lysats LFT de CR 63 (λh) et de C600 (λm_5);
- c) *Les souches syngénotes 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 syngénotes K12 (λ déf.)* ont été utilisées pour les expériences de coopération entre deux prophages défectifs différents: C60 ($\lambda i1$) et C33 ($\lambda i2$) (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 $\lambda 2$ 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 confluente 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 syngénote W 3110 (λ) (lysat 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 syngénotes: ce sont presque exclusivement des syngénotes lysogènes normales, lorsque la lysogénisation est effectuée à une m.i. de 0,1 ou plus. Après induction au rayonnement UV, ces souches syngénotes 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 hétérogène normale possèdent pour la plupart les caractères Gal exogénotes; certains cependant portent des caractères Gal endogénotes 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 homogénotes.

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 Gal_b⁻(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 Gal_b⁻Gal₁⁻Gal₂⁻(λ)/ex Gal⁺-λ étant homogénote pour les caractères Gal₁⁻ et Gal₂⁻. En effet, dans une expérience de transduction à petite m.i. on a trouvé 43 colonies lysogènes défectives Gal⁺, mais aucune colonie lysogène défective Gal⁻.

On a utilisé également parfois les lysats des souches homogénotes 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 $2 \cdot 10^9$ 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 carent 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.

Photorestoration.

Dans les expériences de photorestoration, 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 λc , 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 $\lambda 2$;
- 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 syngénotes 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 ségrégantes Gal⁻ sont repérées. On fait alors une réplique sur velours sur une boîte où environ $2 \cdot 10^9$ mutants clairs λc 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 multiplement infectées après la première lyse; quand on n'en met pas assez, les bactéries sensibles ont le temps de former des micro-colonies 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.

Par définition, les bactéries syngénotes lysogènes défectives sont également immunes, mais elles ne libèrent pas de phages. D'autres manifestations moins directes telles que l'apparition de recombinants actifs après surinfection des bactéries lysogènes défectives induites par des phages normaux génétiquement marqués permettent cependant de prouver l'existence d'un prophage.

1. Immunité.

Comme déjà dit, le prophage défectif est toujours capable de conférer à la bactérie syngénote lysogène défective l'immu-

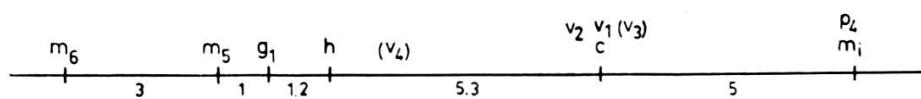


Fig. 1.

Schéma du groupe de liaisons des caractères utilisés
du bactériophage λ .

Distances en pour-cent de recombinants dans des croisements de deux facteurs entre deux phages non irradiés, selon Jacob et Wollman (1954), Kaiser (1955) et Appleyard, McGregor et Baird (1956).

nité envers le phage λ et ses mutants à l'exception du mutant virulent $\lambda 2$. Il n'y a donc pas de différence en ce qui concerne l'immunité entre les bactéries syngénotes lysogènes défectives et les bactéries lysogènes normales.

2. Restauration par les bactéries syngénotes lysogènes défectives des phages virulents $\lambda 2$ inactivés par le rayonnement UV.

Les phages virulents $\lambda 2$ irradiés par le rayonnement UV donnent une proportion de phages survivants plus grande quand ils sont étalés avec des bactéries portant un prophage λ qu'avec des bactéries sensibles (Jacob, 1954; Jacob et Wollman, 1956a; Arber et Kellenberger, 1958). La figure 2 montre que cette réactivation du $\lambda 2$ irradié est également produite par les souches syngénotes lysogènes défectives, mais qu'elle est plus petite qu'avec les bactéries lysogènes normales. Il n'y a pas de différence entre le pouvoir réactivant des souches syngénotes lysogènes normales et celui des souches lysogènes normales non syngénotes.

3. Recombinaison génétique entre le prophage défectif λ dg et le phage λ 2 irradié aux UV et surinfectant.

Dans les lysats de souches syngénotes lysogènes défectives $\text{Gal}^-/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$ infectées avec λ 2 irradié on trouve des recombinants actifs non virulents. Ainsi pour une irradiation de

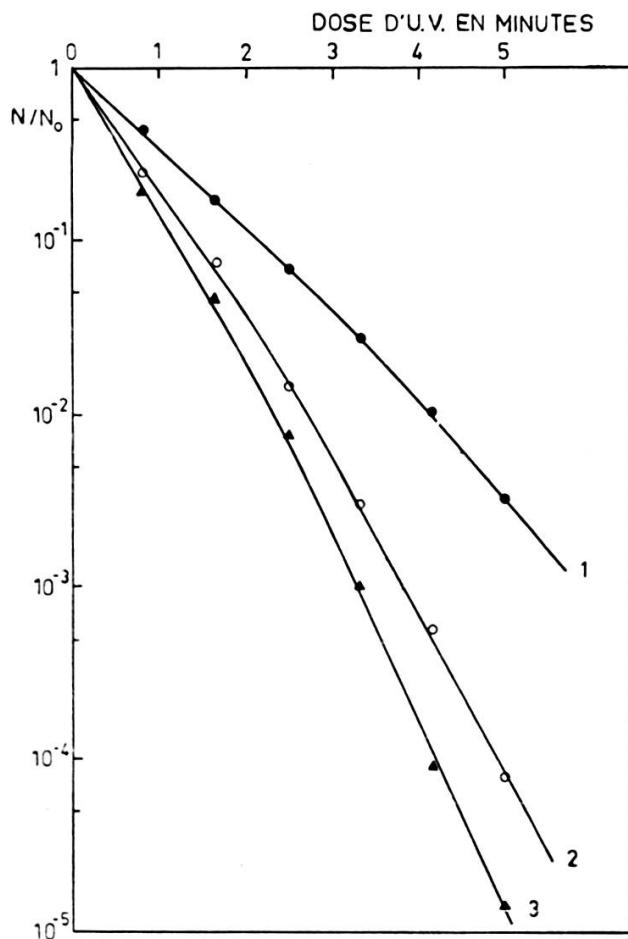


Fig. 2.

Capacité des phages virulents λ 2 irradiés au rayonnement UV de former des plages.

Un stock de λ 2 de $1,4 \cdot 10^8$ phages/ml est irradié à une distance de 55 cm de la lampe UV. Pour différentes doses d'UV un échantillon est dilué, les phages adsorbés sur des bactéries indicatrices carencées et ensuite étalés sur gélose. En abscisse: dose de rayonnement UV en minutes. En ordonnée: fraction des phages capables de former une plage sur la souche indicatrice (1; ●) syngénote lysogène normale, (2; ○) syngénote lysogène défective et (3; ▲) sensible.

300 secondes (correspondant à une survie de λ 2 — étalé sur une souche sensible — de $1,3 \cdot 10^{-5}$), on trouve 16% de recombinants actifs λ 2⁺.

II. INDUCTION A LA LYSE ET PRODUITS DE LYSE.

1. *Inductibilité.*

Les bactéries lysogènes normales et les bactéries syngénotes lysogènes défectives, irradiées avec la même dose optimale de rayonnement UV, se lysent après le même temps de latence,

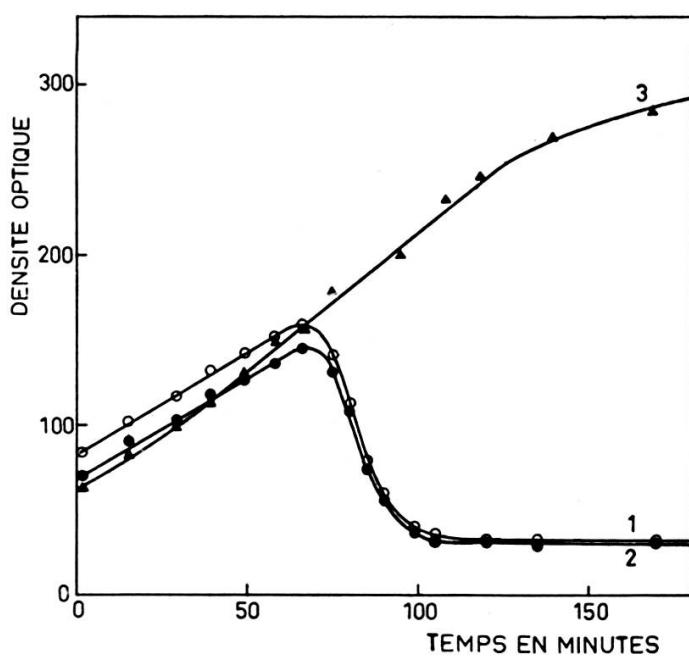


Fig. 3.

Inductibilité par le rayonnement UV d'une souche hétérogène lysogène défective (1; ○), d'une souche hétérogène lysogène normale (2; ●) et d'une souche sensible (3; ▲) ségrégante de la souche lysogène défective.

Des cultures de $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml sont centrifugées, resuspendues en tampon à la même concentration, irradiées avec une dose de 60 secondes de rayonnement UV et diluées quatre fois en tryptone. La densité optique de ces cultures aérées à 37° est mesurée en fonction du temps après l'induction à l'aide d'un photomètre Meunier.

tandis qu'une culture sensible ne se lyse pas après le même traitement (figure 3).

Des essais avec le dichlorène ont montré que les souches lysogènes normales et les souches syngénotes lysogènes défectives sont également inductibles, au même degré, par des agents inducteurs chimiques.

2. Analyse des produits de lyse.

Dans les lysats obtenus par induction de souches syngénotes lysogènes défectives on ne trouve jamais de particule infectieuse ni de particule capable de transduire. L'analyse de ces lysats au microscope électronique ne montre pas de structures liées à la production de phages, c'est-à-dire de phages morphologiquement intacts, de membranes de têtes vides ou de queues, ce qui permet d'exclure qu'il y ait plus de 10^{-2} de ces structures par bactérie induite et lysée. Ces résultats ont été obtenus par l'analyse de plusieurs souches isolées à partir de lysats LFT indépendants, ainsi que par l'examen, au microscope électronique, de plus de 100 lyses individuelles.

Des lysats de bactéries syngénotes lysogènes défectives (induites à $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml) ont été examinés quant à leur contenu en matériel neutralisant le sérum anti- λ (SBP). Dans aucun cas il n'a été possible de trouver du SBP en quantité mesurable, tandis que les lysats de souches lysogènes normales préparés dans les mêmes conditions ont montré une grande quantité de SBP.

3. Recombinaison du phage défectif induit avec un phage surinfectant.

Dans les lysats obtenus par induction de souches syngénotes lysogènes défectives suivie de surinfection par des phages normaux $\lambda m_6 c$, on trouve qu'environ 10% des phages actifs sont du type $m_6 c^+$, 3% $m_6^+ c$ et 1% $m_6^+ c^+$. Le phage surinfectant $\lambda m_6 c$ a donc recombiné avec le phage défectif $\lambda m_6^+ c^+$; on peut en conclure que les marqueurs m_6 et c ont été perpétués avec le génome du prophage défectif de la bactérie syngénote lysogène défective.

4. Courbe d'induction.

La surinfection, par des phages génétiquement marqués, de bactéries syngénotes lysogènes défectives induites est un moyen d'obtenir une courbe d'induction en considérant, en fonction

de la dose UV appliquée sur les bactéries lysogènes défectives: *a)* soit la présence de recombinants actifs dans les centres infectieux, *b)* soit la disparition de l'immunité envers les phages surinfectants, c'est-à-dire la capacité de la bactérie surinfectée de donner lieu à la formation d'un centre infectieux.

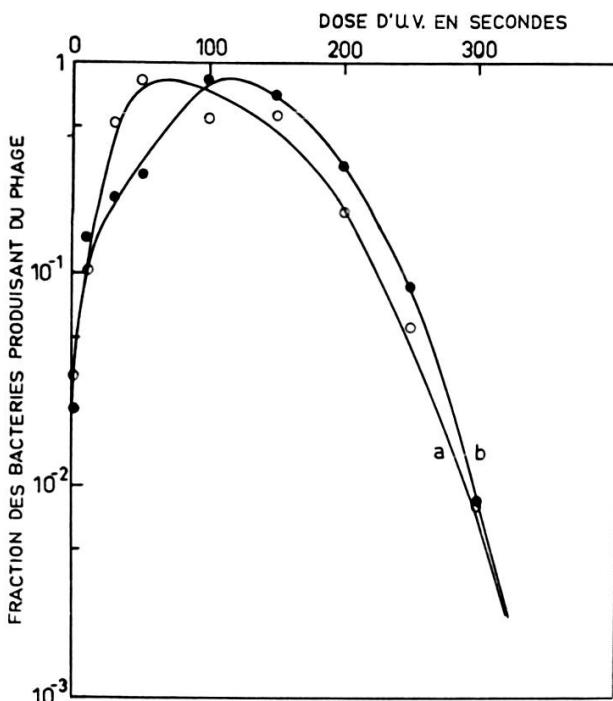


Fig. 4.

Courbes d'induction par le rayonnement UV d'une souche hétérogène lysogène normale 112 Gal_b⁻ (λ)/ex Gal⁺- λ avec et sans carence préalable en 0,01 M MgSO₄.

Une culture de $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml est divisée en deux parties *a*) et *b*). (*a*; ○) est centrifugée, reprise en tampon à $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml et irradiée avec des doses variables de rayonnement UV. Un échantillon est prélevé après chaque irradiation et dilué cinquante fois en tryptone à 37°. 40 minutes plus tard, le nombre des centres infectieux est déterminé par étalement sur gélose avec des bactéries indicatrices. (*b*; ●) est centrifugée, reprise en 0,01 M MgSO₄ à $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml, carencée pendant 1 heure à 37° et irradiée avec des doses variables d'UV. La suite du traitement de *b*) après l'irradiation est la même que pour *a*). En abscisse: dose d'UV en secondes. En ordonnée: fraction des bactéries productrices de phages.

Pour obtenir une bonne adsorption des phages surinfectants, les bactéries ont été carencées en 0,01 M MgSO₄ (Kaiser, 1957) avant l'induction. L'influence de cette carence sur la courbe d'induction a été étudiée avec des bactéries lysogènes normales (figures 4 et 5). Tandis que la dose optimale de rayonnement UV pour les bactéries non carencées est de 50 à 60 secondes, une dose de 110 à 130 secondes est nécessaire pour obtenir une induction optimale dans le cas des bactéries carencées.

La durée de la période latente n'est pas sensiblement prolongée chez les bactéries carencées et induites avec la dose optimale. Par contre le rendement en phages est plus faible (environ 50 phages par bactérie lysée) que chez les bactéries non carencées. On ne sait pas si cela est dû à la carence même ou à la dose plus forte de rayonnement UV.

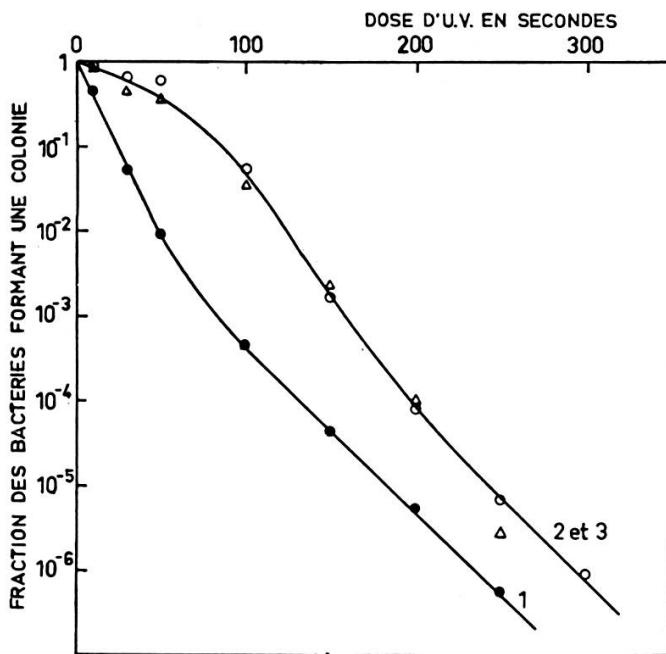


Fig. 5.
Sensibilité des souches au rayonnement UV.

(1; ●) 112 Gal_b^- (λ)/ex $\text{Gal}^+ - \lambda$ hétérogénote lysogène normale en tampon sans carence; (2; △) 112 Gal_b^- (λ)/ex $\text{Gal}^+ - \lambda$ hétérogénote lysogène normale après carence en 0,01 M MgSO_4 et (3; ○) 112 Gal_b^- /ex $\text{Gal}^+ - \lambda$ hétérogénote lysogène défective après carence en 0,01 M MgSO_4 .

(1) a subi le traitement décrit sous a) dans le texte de la figure 4. (2) et (3) ont subi le traitement décrit sous b) dans le texte de la figure 4. Le nombre des bactéries survivantes est déterminé par étalement sur gélose. En abscisse: dose de rayonnement UV en secondes. En ordonnée: fraction des bactéries survivantes.

En outre, on a pu montrer qu'on obtient des courbes d'induction identiques lorsque la carence est faite avant l'induction (comme décrit dans le texte de la figure 4) ou lorsqu'elle la suit immédiatement. Des essais ont été faits pour voir si l'on peut interrompre par une carence durant la période latente le développement des phages dans les bactéries lysogènes induites. Un tel traitement est possible sans perte de centres infectieux et sans diminution considérable du rendement en phages pendant les quarante premières minutes qui suivent l'induction. Les bactéries ainsi traitées peuvent être conservées pendant plusieurs heures à 4° et le développement des phages reprend dès qu'elles sont diluées en tryptone.

Des bactéries hétérogénées lysogènes défectives carencées $\text{Gal}^-/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$ portant le prophage $\lambda dg m_6^+ c^+$ ont été irradiées avec des doses croissantes de rayonnement UV et surinfectées

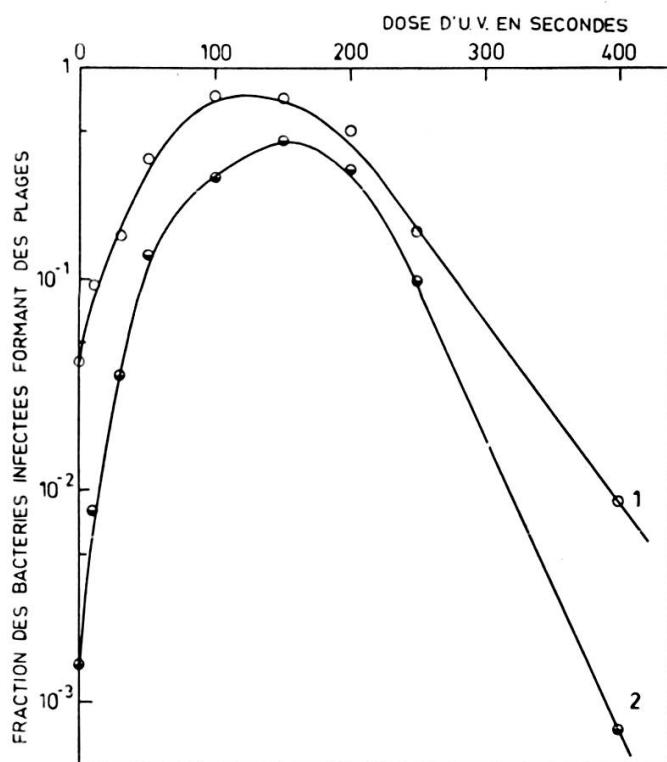


Fig. 6.

Courbe d'induction par le rayonnement UV d'une souche hétérogène lysogène défective 112 $\text{Gal}_b^-/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda_{++}$ par la méthode de surinfection.

Une culture de $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml est centrifugée et resuspendue en milieu d'adsorption. Après une heure de carence à 37° , les bactéries à une concentration de $5 \cdot 10^8$ sont irradiées avec des doses variables de rayonnement UV. Après chaque irradiation, 0,5 ml sont prélevés et mis en contact à 37° avec 0,05 ml d'un stock de phages $\lambda m_6 c$ d'une concentration de $2,5 \cdot 10^8$ phages/ml. Après 10 minutes, 0,05 ml de sérum anti- λ ($k = 15$) sont ajoutés pour neutraliser les phages non adsorbés. 5 minutes plus tard, des dilutions sont étalées sur gélose avec C600. Après incubation, le total des centres infectieux (O) ainsi que le nombre des centres infectieux tachetés (●) sont déterminés. En abscisse: dose d'UV en secondes. En ordonnée: fraction des bactéries infectées produisant un centre infectieux.

avec des phages actifs $\lambda m_6 c$. Le nombre de centres infectieux a été déterminé en fonction de la dose UV (figure 6, courbe 1). La dose optimale est la même que celle que l'on a trouvée pour les bactéries lysogènes normales dans les mêmes conditions de carence. La sensibilité aux UV des souches syngénotes lysogènes défectives est également la même que celle des souches syngé-

notes lysogènes normales (figure 5). Le nombre relativement grand (4%) de bactéries non immunes à $\lambda m_6 c$ pour la dose 0 s'explique par le fait que la culture $\text{Gal}^-/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$ utilisée contenait 4% de bactéries ségrégantes sensibles. La moitié environ des plages contenait des secteurs troubles (figure 6, courbe 2); ces centres infectieux contenaient donc un ou plusieurs phages recombinants actifs c^+ .

5. Photorestoration de l'induction.

L'expérience représentée par la figure 7 montre que les bactéries syngénotes lysogènes défectives sont photorestaurables après l'induction UV, comme le sont les lysogènes normales (Jacob, 1954; Jacob et Wollman, 1955). Dans les conditions

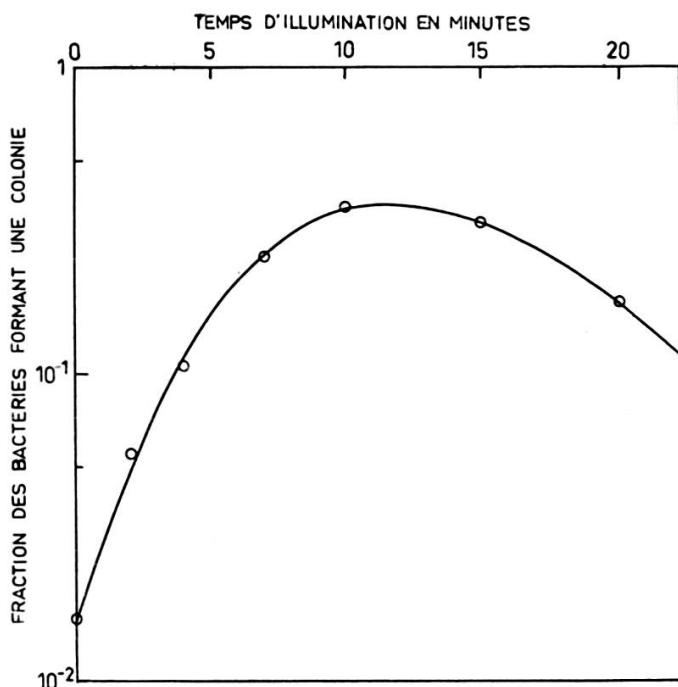


Fig. 7.

Photorestaurabilité d'une souche hétérogénéote lysogène défective après induction par le rayonnement UV.

Une culture de $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml est diluée cent fois en tampon, induite avec une dose de 40 secondes de rayonnement UV, diluée dix fois en tryptone et maintenue à 37° à l'obscurité. Après 8 minutes, le tube de croissance est exposé à la lumière visible dans un bain à 37° . À des temps d'illumination variables, un échantillon est prélevé et remis à l'obscurité à 37° . 50 minutes après l'induction, des dilutions de chaque échantillon sont étalées sur gélose. En abscisse: temps d'illumination par la lumière visible en minutes. En ordonnée: fraction des bactéries formant des colonies.

choisies, le titre des bactéries irradiées formant des colonies est plus de vingt fois plus élevé après illumination avec la dose optimale de lumière visible que sans photorestaurat. La photorestaurat ne peut se faire qu'au premier tiers de la période latente. Après ce temps, la fraction de bactéries photorestaurables diminue fortement. On trouve les mêmes facteurs de photorestaurabilité après des doses d'induction UV relativement faibles (40 secondes) et relativement fortes (200 secondes).

La proportion des bactéries survivantes après induction aux UV et photoréactivation avec la dose optimale de lumière correspond à la proportion de survie des bactéries sensibles — qui elles ne sont pas photorestaurables dans ces conditions — irradiées par la même dose d'UV.

III. COMPORTEMENT DU PROPHAGE LORS DE LA MULTIPLICATION DES BACTÉRIES SYNGÉNOTES.

Il est très rare qu'une bactérie lysogène normale pour le phage du type de référence λ devienne sensible. Parmi 10^4 colonies testées par la méthode de réplique d'une souche K12 (λ/λ) toutes étaient lysogènes normales. La fraction des bactéries sensibles ayant perdu leur prophage a donc été moins de 10^{-4} . Les bactéries étant résistantes à λ par adsorption, on peut exclure que les ségrégantes sensibles éventuelles soient lysogénisées à nouveau par les phages provenant de lyses spontanées. Les sept souches lysogènes défectives du type K12 (λ déf.) qui n'ont pas le défaut *dg*, décrites par Arber et Kellenberger (1958), sont également stables. Cependant, certains mutants de λ , par exemple λp_4 , produisent des lysogènes instables qui, au cours de leur multiplication, ségrègent des bactéries sensibles.

Les cultures de bactéries syngénotes lysogènes défectives contiennent toujours des ségrégantes sensibles, même lorsque le prophage défectif provient du type de référence λ . La perte de l'immunité est souvent accompagnée de la perte par la bactérie de la capacité de fermenter le galactose. Le tableau I donne les résultats de l'étude de la ségrégation dans les souches hétérogénées lysogènes défectives 112 Gal_b⁻/ex Gal⁺- λ . Sur 12.325 colonies testées, on en a trouvé 242 de sensibles dont

TABLEAU I.

Produits de ségrégation de souches hétérogènes lysogènes défectives.

| Souche n° | Nombre de Gal ⁺ lysogènes défectives | Nombre de Gal ⁺ sensibles | Nombre de Gal ⁻ lysogènes défectives | Nombre de Gal ⁻ sensibles |
|-----------|---|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| 4 | 823 | 9 | 2 | 19 |
| 11 | 648 | 7 | 0 | 7 |
| 12 | 496 | 5 | 0 | 6 |
| 13 | 687 | 3 | 0 | 1 |
| 14 | 540 | 9 | 0 | 2 |
| 15 | 478 | 1 | 0 | 15 |
| 16 | 208 | 2 | 0 | 3 |
| 17 | 380 | 1 | 0 | 8 |
| 18 | 625 | 6 | 0 | 10 |
| 19 | 618 | 9 | 0 | 3 |
| 20 | 717 | 3 | 0 | 6 |
| 21 | 558 | 3 | 1 | 8 |
| 22 | 426 | 3 | 0 | 4 |
| 23 | 521 | 4 | 0 | 5 |
| 24 | 425 | 1 | 0 | 5 |
| 25 | 426 | 0 | 0 | 3 |
| 26 | 576 | 6 | 0 | 10 |
| 27 | 798 | 10 | 0 | 1 |
| 28 | 514 | 2 | 0 | 8 |
| 29 | 996 | 6 | 0 | 13 |
| 30 | 620 | 9 | 0 | 6 |
| Total | 12.080 | 99 | 3 | 143 |

De chacune des 21 souches hétérogènes lysogènes défectives 112 Gal_b/ex Gal⁺-λ différentes, une colonie Gal⁺ est repiquée en 10 ml de tryptone et aérée à 37° jusqu'à une concentration de $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml. Des dilutions de ces cultures sont étalées sur des boîtes EMB-galactose. Après 20 heures d'incubation, on analyse les colonies par la méthode des répliques.

143 étaient Gal⁻ et portaient donc au locus considéré le caractère endogénote, tandis que 99 des colonies sensibles étaient Gal⁺, porteuses du caractère exogénote.

La proportion des bactéries parmi les ségrégantes sensibles qui montre le caractère Gal exogénote dépend du caractère Gal que l'on considère. Dans une culture de la souche Gal₁⁻ Gal₂⁻/

ex Gal⁺-λ on a trouvé parmi 3840 colonies testées 3716 syngénites lysogènes défectives, dont 5 Gal⁻ (homogénites), et 124 ségrégantes sensibles, dont 19 Gal⁺ et 105 Gal⁻. 48 des ségrégantes sensibles Gal⁻ ont été analysées quant aux caractères Gal₁ et Gal₂: 43 étaient Gal₁⁻ Gal₂⁻ et 5 Gal₁⁺ Gal₂⁻.

Les ségrégantes sensibles Gal⁺ sont stables; elles ne ségrègent jamais de bactéries Gal⁻. Cette stabilité indique que la bactérie n'est plus diploïde pour le Gal après la ségrégation de l'immunité. Le génome de la bactérie ségrégante porte des caractères endogénites et exogénites, ce qui peut être expliqué comme le résultat d'une recombinaison génétique entre ces caractères homologues.

Plusieurs ségrégantes sensibles Gal⁺ et Gal⁻ ont été examinées pour voir si une partie du prophage subsiste dans la bactérie, c'est-à-dire si la perte de l'immunité est toujours accompagnée par la perte des autres marqueurs du prophage ou pas. Aucune des souches n'a été inducible à la lyse par le rayonnement UV. Après infection des ségrégantes sensibles — induites ou non induites — avec des phages génétiquement marqués, il n'a jamais été possible de retrouver par recombinaison des marqueurs (*c*⁺, *mi*⁺) provenant des prophages qui se trouvaient, avant la ségrégation, dans les bactéries lysogènes défectives. Les lysats ainsi obtenus n'étaient jamais HFT. Si l'immunité est perdue, les autres propriétés détectables du prophage défectif ne se manifestent donc plus.

Parmi les ségrégantes Gal⁻ se trouvent exceptionnellement des bactéries lysogènes défectives (1 à 10% des ségrégantes Gal⁻, suivant les caractères Gal⁻ considérés). Elles ségrègent des sensibles avec la même fréquence que le font les hétérogénites lysogènes défectives. Leurs lysats, obtenus après induction aux UV et surinfection avec des phages normaux (Arber, Kellenberger et Weigle, 1957), sont capables de transduire à haute fréquence. Il s'agit donc d'homogénites Gal⁻/ex Gal⁻-λ.

Les lysats — obtenus par induction et surinfection avec du λ normal — de trois souches ségrégantes Gal⁻ lysogènes défectives qui provenaient d'une souche lysogène défective Gal₁⁻ Gal₂⁻/ex Gal₁⁺ Gal₂⁺-λ ont été analysés quant à leur capacité de transduire (tableau II). Aucun des lysats n'était

capable de transduire les souches sensibles $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ et Gal_2^- . Deux des trois lysats (c50 et c53) ont transduit à haute fréquence les souches Gal_1^- et Gal_4^- . Les deux souches lysogènes défectives sont donc homogénotes pour Gal_2^- . Le lysat obtenu de la souche c44 n'a pas transduit la souche sensible Gal_1^- , mais il a transduit la souche Gal_4^- . La souche c44 doit être

TABLEAU II.

Analyse des caractères Gal de trois souches ségrégantes Gal⁻ restées syngénotes lysogènes défectives.

| Lysat de la souche | Souche réceptrice sensible | | | |
|--------------------------|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ | Gal_1^- | Gal_2^- | Gal_4^- |
| c44 | — | — | — | + |
| c50 | — | ++ | — | ++ |
| c53 | — | ++ | — | ++ |

Des bactéries ségrégantes Gal⁻ provenant d'une souche syngénote lysogène défective $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/\text{ex } \text{Gal}_1^+ \text{Gal}_2^+ \lambda$, et qui sont restées syngénotes lysogènes défectives après la ségrégation, sont induites aux UV et surinfectées avec des phages normaux. Les lysats sont examinés quant à leur capacité de transduire les différentes souches Gal⁻ par le dépôt de gouttes sur des boîtes TTC-galactose ensemencées avec les bactéries réceptrices.

— = pas de transduction.

++ = transduction HFT.

+= transduction HFT, mais moins fréquente que ++.

homogénote $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/\text{ex } \text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- \lambda$. La transduction du lysat c44 sur Gal_4^- était moins efficace que celle des lysats c50 et c53. Cela s'explique par l'effet de position cis-trans de $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_4^-$ (Morse, Lederberg et Lederberg, 1956b).

La ségrégation du prophage défectif a lieu également chez les souches syngénotes lysogènes normales, qui se comportent comme des souches doublement lysogènes pour un prophage normal actif et un prophage défectif (Arber, Kellenberger et Weigle, 1957). Le prophage actif n'est jamais perdu lors de ces ségrégations, si bien que les ségrégantes sont toujours des lysogènes normales ne donnant plus de lysats HFT et stables

pour les caractères Gal, lesquels peuvent être Gal⁻ ou Gal⁺ comme chez les ségrégantes de souches syngénotes lysogènes défectives. Morse, Lederberg et Lederberg (1956a, b) n'ont étendu leur étude des ségrégations de souches hétérogénées lysogènes normales que sur les ségrégantes Gal⁻. Ils ont déterminé la fréquence de ségrégation de Gal⁻ de cultures Gal⁻(λ)/ex Gal⁺- λ , et ont obtenu une probabilité de ségrégation par division bactérienne de $2,6 \cdot 10^{-3}$. Utilisant la même méthode que ces auteurs, nous avons déterminé la probabilité de ségrégation de sensibles dans une culture homogène lysogène défective 112 Gal_b⁻/ex Gal_b⁻- λ et trouvé une valeur de $5,5 \cdot 10^{-3}$ (tableau III). Cette valeur est en accord avec le résultat de Morse et al., étant donné que ces auteurs n'ont cherché que les ségrégantes Gal⁻.

DISCUSSION.

Comparons les propriétés des trois souches lysogènes suivantes: lysogènes normales K12(λ), lysogènes défectives K12(λ déf.) et syngénotes lysogènes défectives Gal⁻/ex Gal⁺- λ . Les trois sortes de souches sont immunes envers λ mais non envers le mutant virulent λ 2.

Dans les lysats de K12(λ) on trouve 100 à 200 phages actifs par bactérie lysée capables de former des plages. Arber et Kellenberger (1958) ont en outre trouvé des structures liées à la production de phages: environ 100 membranes de têtes vides et 100 queues par bactérie lysée; on trouve également du matériel qui neutralise le sérum anti- λ et qui en partie n'est pas lié aux phages ou aux queues.

Les souches K12(λ déf.) sont défectives soit dans la synthèse de certains constituants du phage, soit dans l'assemblage final du phage intact. La défectuosité est spécifique pour chaque souche lysogène défective étudiée. Les caractères défectifs peuvent être localisés sur la carte génétique de λ . Des réversions vers la synthèse de phages actifs semblent se produire.

Les souches syngénotes lysogènes défectives Gal⁻/ex Gal⁺- λ ne sont capables de produire ni des phages normaux, ni des constituants morphologiquement reconnaissables tels que têtes vides ou queues, ni du matériel neutralisant le sérum anti- λ .

TABLEAU III.

Fréquence de ségrégation de bactéries sensibles à partir d'une souche syngénote lysogène défective.

Une culture de $3 \cdot 10^8$ bactéries homogénotes lysogènes défectives $112\text{Gal}_b^-/\text{ex Gal}_b^--\lambda$ par ml est diluée à 14 bactéries par ml. Des pipettes de 0,1 ml sont remplies avec cette suspension et déposées horizontalement à 37° . Après 190 minutes de culture, le contenu de chaque pipette et les 0,1 ml de tryptone provenant du lavage sont étalés sur gélose. Après 16 heures d'incubation à 37° , des répliques sur λc permettent de distinguer les colonies sensibles parmi les colonies lysogènes défectives.

| Nombre de colonies lysogènes défectives | Nombre de colonies sensibles |
|---|------------------------------|
| 20 | 0 |
| 182 | 16 |
| 9 | 0 |
| 97 | 0 |
| 46 | 0 |
| 59 | 0 |
| 168 | 1 |
| 101 | 0 |
| 88 | 40 |
| 95 | 13 |
| Total 865 | 70 |

Nombre de pipettes: 12.

Nombre de pipettes sans bactérie: 2.

Nombre de pipettes avec des bactéries uniquement lysogènes défectives: 6.

Nombre de pipettes avec des bactéries lysogènes défectives et des bactéries sensibles: 4.

Proportion de pipettes ne contenant pas de sensibles: $p_0 = 0,6$.

« Clone-size » moyen: $N = 93,5$.

La probabilité de ségrégation a) par division bactérienne est calculée d'après la formule utilisée par Morse, Lederberg et Lederberg (1956a):

$$a = \frac{2,3}{N} \log \frac{1}{p_0} = 5,5 \cdot 10^{-3}$$

Malgré ce défaut, la bactérie est inductible, et la lyse a lieu au même moment que celle des bactéries lysogènes normales.

Apparemment l'endolysine (Jacob, Fuerst et Wollman, 1957) provoquant la lyse est synthétisée. Cette synthèse peut être interrompue (comme celle des matériaux phagiques par des bactéries lysogènes normales) par la carence au cours de la période latente; elle repart dès qu'on replace les bactéries en milieu nutritif.

La restauration du mutant virulent $\lambda 2$ inactivé par le rayonnement UV est possible aussi bien avec les souches Gal⁻/ex Gal⁺- λ et K12 (λ déf.) qu'avec K12 (λ). Dans les deux premiers cas, le pouvoir réactivant est moins grand que celui des bactéries lysogènes normales.

Le génome λdg semble être incapable de se multiplier végétativement après induction (Arber, Kellenberger et Weigle, 1957). Cependant, aussi longtemps qu'il est lié à la bactérie dans l'état de la lysogénie, il se propage au rythme de la multiplication bactérienne. Ce n'est que dans une division sur 200 qu'il se perd et qu'il en résulte une bactérie sensible.

Il peut sembler que le nombre de ségrégeantes sensibles est augmenté par irradiation au rayonnement UV et ceci surtout quand on évite la photorestoration. Mais on a pu montrer que cette augmentation du rapport entre le nombre de bactéries sensibles et de bactéries lysogènes défectives parmi les bactéries survivantes à l'irradiation n'est due qu'à la sensibilité différente des bactéries. Le rapport initial est retrouvé dans les cultures induites qui ont été photorestaurées avec la dose optimale de lumière visible, et cela aussi bien pour les doses d'UV faibles que pour de fortes doses.

Les bactéries ségrégeantes sensibles sont toujours stables. Leurs caractères Gal sont si fréquemment de provenance exogénote qu'il se pourrait que chaque bactérie ségrégeante ait fait une recombinaison génétique entre endo- et exogénote et ceci probablement au stade de division à chromatides multiples. Les expériences ne permettent pas de savoir si une telle recombinaison a déjà eu lieu dans la bactérie syngénote lysogène défective avant la perte du prophage.

Examinons les différentes explications possibles de l'apparition de ségrégeantes sensibles recombinées dans la région Gal:

1. Admettons que le prophage défectif soit fixé sur la région Gal elle-même ou assez près de celle-ci pour qu'il lui soit possible de faire des recombinaisons avec l'endogénote sans être obligé de se détacher de son propre endroit:
 - a) Il est alors possible que des recombinaisons se fassent fréquemment lors des divisions bactériennes, de sorte que l'on arrive finalement à un équilibre où 50% des caractères sont échangés entre endo- et exogénote. Après la perte du prophage, laquelle ne serait pas en relation avec la recombinaison, on trouvera autant de caractères Gal exogénotes qu'endogénotes dans la bactérie sensible. Si cette explication était juste un lysat $\text{Gal}^-(\lambda)/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$ serait équivalent à un lysat de $\text{Gal}^+(\lambda)/\text{ex Gal}^- \cdot \lambda$ quant à son pouvoir transducteur, ce qui n'est pas le cas (Morse, Lederberg et Lederberg, 1956b);
 - b) Il est possible que chaque recombinaison entre les caractères endo- et exogénotes ait pour conséquence la perte du prophage défectif.
2. Admettons que le prophage défectif soit fixé à un endroit assez éloigné de la région Gal, de sorte qu'il soit obligé de se détacher pour recombiner avec la région Gal endogénote. Ce détachement aurait lieu environ une fois sur 200 divisions bactériennes et ne correspondrait pas à une induction, puisque la bactérie ne se lyse pas. Le prophage détaché pourrait alors se lier aux caractères Gal endogénotes et recombiner avec ceux-ci. Un mécanisme analogue pourrait expliquer comment le phage λdg irradié aux UV transduit une bactérie réceptrice en une bactérie sensible stable Gal^+ (voir chapitre V).

Parmi les ségrégeantes Gal^- d'une souche hétérogénote lysogène défective, 1 à 10% restent syngénotes lysogènes défectives. Si l'on part d'une souche $\text{Gal}^-/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$, on obtient en choisissant les colonies lysogènes défectives Gal^- des souches homogénotes $\text{Gal}^-/\text{ex Gal}^- \cdot \lambda$. Si l'on part de la souche $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/\text{ex Gal}_1^+ \text{Gal}_2^+ \cdot \lambda$, on peut obtenir des homogénotes pour l'un des deux caractères Gal ou pour les deux. On a ainsi

une méthode simple pour isoler des souches Gal⁻ homogénotes lysogènes défectives.

Morse, Lederberg et Lederberg (1956b) ont expliqué par une division mitotique la possibilité qu'a la bactérie syngénote de se multiplier en maintenant endo- et exogénotes inchangés; une division réductionnelle aurait pour conséquence la perte de l'exogénote après une recombinaison de celui-ci avec la partie homologue endogénote. L'automixis permet d'expliquer l'apparition de bactéries homogénotes pour certains caractères Gal.

Ces explications, données pour la propagation et la recombinaison des caractères Gal exogénotes, peuvent être maintenues pour les deux hypothèses 1. b) et 2. déjà exposées, expliquant ainsi l'apparition de ségrégantes sensibles recombinées dans la région Gal. Selon 1. b) une division réductionnelle des caractères Gal entraînerait la perte du prophage, lequel pourrait cependant se maintenir après l'automixis. Selon 2., où le détachement du prophage est la condition pour que la recombinaison ait lieu, la réduction serait le cas où le phage est perdu. L'automixis permettrait au phage de survivre à la recombinaison et de se fixer à nouveau sur le génome bactérien.

CHAPITRE III

DÉFECTUOSITÉ DU PHAGE λ TRANSDUCTEUR DE GAL

I. LYSOGÉNISATION ET TRANSDUCTION DES CARACTÈRES GAL PAR UN LYSAT HFT.

Nous avons pu montrer (Arber, Kellenberger et Weigle, 1957) qu'il est rare d'obtenir des bactéries syngénotes lysogènes défectives lorsque la lysogénisation par un lysat HFT est faite à une multiplicité d'infection (m.i.) de cinq phages actifs par bactérie sensible. Dans ce cas, toutes les bactéries transduites sont des syngénotes lysogènes normales. Par contre, lors d'une lysogénisation à une m.i. de 10^{-3} phages actifs, presque toutes

les bactéries transduites sont des syngénotes lysogènes défectives. Campbell (1957) a fait indépendamment les mêmes constatations et a trouvé que la transduction faite à une m.i. de 1 est environ vingt fois plus efficace que lorsqu'elle est faite à une m.i. de 10^{-3} .

Pour obtenir les résultats donnés dans la figure 8, une culture carencée de bactéries réceptrices $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$, lesquelles ne font pratiquement jamais de réversion spontanée en Gal^+ , a été infectée par le lysat HFT 78 en utilisant différentes m.i. La fraction des bactéries transduites en Gal^+ et celle des bactéries lysogénisées (soit lysogènes normales, soit lysogènes défectives) ont été déterminées pour chaque m.i. par étalement des bactéries infectées sur des boîtes EMB-galactose contenant du sérum anti- λ ; après 20 heures d'incubation, ces boîtes ont été répliquées: *a*) sur des boîtes ensemencées en nappe par des bactéries indicatrices C600 et *b*) sur des boîtes contenant des phages λc .

Pour les petites m.i., le grand nombre de bactéries sensibles qui n'ont pas été infectées ont rendu les mesures difficiles. Ainsi, avec une m.i. de 0,002 en phages actifs, il a fallu étaler $5 \cdot 10^4$ bactéries sensibles pour trouver environ 30 lysogènes normales non transduites et une colonie transduite. Sur la boîte de la réplique contenant du λc , les bactéries qui avaient fait des mutations en résistantes par adsorption rendaient difficile la reconnaissance des colonies immunes. Il a donc été nécessaire de vérifier les résultats obtenus: pour chacune des petites m.i. plusieurs des colonies transduites ont été isolées, nettoyées par stries et testées: *a*) pour la lysogénie normale, *b*) pour l'immunité, *c*) pour la résistance par adsorption et *d*) pour la ségrégation. Les résultats de cette analyse sont donnés dans le tableau IV. Les proportions de syngénotes lysogènes normales et de syngénotes lysogènes défectives correspondent à ce que la méthode des répliques a donné. Les quelques rares souches sensibles Gal^+ qu'on a trouvées sont probablement dues à une sélection de ségrégeantes sensibles lors du nettoyage. Il se pourrait aussi qu'une partie des sensibles Gal^+ soit restée sensible lors de la transduction, ce qui pourrait être dû à des phages λdg inactivés (voir chapitre V).

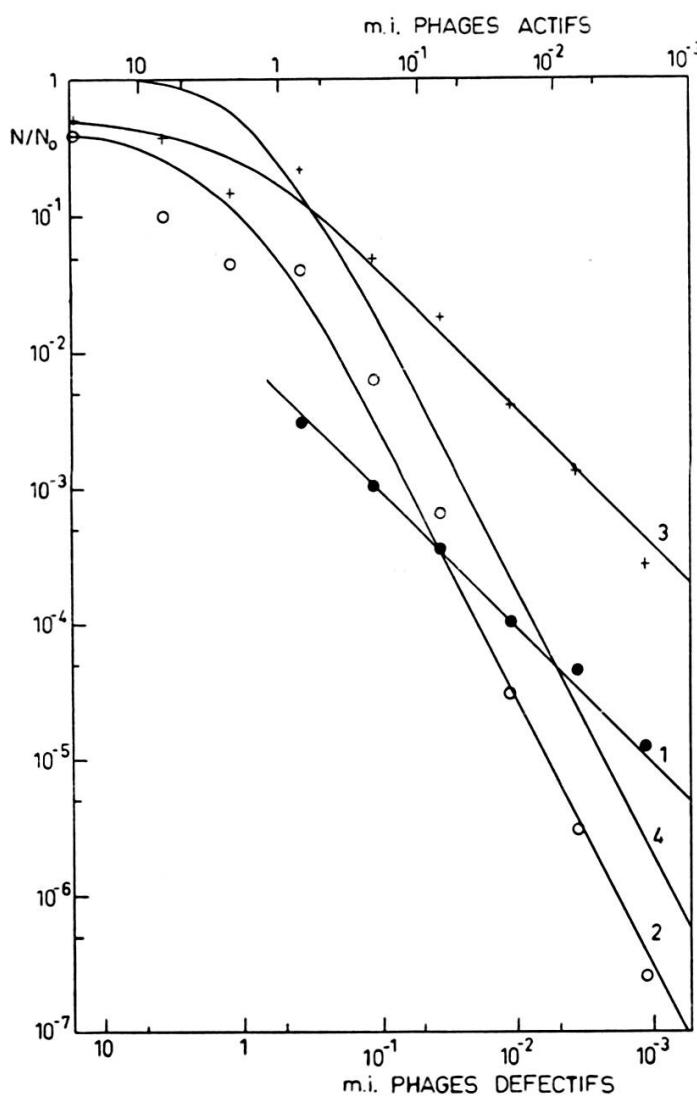


Fig. 8.

Lysogénisation et transduction de la souche réceptrice sensible
 $\text{Gal}_1^- \text{ Gal}_2^-$ par le lysat HFT 78.

Une culture de 10^9 bactéries/ml est centrifugée, resuspendue en milieu d'adsorption à la même concentration et carencée pendant 1 heure à 37°. Ensuite, différentes dilutions du lysat HFT ($4,4 \cdot 10^{10}$ phages actifs/ml et $2,3 \cdot 10^{10}$ phages défectifs/ml) sont ajoutées à des échantillons de la culture réceptrice carencée. Les tubes d'adsorption sont laissés pendant 30 minutes à 37°, ce qui permet une adsorption de plus de 98 %. Leur contenu est ensuite dilué cinquante fois en milieu nutritif. Après un séjour de 10 minutes à 37° et 20 minutes à 20°, des dilutions sont étalées sur des boîtes EMB-galactose contenant du sérum anti- λ . Après 20 heures d'incubation à 37°, les colonies sont testées par la méthode de réplique pour les caractères Gal, l'immunité et la lysogénie normale. En abscisse: la multiplicité moyenne en phages actifs (m.i., phages actifs) et en phages défectifs (m.i. phages défectifs). En ordonnée: N/N_0 avec N_0 = concentration de la culture réceptrice et N = concentration des bactéries rendues (1; ●) syngénètes lysogènes défectives, (2; ○) syngénètes lysogènes normales et (3; +) lysogènes normales totales = syngénètes et non syngénètes. La courbe 4 représente la fraction des bactéries qui sont infectées simultanément avec un phage actif et un phage défectif au moins; cette fraction a été calculée pour les diverses m.i. d'après la loi de distribution de Poisson.

On voit sur la figure 8 (courbe 3) que la probabilité de l'établissement de la lysogénie normale totale (somme des lysogènes normales transduites et non transduites) est d'environ 20% pour les bactéries infectées par un seul phage, si bien que

TABLEAU IV.

Transduction en fonction de la multiplicité d'infection.

| M.i. phages défectifs | M.i. phages actifs | Nombre de colonies Gal testées | | | | $p_{\text{syngé-}}^{}$ note lysogène normale | p_{Gal^+} actif |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------|--|--------------------------------------|
| | | Total | Lyso- gènes nor- males | Lyso- gènes défec- tives | sens- sibles | | |
| 0,37 | 0,7 | 20 | 19 | 1 | 0 | 0,49 | 0,50 |
| 0,11 | 0,22 | 20 | 12 | 8 | 0 | 0,07 | 0,20 |
| 0,037 | 0,07 | 18 | 11 | 6 | 1 | 0,075 | 0,068 |
| 0,011 | 0,022 | 40 | 9 | 30 | 1 | 0,015 | 0,022 |
| 0,0037 | 0,007 | 50 | 3 | 46 | 1 | 0,003 | 0,007 |
| 0,0011 | 0,0022 | 50 | 1 | 48 | 1 | 0,001 | 0,002 |

Sur des boîtes EMB-galactose de l'expérience décrite dans le texte de la figure 8, des colonies Gal^+ ont été isolées et nettoyées deux fois par stries. Ensuite, ces souches ont été testées pour l'immunité envers λc , pour la résistance envers $\lambda 2$ et pour la lysogénie normale.

m.i. phages actifs = multiplicité d'infection en phages normaux, actifs.

m.i. phages défectifs = multiplicité d'infection en phages défectifs.

p_{Gal^+} actif = probabilité d'une bactérie infectée par un phage défectif au moins de recevoir également un phage actif au moins.

$p_{\text{syngé-}}^{}$
 note
 lysogène
 normale = nombre des colonies syngénotes lysogènes normales divisé par la somme des syngénotes lysogènes normales plus 20 fois le nombre des syngénotes lysogènes défectives.

le nombre de lysogènes normales diminue linéairement avec la m.i. pour des m.i. entre 10^{-1} et 10^{-3} . Pour les bactéries multiplemement infectées, la fraction des cellules lysogénisées atteint 50%.

Les bactéries transduites en Gal^+ se composent de deux types avec deux probabilités de lysogénérisation différentes:
a) la fraction des syngénotes lysogènes défectives (figure 8,

courbe 1) montre une dépendance linéaire de la m.i., semblable à celle des bactéries lysogènes normales non transduites, mais avec une probabilité différente. Autrement dit, la probabilité par bactérie infectée de devenir lysogène défective est constante pour les bactéries infectées par un seul phage transducteur. Nous reviendrons plus loin sur ce point; *b)* la formation des syngénotes lysogènes normales (figure 8, courbe 2) semble dépendre du carré de la m.i. ou, en d'autres termes, la probabilité pour une bactérie transduite d'être lysogène normale est proportionnelle à la fraction des bactéries qui sont doublement ou multiplement infectées pour la m.i. donnée.

Ces résultats peuvent être interprétés suivant l'hypothèse suivante: le lysat HFT contient deux sortes de phages: *a)* des phages normaux, actifs qui ne sont pas capables de transduire et qui ne se distinguent en rien des phages λ d'un stock obtenu lytiquement; *b)* des phages qui contiennent — génétiquement liée — la région Gal, et qui sont seuls capables de transduire. Les bactéries transduites à de faibles multiplicités étant toujours lysogènes défectives, il faudrait penser que les phages transducteurs infectants eux-mêmes sont génétiquement défectifs. Le défaut *dg* est dû à la présence de la région Gal dans le génome du phage. Pour savoir si cette hypothèse est compatible avec les courbes de la figure 8, il est nécessaire de connaître la concentration des phages défectifs dans le lysat HFT 78 utilisé pour la transduction.

2. Titrage du lysat HFT 78 au microscope électronique.

Les phages actifs sont par définition capables de former des plages quand on les étale sur des bactéries indicatrices. La détermination du titre en phages actifs d'un lysat se base sur cette propriété des phages. Les phages défectifs étant incapables de se propager en série doivent être dénombrés par un autre moyen.

Le titrage d'un lysat au microscope électronique donne la concentration en phages morphologiquement intacts, qui peuvent être actifs ou inactifs. Kellenberger et Arber (1957) ont montré que le titre des phages morphologiquement intacts

dans un lysat est à peu près identique à celui des phages actifs. En admettant que, dans le lysat HFT, tous les phages inactifs, mais morphologiquement intacts soient défectifs, on peut mesurer leur titre par la différence entre le titre des phages morphologiquement intacts et celui des phages actifs.

Trois déterminations indépendantes du titre des phages morphologiquement intacts, résumées dans le tableau V, ont

TABLEAU V.

Titration du lysat HFT 78 au microscope électronique.

| Exp. | Latex | Comptages | | Phages morpholog. intacts/ml |
|------|--------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | Latex | Phages morpholog. intacts | |
| 1 | 15N-23 | 272 | 1219 | $6,7 \cdot 10^{10}$ |
| 2 | 15N-23 | 1677 | 3907 | $7,0 \cdot 10^{10}$ |
| 3 | 15N-7 | 512 | 1595 | $6,2 \cdot 10^{10}$ |

Titre moyen, en tenant compte des poids statistiques des trois expériences: $6,7 \cdot 10^{10}$ phages intacts/ml.

Des échantillons du lysat HFT 78 sont mélangés avec des dilutions de polystyrène latex de concentration connue, puis préparés pour le microscope électronique. Sur les micrographies, les rapports entre latex et phages sont déterminés. Méthode de préparation d'après Kellenberger et Arber (1957).

donné un titre moyen de $6,7 \cdot 10^{10}$ phages/ml du lysat HFT 78. L'erreur du titrage, due surtout à l'imprécision avec laquelle le titre de la suspension de latex est déterminé, est de 25% environ.

La moyenne de plusieurs titrages des phages actifs du lysat HFT 78 a été de $4,4 \cdot 10^{10}$ phages/ml. Par différence on obtient ainsi une concentration de $2,3 \cdot 10^{10}$ phages défectifs/ml pour le lysat HFT 78.

Aucune différence morphologique n'a pu être remarquée entre les phages du lysat analysé.

3. *Interprétation des résultats de l'expérience de transduction en fonction de la m.i. selon notre hypothèse.*

A de petites multiplicités (m.i. en phages actifs 10^{-2} à 10^{-3}) la plupart des bactéries infectées n'ont adsorbé qu'un seul phage, soit actif soit défectif. Le phage actif, en infection simple, a une probabilité de 20% de lysogéniser la bactérie réceptrice. Celle-ci n'est jamais transduite. Dans les mêmes conditions d'infection, le phage défectif a une probabilité de 1% d'établir la lysogénie défective, tout en rendant Gal⁺ la bactérie réceptrice. Même lors d'une transduction à basse m.i., une certaine fraction des bactéries sont infectées simultanément avec un phage actif et un phage défectif au moins (courbe 4 de la figure 8). Le phage actif peut alors rendre la bactérie lysogène normale et le phage défectif peut la rendre Gal⁺ en établissant une lysogénie défective. La bactérie sera alors « doublement » lysogène, pour le phage actif et le phage défectif. En effet, la fraction des syngénotes lysogènes normales (courbe 2) diminue parallèlement à la courbe 4 représentant la fraction des bactéries infectées, théoriquement, par les deux sortes de phages. La différence entre les courbes 2 et 4 permet de déterminer la probabilité de lysogénisation dans ces conditions. Celle-ci est de 16%, donc pratiquement identique à la probabilité de 20% trouvée pour le phage actif seul. Il est remarquable que la probabilité de la transduction soit vingt fois plus grande dans le cas de l'infection par les deux sortes de phages que dans le cas de l'infection simple par un phage défectif. Cette *coopération* du phage actif lors de la fixation du prophage défectif sera discutée plus loin. Une conséquence de cette différence de l'efficacité de transduction est qu'à une m.i. en phages défectifs de $4 \cdot 10^{-2}$ il y a encore autant de syngénotes lysogènes normales que de syngénotes lysogènes défectives. Ainsi, à des m.i. élevées, on ne trouve que très exceptionnellement des syngénotes lysogènes défectives.

Ces constatations sont confirmées par les résultats obtenus après nettoyage des souches transduites à différentes m.i. (tableau IV). En sélectionnant les Gal⁺ nous ne considérons

que les bactéries infectées par un phage défectif au moins et qui en plus ont été lysogénisées. Connaissant les m.i., on peut calculer la probabilité pour une bactérie d'avoir reçu un ou plusieurs phages λdg et un ou plusieurs phages actifs (p_{Gal^+} actif). D'après notre supposition, la probabilité de trouver parmi les bactéries transduites des syngénotes lysogènes normales devrait correspondre à p_{Gal^+} actif, si les efficacités de lysogénisation étaient toujours les mêmes. Or nous avons vu que les phages transducteurs lysogénisent environ vingt fois moins bien après infection simple que dans le cas d'une infection mixte entre phages actifs et phages défectifs. On peut alors obtenir des valeurs expérimentales comparables à p_{Gal^+} actif en établissant le rapport entre le nombre de colonies lysogènes normales et la somme du nombre des lysogènes normales plus vingt fois le nombre des lysogènes défectives. Les valeurs ainsi obtenues ($p_{syngénote lysogène normale}$) correspondent assez bien aux valeurs théoriques (p_{Gal^+} actif), étant donné le nombre relativement petit de colonies testées.

Si notre hypothèse de l'hétérogénéité du lysat HFT est compatible avec l'expérience de transduction décrite, cette dernière ne permet cependant pas d'écartier une autre possibilité, à savoir que le lysat HFT ne contient qu'une seule sorte de phages, tous capables de transduire, et que lors de la lysogénisation de la bactérie les phages effectuant une transduction se fixent autrement que les phages ne faisant pas de transduction. La défectuosité des souches transduites s'expliquerait alors par la mauvaise fixation du prophage. Cette interprétation peut cependant être écartée grâce aux conclusions d'une expérience de multiplication des phages d'un lysat HFT, expérience qui sera exposée dans le prochain paragraphe.

4. Multiplication du phage transducteur.

Selon notre hypothèse, les bactéries infectées uniquement avec un phage actif ne libéreront lors de la lyse que des phages actifs, incapables de transduire. En effet, les stocks de phages obtenus par multiplication lytique ne sont jamais LFT (Morse, Lederberg et Lederberg, 1956a). Tenant compte du comporte-

ment des bactéries syngénotes lysogènes défectives induites par les UV, on peut prévoir qu'un phage défectif infectant seul une bactérie produira la lyse, mais ne se multipliera pas. Ainsi, le lysat obtenu par infection à basse m.i. de bactéries sensibles avec un lysat HFT ne doit plus être capable de transduire.

Le lysat HFT 78 a été adsorbé sur des bactéries sensibles $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ et les titres en phages actifs et en phages transducteurs des lysats obtenus après un cycle de multiplication ont été déterminés. Les résultats pour différentes m.i. sont représentés par la figure 9. Le nombre des centres infectieux diminue linéairement avec la m.i. pour les petites m.i. (courbe 1). On trouve la même dépendance de la m.i. pour le nombre des bactéries devenues lysogènes normales (courbe 2) et elle correspond à ce qu'on avait trouvé dans l'expérience de transduction rapportée sur la figure 8.

Les titres des phages actifs dans les lysats sont représentés par la courbe 3. Pour les petites m.i. ils diminuent parallèlement aux titres des centres infectieux. Le rendement moyen est de 60 phages actifs par centre infectieux tandis qu'il est plus petit pour les m.i. élevées.

Le titre des phages capables de transduire dépend du carré de la m.i. A des m.i. élevées, ces phages transducteurs se multiplient parallèlement aux phages actifs — comme Weigle (1957) l'a déjà montré — de sorte que le rapport entre le titre en phages transducteurs et en phages actifs est le même avant et après un cycle de multiplication. Pour les petites m.i., ce rapport est fortement diminué par le cycle lytique.

Si tous les phages du lysat HFT étaient identiques, la multiplication de la capacité de transduire ne devrait pas dépendre de la m.i. Notre hypothèse de l'hétérogénéité du lysat HFT est donc confirmée: les bactéries n'ayant reçu que des phages défectifs ne produisent pas de phages. Les phages actifs (courbe 3, figure 9) proviennent de bactéries ayant reçu des phages actifs. Un nouveau fait apparaît: les phages transducteurs (courbe 4) doivent être produits par des bactéries ayant été infectées simultanément par des phages actifs et par des phages défectifs. Seule une *coopération* entre phages actifs et

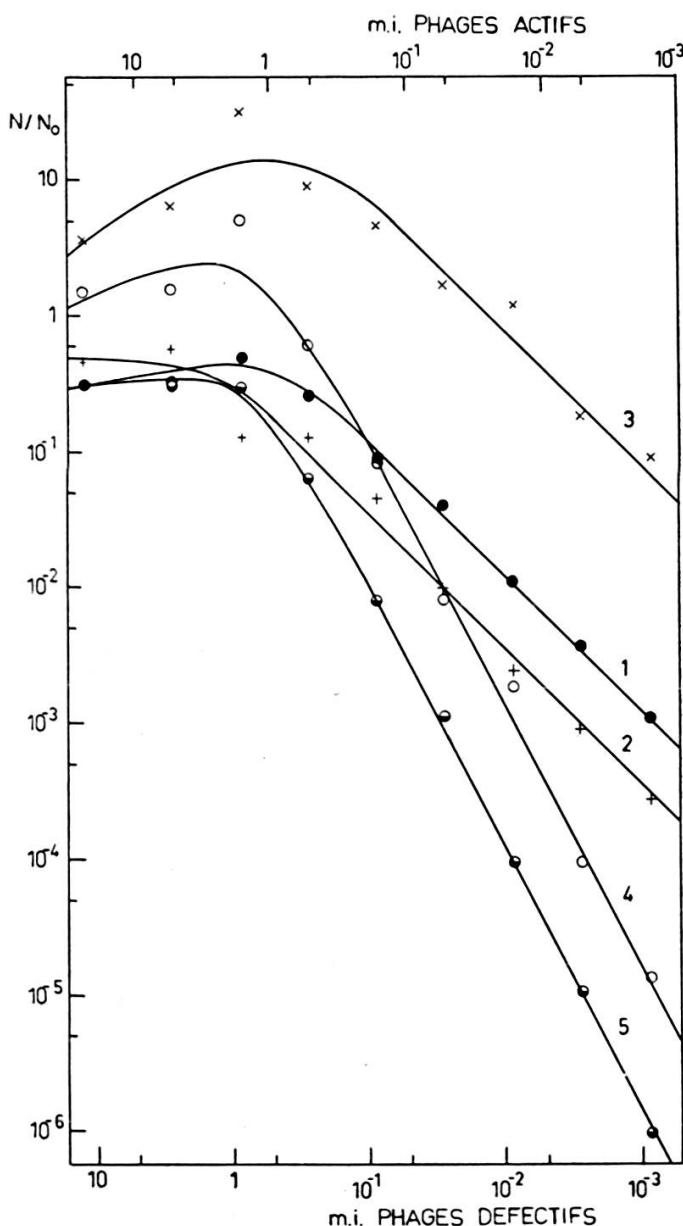


Fig. 9.

Multiplication du lysat HFT 78 sur la souche $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ sensible.

Une culture de $4 \cdot 10^8$ bactéries/ml d'une souche $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ carencée est infectée avec différentes dilutions du lysat HFT 78 ($4,4 \cdot 10^{10}$ phages actifs/ml et $2,3 \cdot 10^{10}$ phages défectifs/ml). Après 30 minutes d'adsorption à 37° , ces mélanges sont dilués dix fois en tryptone et aérés à 37° . 20 minutes plus tard, le nombre de centres infectieux (plages) et celui des bactéries lysogénisées (petites colonies entourées d'une plage) sont déterminés par étalement en présence de bactéries indicatrices C600 irradiées aux UV. 55 minutes après la dilution en tryptone, les cultures sont chloroformées et centrifugées. Ces lysats sont titrés quant à leur contenu en phages actifs et en phages défectifs, ces derniers étant déterminés par la méthode de transduction à basse m.i. et surinfection (m.i. = 5) avec des phages actifs ne contenant pas de transducteurs. En abscisse: le nombre de phages actifs (m.i. phages actifs) et de phages défectifs (m.i. phages défectifs) du lysat HFT 78 par bactérie $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$. En ordonnée: N/N_0 = concentration de (1; ●) bactéries formant un centre infectieux, (2; +) bactéries lysogénisées: somme des lysogènes normales transduites et non transduites, (3; ×) phages actifs dans le lysat après un cycle de multiplication, (4; ○) phages transducteurs dans le lysat après un cycle de multiplication et (5; ◑) bactéries qui forment un centre et qui sont également infectées par un phage défectif au moins, calculé d'après la loi de distribution de Poisson.

phages défectifs assure donc la multiplication des phages défectifs transducteurs.

Si l'on infecte une culture sensible avec un lysat HFT à une m.i. élevée, presque toutes les bactéries adsorbent les deux sortes de phages. Après un cycle de multiplication, le lysat contient alors à peu près la même proportion de phages défectifs que le lysat HFT original.

Après infection à m.i. basse, une faible proportion des bactéries seulement est infectée simultanément par les deux sortes de phages. Dans l'expérience représentée dans la figure 9 nous avons calculé cette proportion pour chaque m.i. en multipliant la fraction des bactéries formant un centre infectieux par la probabilité pour une bactérie d'être infectée avec un ou plusieurs phages défectifs (courbe 5). On remarquera que cette courbe théorique qui représente les centres produisant des phages défectifs et la courbe 4 des phages défectifs transducteurs produits sont parallèles. Ceci confirme que les phages transducteurs ne sont produits qu'après infection mixte et jamais après infection par des phages défectifs seuls. Ce phénomène de coopération entre le phage actif et le phage défectif sera discuté plus loin. La distance entre la courbe 5 et la courbe 4 permet de déterminer le rendement en phages défectifs, qui est, dans le cas de l'expérience de la figure 9, de 13 phages défectifs par bactérie productrice.

5. *Actions des phages défectifs après adsorption sur des bactéries sensibles.*

D'une part, le phage défectif qui infecte seul une bactérie sensible n'est pas capable de se reproduire, d'autre part environ 1% seulement des bactéries infectées par des phages défectifs deviennent lysogènes défectives. Nous décrirons ci-dessous ce qui arrive aux autres bactéries infectées.

- a) *Effet létal sur les bactéries sensibles.* — Si la multiplicité d'infection en phages actifs est située entre 1 et 0,1, les bactéries qui survivent à l'infection sont des bactéries sensibles non infectées ou des bactéries sensibles réfractaires ou encore des bactéries lysogénisées. Arber, Kellenberger

et Weigle (1957) ont mentionné que le nombre de bactéries survivantes — après infection par un lysat HFT — est environ deux fois plus petit que le nombre calculé d'après la m.i. en phages actifs. Les phages défectifs sont capables de tuer la bactérie sur laquelle ils ont été adsorbés. Une confirmation de ces observations sera donnée dans le tableau IX (3^e ligne).

- b) *Lyses individuelles observées au microscope électronique.* — Des bactéries sensibles Gal₁⁻ Gal₂⁻ ont été infectées avec le lysat HFT 78 à une m.i. en phages actifs de 0,42 et diluées ensuite dans du milieu nutritif. Vers la fin de la période latente un échantillon de la culture est préparé pour l'observation de lyses individuelles au microscope électronique. Nous avons fait 27 micrographies de bactéries lysées prises au hasard sur les préparations. 18 plages de lyse ont montré des phages morphologiquement intacts et des structures liées à la production de phages (queues et têtes vides), tandis que 9 plages de lyse ne contenaient aucune de ces particules, seuls les débris de la bactérie lysée étant visibles. Ces dernières figures de lyse correspondent à celles montrées par des bactéries syngénotes lysogènes défectives induites. Le rapport entre le nombre de bactéries libérant des phages et le nombre de bactéries ne produisant pas de structures visibles correspond au rapport entre le titre des phages actifs et celui des phages défectifs dans le lysat HFT. Des contrôles ont montré qu'au microscope électronique les bactéries lysées par des phages normaux (non HFT) produisent toujours des phages lors de la lyse.

DISCUSSION.

Les propriétés d'adsorption, d'inactivation par le sérum anti-λ et la résistance à la DNase (Morse, Lederberg et Lederberg, 1956a) indiquent que le pouvoir transducteur d'un lysat HFT pour les caractères Gal est lié à une particule phagique. La nature de ces particules transductrices peut être analysée lorsqu'on cherche quelles actions elles peuvent accomplir après leur adsorption sur des bactéries sensibles. Comme il n'est pas

possible d'obtenir un stock pur de phages transducteurs, il a été nécessaire de procéder à cette analyse à des multiplicités d'infection très petites pour éviter des infections doubles. Nos expériences montrent qu'une bactérie sensible peut répondre de deux façons à une infection par un phage λ transducteur: 1^o La grande majorité des bactéries est tuée et se lyse. Lors de sa lyse, la bactérie ne libère ni phages ni structures liées à la production de phages et visibles au microscope électronique; 2^o Environ 1% des bactéries infectées par le phage λ transducteur deviennent syngénotes lysogènes défectives. Elles sont alors immunes envers λ et contiennent en plus des caractères Gal de leur propre génome les caractères Gal apportés par le phage transducteur. Ces souches syngénotes lysogènes défectives ont été étudiées dans le chapitre II, où l'on a vu que, après induction, elles ne sont capables de produire ni des phages infectieux ni des structures liées à la production de phages. Les bactéries syngénotes lysogènes défectives induites peuvent donc être comparées aux bactéries infectées par le phage transducteur. Ni dans un cas ni dans l'autre le génome phagique n'est capable de provoquer la production de phages infectieux; il est donc défectif.

La différence entre les phages transducteurs et les phages normaux se manifeste par leur action après adsorption sur des bactéries. Weigle (communication personnelle) a en outre trouvé une différence de densité des deux sortes de phages, de sorte qu'il peut séparer les phages transducteurs des phages normaux par la méthode de centrifugation dans un gradient de densité de CsCl (Meselson, Stahl et Vinograd, 1957).

Lors de l'infection simultanée d'une bactérie sensible par un phage transducteur au moins et un phage normal au moins, un nouveau phénomène apparaît: la coopération entre les deux sortes de phages. 1^o Dans les bactéries qui se lysent, la multiplication et la finition des deux sortes de phages se produit. Il faut admettre que le phage normal apporte une ou des fonctions qui manquent au phage génétiquement défectif et permet ainsi la production de nouvelles particules renfermant le matériel génétique défectif. 2^o Le phage transducteur a une probabilité vingt fois plus grande de lysogéniser la bactérie réceptrice

lorsqu'il est assisté par un phage normal que lorsqu'il est seul. Lors d'une telle lysogénisation, il n'y a que des bactéries syngénotes lysogènes normales qui sont produites. Elles ne perdent jamais leur lysogénie normale, même pas lors de la perte par ségrégation des caractères Gal apportés par λdg , perte qui est liée à la perte de la capacité de donner un lysat HFT, donc à la perte du prophage transducteur. On peut donc penser que les bactéries syngénotes lysogènes normales sont doublement lysogènes une fois pour un prophage λ normal et une seconde fois pour un prophage λ défectif. On ne sait cependant pas si, dans des bactéries dites doublement lysogènes, il y a réellement deux génomes phagiques entiers et s'ils sont indépendants l'un de l'autre.

CHAPITRE IV

LE PHÉNOMÈNE DE COOPÉRATION ET LA LOCALISATION DU DÉFAUT *dg*.

I. COOPÉRATION ENTRE LE PHAGE λ NORMAL ET LE PHAGE λ TRANDUCTEUR.

1. *Localisation du défaut dg par des expériences de recombinaison génétique.*

Toutes les expériences décrites ci-dessous ont été faites avec des bactéries syngénotes lysogènes défectives qui ont été induites, puis surinfectées par le phage normal. On étudie alors l'interaction génétique entre prophage défectif induit et génome du phage surinfectant. La surinfection peut être faite avec une très petite m.i., de sorte que toutes les bactéries surinfectées n'adsorbent qu'un seul phage; les bactéries non surinfectées ne produisent pas de phages, elles n'entrent en effet pas en ligne de compte pour la composition du lysat.

Lorsqu'on surinfecte immédiatement après l'induction, toutes les bactéries surinfectées sont capables de former un centre infectieux. A partir de 30 minutes après la dilution des

bactéries induites dans du milieu nutritif, le nombre des centres diminue, et après 50 minutes il n'est presque plus possible d'obtenir encore la synthèse de phages actifs avant que la bactérie se lyse. Ces résultats ont été obtenus en surinfectant des cultures carencées, mais on obtient les mêmes résultats pour les cultures en croissance exponentielle, surinfectées en milieu nutritif avec des phages mutants λh , qui s'adsorbent relativement bien en tryptone.

Le complexe formé par induction et surinfection de bactéries syngénotes lysogènes défectives donne lieu à la production de phages recombinants. Il est facile de chercher les recombinants actifs: on a en effet pu retrouver dans les phages actifs recombinés les marqueurs p_4^+ , c^+ et m_6^+ provenant du prophage défectif λdg . En admettant que le défaut dg puisse être localisé comme caractère génétique sur la carte des marqueurs de λ , on peut essayer de déterminer son endroit en se servant des fréquences de recombinants. Nous avons fait deux séries d'expériences en surinfectant des souches syngénotes lysogènes défectives induites portant le prophage $\lambda dg m_6^+ c^+ p_4^+$, une fois avec des phages actifs $\lambda m_6 c$ et une fois avec λcp_4 (tableau VI). Dans la première expérience, avec le phage $m_6 c$, il y a trois séquences possibles des caractères: $dg — m_6 — c$; $m_6 — dg — c$; $m_6 — c — dg$. Le dernier cas, où l'on s'attend à trouver plus de recombinants $+++$ (1 croisement) que de m_6++ (2 croisements) et le premier cas, où l'on s'attend à trouver plus de recombinants $+++$ que de $++c$ sont infirmés par les résultats expérimentaux. On trouve 10% de recombinants actifs m_6++ (1 croisement), 3% de $++c$ (1 croisement) et 1% de $+++$ (2 croisements), ce qui confirme l'ordre $m_6 — dg — c$. La région dg doit être située entre le locus m_6 et le locus c et doit être plus près de m_6 que de c .

Les résultats des croisements entre le prophage défectif $dg++$ et le phage $+ c p_4$ confirment la séquence $dg — c — p_4$, ce qui est en accord avec la séquence $m_6 — dg — c$.

Pour localiser d'une façon plus précise la région dg , des croisements ont été faits en utilisant les marqueurs h , g_1 et m_5 qui sont situés entre m_6 et c . Dans le premier cas, des bactéries hétérogénées lysogènes défectives portant un prophage

défectif provenant d'un mutant λh ont été induites et surinfectées avec des phages actifs $h^+ cp_4$. Les fréquences des recombinants $h^+ c^+ p_4$, $h^+ c p_4$ et $h^+ c^+ p_4^+$ ont été les mêmes que celles trouvées dans les croisements entre le prophage défectif $h^+ c^+ p_4^+$ et le phage surinfectant $h^+ c p_4$. Mais il n'y a pas de recombinants actifs h (fréquence inférieure à 10^{-7}). Pour voir s'il y avait des phages phénotypiquement h^+ mais génotypiquement h , le lysat a été adsorbé sur des bactéries C600 qui étaient ensuite étalées sur gélose en présence d'indicateur CR63. Par ce traitement les génotypes h auraient dû s'exprimer, mais l'expérience n'a montré qu'un nombre de phages h correspondant à la fréquence des mutants h spontanés (environ 10^{-7}).

Dans une autre expérience, des bactéries syngénotes lysogènes défectives dont le prophage provenait d'une souche lysogène normale pour λg_1 ont été induites et surinfectées avec des phages actifs du type sauvage g_1^+ . Toute la descendance a été du type parental actif. La fréquence des recombinants entre le prophage défectif $dg g_1$ et le phage surinfectant $dg^+ g_1^+$ est inférieure à $3 \cdot 10^{-4}$.

Finalement une souche syngénote lysogène défective a été préparée à partir d'un lysat LFT provenant d'une souche C600 (λm_5). Induites et surinfectées avec des phages actifs $m_5^+ c$, ces bactéries n'ont pas donné de recombinants actifs m_5 (fréquence inférieure à $5 \cdot 10^{-4}$).

La distance entre h et g_1 sur la carte des caractères génétiques du phage λ est de 1,2, celle entre g_1 et m_5 de 1 en unités de pourcent de recombinants. Comme il n'a pas été possible de trouver de recombinants actifs ni avec h ni avec g_1 ou m_5 lors des croisements entre le prophage défectif et des phages surinfectants, dg ne peut pas être situé à un endroit limité, mais semble couvrir toute une région. On ne sait cependant pas si les caractères m_5 , g_1 et h manquent chez le prophage défectif ou s'ils sont empêchés de s'exprimer.

2. Coopération dans la multiplication du génome défectif.

Des lysats obtenus par induction et surinfection de bactéries syngénotes lysogènes défectives ont été testés quant à leur

capacité de transduire (tableau VII). Le rapport entre le nombre des phages transducteurs et celui des phages actifs dans le lysat des bactéries induites et surinfectées varie approximativement de 0,1 à 1. Il est probable que ces variations sont dues à plusieurs facteurs, tels que l'avantage de certains mutants dans la multiplication, la multiplicité de la surinfection, l'état de la culture bactérienne et la concentration de celle-ci. La valeur de ce rapport correspond à celle qu'on trouve dans les lysats HFT des cultures syngénotes lysogènes normales induites. On voit donc que la multiplication du matériel génétique défectif doit se faire à peu près à la même vitesse que celle du matériel génétique du phage normal.

3. *Défaut de multiplication végétative du génome défectif.*

Dans le chapitre II on a montré que les bactéries syngénotes lysogènes défectives induites par le rayonnement UV ne sont capables de produire ni des phages morphologiquement intacts ni des structures liées à la production de phages (membranes de têtes et queues) pas plus que du matériel neutralisant le sérum anti- λ . La question se pose de savoir si le matériel génétique du phage se multiplie. Cette même question a déjà été étudiée par Jacob et Wollman (1956a) et Jacob, Fuerst et Wollman (1957) pour des phages défectifs des souches du type K12 (λ déf.). Ces auteurs ont surinfecté avec des phages normaux à différents temps après l'induction des souches lysogènes défectives. Ils ont trouvé deux classes de souches: pour la première le rapport de recombinaison «nombre de phages actifs recombinants/nombre de phages du type surinfectant» augmente en fonction du temps de la surinfection après l'induction, indiquant que le génome défectif s'est multiplié végétativement déjà avant la surinfection. Pour la seconde classe, ce rapport reste constant pour tous les temps de surinfection, ce qui fait supposer qu'un pool de génomes végétatifs ne s'est pas formé. Dans le cas de nos souches syngénotes lysogènes défectives, une mesure encore plus directe de ce pool est possible par la détermination du rapport entre le nombre des phages transducteurs

TABLEAU VI.

Recombinaison génétique entre le prophage λdg des bactéries syngénotes lysogènes défectives et un phage actif surinfectant.

| Prophage défectif | Phage surinfectant | Temps de la surinfection | Phages actifs trouvés dans la descendance | | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------------|---|-------------|--------------------|--|----------------------|------------------------|
| | | | Types parentaux | | Types recombinants | | Nom- bre | % |
| | | | | Nom- bre | % | | | |
| + dg + (souche c) | $m_6 + c$ | 0 min | $m_6 + c$ | 1487 | 86 | $m_6 ++$ $++ c$ $+++$ | 172 54 17 | 10 3,1 1,0 |
| + dg + (souche c) | $m_6 + c$ | 35 min | $m_6 + c$ | 1467 | 89 | $m_6 ++$ $++ c$ $+++$ | 138 29 17 | 8,4 1,8 1,0 |
| + dg + (souche d) | $m_6 + c$ | 0 min | $m_6 + c$ | 1246 | 83 | $m_6 ++$ $++ c$ $+++$ | 184 52 25 | 12,2 3,4 1,7 |
| + dg + (souche d) | $m_6 + c$ | 35 min | $m_6 + c$ | 1463 | 86 | $m_6 ++$ $++ c$ $+++$ | 170 46 19 | 10 2,7 1,1 |
| $dg ++$ (souche d) | $+ cp_4$ | 0 min | $+ cp_4$ | 1264 | 87 | $++ p_4$ $+ c +$ $+++$ | 17 34 142 | 1,2 2,3 9,8 |
| $dg ++$ (souche d) | $+ cp_4$ | 35 min | $+ cp_4$ | 2109 | 91 | $++ p_4$ $+ c +$ $+++$ | 25 42 130 | 1,1 1,8 5,7 |
| $h dg ++$ | $++ cp_4$ | 0 min | $++ cp_4$ | 1163 | 88 | $+++ p_4$ $++ c +$ $+++$ $h + ..$ | 23 23 112 0 | 1,7 1,7 8,5 0 |
| $g_1 dg$ | $++$ (sauvage) | 0 min | ++ | 3730 | 100 | $g_1 +$ | 0 | 0 |
| $m_5 dg$ | $++ c$ | 0 min | $++ c$ | 1863 | 93 | $+++$ $m_5 + c$ $m_5 ++$ | 168 0 0 | 7,3 0 0 |

TABLEAU VI *suite.*

Des bactéries syngénètes lysogènes défectives $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/\text{ex Gal}^+ \lambda$ à $3 \cdot 10^8$ bactéries/ml sont centrifugées, resuspendues en milieu d'adsorption et irradiées avec une dose de 100 secondes de rayonnement UV. Selon le temps de la surinfection au cours de la période latente, les traitements suivant sont appliqués: *a*) surinfection à 0 minutes: les bactéries induites sont carencées à l'obscurité pendant une heure à 37° et mises ensuite en contact pendant 20 minutes avec les phages surinfectants (multiplicité d'infection 0,05). Dans ces conditions, l'adsorption est d'au moins 99%. Après une dilution de 50 fois en tryptone, le tube de croissance est aéré à 37° jusqu'à ce que les bactéries se soient lysées ($2\frac{1}{2}$ heures); *b*) surinfection à 35 minutes: les bactéries induites sont diluées 1 : 1 en tryptone deux fois concentré et aérées à 37° pendant 35 minutes. La culture est alors refroide à 0°, centrifugée, lavée une fois en milieu d'adsorption et carencée pendant une heure à 37°. La suite des opérations est semblable à celle décrite sous *a*). Les deux souches *c* et *d* proviennent de transductions par le lysat HFT 78.

et celui des phages actifs dans le lysat. Il augmentera en fonction du temps de surinfection, si une multiplication du génome défectif a lieu entre l'induction et la surinfection.

Nous avons résumé dans les tableaux VI et VII les résultats de nos expériences faites avec des surinfections, soit à 0 minute, soit à 35 minutes après dilution des bactéries induites en tryptone. Ni la proportion des recombinants actifs, ni celle des phages transducteurs n'augmentent entre ces deux temps de surinfection. On note au contraire une baisse insignifiante de ces proportions. Tout se passe donc comme si le génome défectif ne pouvait pas se multiplier avant l'arrivée du phage surinfectant et que seule l'aide de ce dernier lui permettait d'accomplir les premiers pas menant à l'établissement du pool végétatif.

4. *Génotype des phages transducteurs reproduits.*

Dans les lysats obtenus par coopération entre un phage transducteur et un phage normal nous avons trouvé, suivant les caractères génétiques choisis, qu'environ 10% des phages actifs portent certains caractères provenant du génome défectif. Il est probable qu'il y a autant de recombinants parmi les phages défectifs. Pour pouvoir les mesurer il faudrait rendre les bactéries lysogènes, donc transduites, pour ces phages défectifs.

TABLEAU VII.

Production de phages transducteurs par des bactéries syngénotes lysogènes défectives induites et surinfectées avec des phages actifs.

| Prophage défectif | Phage surinfectant | Temps de la surinfection | Centres infectieux/ml | Lysat | | |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--|--|--|--|
| | | | | Phages actifs/ml | Phages transducteurs/ml | Rapport phages transducteurs/phages actifs |
| <i>dg</i> + + (souche <i>c</i>) | +++ | 0 min 35 min | 1 · 10 ⁶ 4 · 10 ⁵ | 1,5 · 10 ⁷ 6,6 · 10 ⁶ | 1,1 · 10 ⁷ 3,5 · 10 ⁶ | 0,73 0,53 |
| <i>dg</i> + + (souche <i>c</i>) | + <i>m</i> ₆ <i>c</i> | 0 min 35 min | 1 · 10 ⁶ 4 · 10 ⁵ | 5 · 10 ⁷ 1,4 · 10 ⁷ | 1,0 · 10 ⁷ 2,5 · 10 ⁶ | 0,20 0,18 |
| <i>dg</i> + + (souche <i>d</i>) | + <i>m</i> ₆ <i>c</i> | 0 min 35 min | 2,2 · 10 ⁵ 9 · 10 ⁴ | 1,1 · 10 ⁷ 4,2 · 10 ⁶ | 6 · 10 ⁶ 2,0 · 10 ⁶ | 0,55 0,47 |
| <i>dg</i> + + (souche <i>d</i>) | + <i>c p</i> ₄ | 0 min 35 min | 2,3 · 10 ⁵ 7 · 10 ⁴ | 1,8 · 10 ⁷ 5,8 · 10 ⁶ | 4,5 · 10 ⁶ 1,0 · 10 ⁶ | 0,25 0,17 |

Des bactéries syngénotes lysogènes défectives Gal₁⁻ Gal₂⁻/ex Gal⁺-λ sont induites au rayonnement UV et surinfectées avec une m.i. de 0,05 phages actifs, soit au temps 0, soit 35 minutes après induction et remises en culture (comme décrit dans le texte du tableau VI). Les centres infectieux et le titre en phages actifs dans le lysat sont déterminés par également avec C600 et les titres en phages transducteurs par la méthode de transduction avec surinfection, en tenant compte de l'efficacité de lysogénisation de λ dg (20%), qui a été déterminée pour les conditions choisies par un contrôle fait avec le lysat HFT 78.

Cela exclut qu'on puisse reconnaître des caractères empêchant une bonne lysogénisation comme par exemple les caractères *c*, *p*₄ ou *m*₆ et qui seraient liés au génome défectif. Il a cependant été possible de trouver des phages génétiquement défectifs recombinants pour les caractères déterminant l'immunité. Ces expériences seront exposées dans le § III de ce chapitre.

Parmi les caractères qui n'empêchent pas une bonne lysogénisation, les marqueurs *m*₅, *g*₁ et *h* coïncident avec la région du défaut *dg*. L'apparition d'un phage recombinant qui à la

fois porterait un de ces caractères et serait encore défectif, indiquerait que la recombinaison génétique entre le génome purement phagique et la région Gal, de provenance bactérienne, serait possible. Une telle recombinaison pourrait être accompagnée, d'une part, d'une diminution du défaut et, d'autre part, d'une disparition de certains caractères Gal. Dans l'expérience suivante nous avons cherché de tels recombinants génétiquement défectifs et portant le caractère *h*.

Le lysat HFT 78 (irradié à une survie de 5% pour augmenter la fréquence de recombinaison que nous désirons étudier) a été adsorbé sur des bactéries 3110 (λh) induites et le lysat ainsi obtenu utilisé pour transduire différentes souches réceptrices (Gal_1^- , Gal_2^- , Gal_4^- , Gal_b^-). Après sélection pour des prophages ayant transduit la bactérie réceptrice, nous avons recherché si le caractère *h* était présent dans le génome du prophage. Nous n'en avons cependant pas trouvé parmi 180 phages transducteurs ainsi testés.

5. *Phénotype des phages transducteurs reproduits.*

Nous n'avons pas pu récupérer le caractère *h* par recombinaison entre un phage transducteur et un phage *h*⁺ actif. A l'aide de ce résultat nous avons localisé le défaut *dg* comme couvrant l'endroit *h*. On peut cependant se demander si, quoique non retrouvable par recombinaison génétique, ce caractère subsiste sur le génome du phage défectif et peut diriger des synthèses lors de la multiplication du phage défectif par coopération. Pour répondre à cette question, l'expérience suivante a été faite :

Des bactéries syngénotes lysogènes défectives dont le prophage provient d'un phage λh^+ ont été induites et surinfectées par des phages actifs λh . On trouve que toute la progéniture, soit en phages actifs, soit en phages défectifs, peut être adsorbée par l'indicateur CR63. Tous les phages sont donc phénotypiquement *h*. Des résultats analogues ont été obtenus avec un prophage défectif provenant d'un lysat LFT *h*. Dans ce cas on obtient, après surinfection d'une souche K12/ex $Gal^+ \cdot \lambda h$ induite avec des phages λh^+ , une progéniture purement *h*⁺.

Ces résultats indiquent que le génome de λdg , même lorsqu'il se multiplie par coopération d'un phage normal, n'est pas capable de produire sa « propre » substance h déterminant l'adsorption.

6. Coopération entre le phage λdg et un phage surinfectant lors de la lysogénisation.

Dans le chapitre III nous avons montré que l'efficacité de lysogénisation du phage défectif λdg est environ vingt fois plus petite que celle du phage normal, mais qu'avec l'aide d'un phage normal le phage λdg arrive à s'établir comme prophage avec la même probabilité que le phage normal. Ceci indique que le phage défectif et le phage surinfectant coopèrent pour la lysogénisation. D'une telle coopération résultent toujours des bactéries syngénètes lysogènes normales. Le phage actif doit donc s'établir comme prophage normal, pour rendre plus efficace la transduction. Il ne suffit pas qu'il soit présent dans la bactérie.

Nous appellerons f ce facteur par lequel l'efficacité de la lysogénisation est multipliée par la coopération entre le phage défectif et le phage surinfectant. Plusieurs expériences de transduction de bactéries sensibles carencées infectées à basse m.i. (10^{-3}) avec un lysat HFT avec et sans surinfection simultanée ont donné des valeurs de f entre 15 et 30.

On peut se demander pendant combien de temps un phage défectif infectant une bactérie peut encore être aidé par un phage actif alors que la bactérie métabolise. Pour cela nous avons infecté des bactéries sensibles $Gal_1^- Gal_2^-$ carencées à $5 \cdot 10^8/ml$ avec le lysat HFT 78 (m.i. = $2 \cdot 10^{-3}$ phages défectifs par bactérie). Après 30 minutes d'adsorption à 37° , au temps $t = 0$, la suspension a été diluée en tryptone concentré deux fois et aérée à 37° . À différents temps t , des échantillons ont été prélevés et surinfectés avec une m.i. de 5 phages λh actifs par bactérie. Après 10 minutes à 37° , 98% des phages surinfectants étaient adsorbés et les bactéries ont alors été diluées dix fois en tryptone contenant du sérum anti- λ ($k = 5$). À $t = 90$ minutes, différentes dilutions ont été étalées sur boîtes TTC-

galactose. Des contrôles sans surinfection ont été soumis au même traitement. Tandis que le facteur f était de 28 pour l'échantillon surinfecté avant la dilution en milieu nutritif, f tombait à 13 si la surinfection était effectuée au moment de la dilution en tryptone ($t = 0$). A $t = 10$ minutes, la valeur de f était encore de 4 et elle variait entre 1 et 2 pour les temps à partir de la vingtième minute. On voit que l'aide que le phage surinfectant apporte au phage défectif pour la lysogénisation a encore une certaine efficacité pendant le début de la période latente, mais devient très vite inefficace.

II. COOPÉRATION ENTRE DEUX PHAGES DÉFECTIFS PORTANT LEUR DÉFAUT A DIFFÉRENTS ENDROITS.

On sait que le défaut des phages défectifs du type non transducteur — provenant de K12 (λ déf.) non syngénote — peut être localisé en un point de la carte des caractères génétiques (Jacob, Fuerst et Wollman, 1957) contrairement à dg qui couvre environ un quart de la longueur totale. On peut se demander, si dans une bactérie doublement lysogène pour un phage défectif du premier type et un phage défectif du type transducteur, la synthèse de phages complets peut avoir lieu. Pour cela des expériences ont été faites avec les souches C60 ($\lambda i1$), C33 ($\lambda i2$), P14 (λd_1) et G2 (la localisation des défauts de $\lambda i1$, $\lambda i2$ et λd_1 est indiquée sur la figure 10, le défaut du prophage de G2 n'a pas été localisé). Pour obtenir des souches Gal^- lysogènes défectives portant les prophages défectifs en question, nous avons fait des lysats des souches mentionnées en induisant et surinfectant les quatre souches avec des phages actifs, car ces phages λ déf. ne sont également reproductibles que par coopération avec un autre phage (Arber et Kellenberger, 1958). Avec ces lysats nous avons lysogénisé des bactéries $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ (m.i. = 0,3). Ce procédé a permis d'isoler des souches lysogènes défectives que nous avons transduites ensuite à une m.i. de 10^{-3} en phages actifs d'un lysat HFT. Les colonies transduites ont été isolées et nettoyées, puis testées pour leur capacité de ségrégner des Gal^- , pour leur immunité envers λ et pour la production de phages actifs ou défectifs après induction.

La plupart des souches isolées ainsi étaient doublement lysogènes pour le prophage défectif non transducteur qu'elles contenaient déjà avant la transduction et pour le phage transducteur. Elles ont alors les propriétés suivantes: ces souches ségrègent des bactéries Gal^- . Les ségrégeantes Gal^- , tout comme les colonies Gal^+ , sont immunes envers λc . La production de phages actifs dépend du prophage défectif non transducteur. Quand celui-ci est seul dans la bactérie induite, il a une certaine probabilité de muter vers la forme active. Pour les trois prophages défectifs des souches P14, C33 ($\lambda i2$) et G2, cette fréquence n'est pas ou que très peu changée par la présence du phage défectif transducteur et elle est encore la même pour les ségrégeantes Gal^- . Les titres des phages transducteurs dans les lysats de ces trois souches doublement lysogènes défectives induites restent de l'ordre de grandeur des titres en phages actifs, soit $3 \cdot 10^{-7}$ phages par bactérie induite pour P14, 10^{-4} pour C33 ($\lambda i2$) et 10^{-3} pour G2. Pour ces trois défauts la maturation de phages défectifs ne semble donc être possible que dans les bactéries dans lesquelles se trouve un phage ayant muté vers la forme active.

Par contre, les souches $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (\lambda i1)/\text{ex Gal}^+ - \lambda$ se comportent différemment. Les résultats de l'analyse d'une de ces souches sont résumés dans les tableaux VIII et IX. Tandis que la probabilité pour une cellule induite de produire des phages actifs est de 10^{-6} , aussi bien pour la souche mère $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (\lambda i1)$ que pour une souche ségrégeante Gal^- de la souche syngénote, cette fréquence passe à 10^{-1} pour la souche doublement lysogène défective. Le titre en phages morphologiquement intacts d'un lysat de cette souche induite, déterminé par comptage au microscope électronique, est de $6,1 \cdot 10^9$. Il se compose de phages défectifs parents λdg et $\lambda i1$, de recombinants actifs $\lambda dg^+ i1^+$ ($5,3 \cdot 10^7$) et probablement de recombinants défectifs $\lambda dg i1$. Négligeant les recombinants qui sont de l'ordre de 1%, on peut calculer la limite supérieure du titre des phages $\lambda i1$ comme différence entre le titre morphologique et celui de λdg qui peut être déterminé par transduction. Dans le lysat analysé, un tiers des phages sont λdg ($2 \cdot 10^9$), de sorte que la limite supérieure du titre de $\lambda i1$ est de $4 \cdot 10^9$. Une vérification de ce titre est

possible par la lysogénisation de bactéries sensibles (tableau IX). Environ 5% des bactéries infectées avec un phage morphologiquement intact sont lysogénisées et portent $\lambda i1$.

TABLEAU VIII.
Coopération entre $\lambda i1$ et λdg .

| | Souches | | | |
|---|--|--|-----------------------|---|
| | Gal ₁ ⁻ Gal ₂ ⁻ ($\lambda i1$) avant la trans- duction | Gal ₁ ⁻ Gal ₂ ⁻ ($\lambda i1$)/ ex Gal ⁺ - λ transduite | | Gal ₁ ⁻ Gal ₂ ⁻ ($\lambda i1$) ségré- geante |
| | | Exp. 1 | Exp. 2 | |
| Nombre de bactéries induites | 2,2 · 10 ⁸ | 3 · 10 ⁷ | 3,8 · 10 ⁸ | 3,7 · 10 ⁷ |
| Survie à l'induction | — *) | — *) | 0,8% | — *) |
| Centres infectieux | 2 · 10 ² | 2,4 · 10 ⁶ | 4 · 10 ⁷ | 5 · 10 ¹ |
| Centres infectieux/bact. induite | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻⁶ |
| Phages actifs dans le lysat | 2,8 · 10 ³ | 5,8 · 10 ⁶ | 5,3 · 10 ⁷ | 3 · 10 ² |
| Rendement en phages actifs par centre infectieux | 14 | 2,4 | 1,3 | 6 |
| Phages morphologiquement intacts dans le lysat | — * | — * | 6,1 · 10 ⁹ | — * |
| Rendement en phages morphologiquement intacts/bact. induite | — * | — * | 16 | — * |
| Phages défectifs transducteurs dans le lysat | 0 | 1,5 · 10 ⁸ | 2 · 10 ⁹ | 0 |

* — = pas observé.

La souche lysogène défective Gal₁⁻Gal₂⁻ ($\lambda i1$) est transduite à basse m.i. par un lysat HFT contenant des phages défectifs λdg . La souche Gal₁⁻Gal₂⁻ ($\lambda i1$)/ex Gal⁺- λ ainsi obtenue, une souche ségrégeante Gal₁⁻Gal₂⁻ ($\lambda i1$) de celle-ci et la souche mère sont induites par une dose de 60 secondes d'UV. Le nombre des centres infectieux est déterminé 40 minutes après l'induction. Après la lyse des cultures, les titres en phages actifs et en phages défectifs transducteurs sont déterminés, ces derniers par la méthode de transduction avec surinfection. En outre, le titre des phages morphologiquement intacts du lysat de Gal₁⁻Gal₂⁻ ($\lambda i1$)/ex Gal⁺- λ est déterminé par comptage au microscope électronique.

En admettant que deux tiers des phages sont $\lambda i1$, on trouve que la probabilité de lysogénisation pour $\lambda i1$ est d'environ 8%. Lors d'un contrôle, dans les mêmes conditions, les phages mutants actifs de $\lambda i1$ ont lysogénisé avec une probabilité de 25%. En admettant que les phages défectifs $\lambda i1$ ont la même efficacité de lysogénisation que les phages actifs, on obtient un titre pour les phages $\lambda i1$ défectifs trois fois plus petit ($1,3 \cdot 10^9$) que celui qu'on a calculé précédemment, ce qui représente la limite inférieure possible du titre. Il est probable cependant — et ceci sera discuté plus loin — que l'efficacité de lysogénisation du phage défectif $\lambda i1$ n'est pas aussi grande que celle de son mutant actif, de sorte que le titre réel en $\lambda i1$ serait voisin de celui de λdg ou même supérieur.

TABLEAU IX.

Lysogénisation de la souche sensible $Gal_1^- Gal_2^-$ par le lysat de la souche $Gal_1^- Gal_2^- (\lambda i1)/ex Gal^+ - \lambda$.

| Multiplicité d'infection en phages morphologiquement intacts | 4 | 1 | 0,2 |
|--|-------|-------|--------|
| Multiplicité d'infection en phages actifs | 0,045 | 0,011 | 0,0022 |
| Bactéries survivantes après infection (sensibles et lysogénisées) | 35% | 60% | 100% |
| Nombre de colonies testées: | | | |
| sensibles | 740 | 2500 | 5200 |
| lysogènes déf. pour $\lambda i1$ et λdg (Gal^+) | 35 | 20 | 1 |
| lysogènes déf. pour λdg (Gal^+) | 0 | 1 | 4 |
| lysogènes déf. pour $\lambda i1$ (Gal^-) | 110 | 74 | 49 |
| lysogènes normales (Gal^-) | 8 | 4 | 2 |
| Pourcentage des bactéries infectées qui sont lysogénisées par $\lambda i1$ | 5,8 | 3,5 | 5,4 |

Le lysat de la souche $Gal_1^- Gal_2^- (\lambda i1)/ex Gal^+ - \lambda$ analysé dans le tableau VIII est adsorbé pendant 20 minutes à 37° sur des bactéries sensibles $Gal_1^- Gal_2^-$ carencées en milieu d'adsorption. Des dilutions adéquates sont étalées à la surface de boîtes TTC-galactose contenant du sérum anti- λ . Après 16 heures d'incubation, les colonies sont testées par la méthode des répliques sur C600 et λc .

Si l'on considère le rapport entre les titres de λdg et $\lambda i1$ qui se situe entre 0,5 et 1, on constate qu'il correspond au rapport entre phages défectifs λdg et phages actifs trouvés dans le lysat HFT ordinaire.

Le titre des bactéries survivantes dans une culture infectée avec le lysat contenant $\lambda i1$ et λdg correspond à ce qu'on s'attend à trouver pour la m.i. calculée à partir des phages morphologi-

quement intacts du lysat. Ceci prouve que les phages λdg et $\lambda i1$, quand ils ne lysogénisent pas la bactérie infectée, sont capables de la tuer.

Des observations au microscope électronique de lyses individuelles ont montré que toutes les bactéries induites d'une souche doublement lysogène défective pour $\lambda i1$ et λdg libèrent des phages morphologiquement complets. Les deux phages défectifs coopèrent donc pour la synthèse et la maturation de la progéniture, qui contient en proportions égales le matériel génétique de chacun des parents. La fréquence des recombinants actifs est légèrement inférieure à 1% et ce n'est que dans une sur dix bactéries lysées que se trouvent de ces recombinants actifs, ce qui se révèle lors de la mesure des centres infectieux. Le rendement moyen en phages actifs par centre infectieux est de deux, ce qui montre bien qu'il s'agit de recombinants produits au cours de la multiplication végétative.

III. COOPÉRATION ENTRE LE PHAGE DÉFECTIF λdg ET UN PHAGE APPARENTÉ À λ .

Des phages apparentés à λ ont été décrits par Jacob et Wollman (1956b). Les phages 82 et 434 sont sensibles à un sérum anti- λ , mais ils s'adsorbent sur des bactéries résistantes par adsorption à λ . Ils se multiplient sur des bactéries K12 (λ), immunes envers λ . Lors de la lysogénérisation, leur prophage se place à un endroit différent mais voisin de l'endroit du prophage λ sur le génome bactérien. 82 et 434 produisent des recombinants avec le phage λ . Nous nous sommes demandés si ces phages sont capables de transduire des caractères Gal, s'ils peuvent coopérer dans la multiplication et la lysogénérisation du phage λdg et s'ils peuvent produire des recombinants avec ce dernier.

Il ne nous a pas été possible de trouver des phages transducteurs pour les caractères Gal_1^+ Gal_2^+ dans des lysats obtenus par induction de C600 (82) et C600 (434). La fréquence de la formation éventuelle de phages transducteurs pour les caractères Gal_1^+ Gal_2^+ ne peut donc pas être supérieure à 10^{-7} par phage du lysat.

Des bactéries syngénotes lysogènes défectives $\text{Gal}^-/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$ ont été induites, puis surinfectées avec les phages 82 ou 434. Dans les deux cas il y a eu production de phages transducteurs en quantités comparables à celle des phages surinfectants reproduits. Les phages 82 et 434 ont donc la possibilité d'apporter les fonctions qui manquent à λdg pour se multiplier.

Des bactéries sensibles $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ ont été infectées à une m.i. de 10^{-3} phages transducteurs du lysat HFT 78 et surinfectées simultanément avec une m.i. de 4 phages normaux 82. Après également sur des boîtes TTC-galactose et incubation pendant 24 heures à 37° , on a trouvé une probabilité de transduction par phage λdg de 15%. Le phage 82 coopère donc également pour la lysogénisation de λdg . Les bactéries transduites sont immunes envers 82 et λ ; elles ségrègent des colonies Gal^- immunes envers 82, mais sensibles à λ . Elles sont donc $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (82)/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$.

Une souche $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (82)/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$ obtenue par lysogénisation de $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/\text{ex Gal}^+ \cdot \lambda$ avec le phage 82 a été induite et le lysat soumis aux contrôles suivants: sur un indicateur résistant par adsorption à λ ($\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/\lambda$) on a la même efficacité d'également que sur l'indicateur C600. Par contre, sur la souche $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/82$, résistante par adsorption à 82, il ne se forme pas de plages (moins de 10^{-4}). Les phages actifs du lysat sont donc phénotypiquement 82. Après un cycle de multiplication, soit sur la souche C600, soit sur $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/\lambda$, ce qui permet aux génotypes de s'exprimer, on ne trouve pas non plus de phages actifs s'adsorbant sur $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-/82$ (moins de 10^{-4}). Les phages actifs produits ont donc tous la spécificité d'adsorption du phage 82 et ceci aussi bien génotypiquement que phénotypiquement.

Le lysat est HFT et les phages transducteurs ne s'adsorbent pas plus que les phages actifs sur les souches /82, comme le prouve l'expérience suivante: le lysat est mélangé avec: a) des bactéries /82 et b) des bactéries / λ . Après 30 minutes d'adsorption à 37° on centrifuge les bactéries et on mesure ensuite le pouvoir transducteur des surnageants. Le lysat, après contact avec /82 avait gardé tout son pouvoir transducteur, tandis que,

après contact avec λ , le pouvoir transducteur avait été réduit d'un facteur de plus de 100.

Sur les boîtes de titrage du lysat de $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ (82)/ex $\text{Gal}^+ \cdot \lambda$ induite, on trouve des plages de différentes tailles, tandis que les plages de 82 utilisé pour la lysogénisation sont toutes d'une taille uniforme. Il se produit donc des recombinants entre le phage 82 et le phage défectif λdg , en dehors de dg . Il est intéressant de chercher s'il est possible de croiser l'immunité entre λdg et 82, c'est-à-dire de retrouver des phages actifs conférant l'immunité envers λ et donc capables de se multiplier dans une bactérie immune envers 82. Des gouttes du lysat de $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ (82)/ex $\text{Gal}^+ \cdot \lambda$ sont déposées sur des boîtes ensemencées par $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ (82) ou par $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (\lambda)$. Après incubation à 37° des zones de lyse se forment sur les deux souches à l'endroit du dépôt de la goutte. Le lysat contenait donc, à part les phages 82 reproduits, des phages actifs recombinants par rapport à l'immunité λ . Ces phages sont λ quant à leur caractère génétique déterminant l'immunité et 82 quant à leur caractère d'adsorption. Le phage recombinant complémentaire serait un phage défectif qui, lors de la transduction de Gal, procure à la bactérie réceptrice l'immunité envers 82.

La souche sensible $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ a été transduite par le lysat HFT de la souche $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ (82)/ex $\text{Gal}^+ \cdot \lambda$ (m.i. = 0,1 phages actifs). Parmi les bactéries transduites, dont les caractères d'immunité ont été testés d'après le schéma représenté dans le tableau X, nous avons trouvé les souches suivantes: $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ (82)/ex $\text{Gal}^+ \cdot \lambda$; $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (\lambda)$ /ex $\text{Gal}^+ \cdot \lambda$; $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ (82)/ex $\text{Gal}^+ \cdot 82$; $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (\lambda)$ /ex $\text{Gal}^+ \cdot 82$ et $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ /ex $\text{Gal}^+ \cdot \lambda$. L'existence d'un prophage transducteur capable de ségrégier, qui a les caractères d'immunité de 82 est donc confirmée. Ce génome provient très probablement d'une recombinaison lors de la multiplication de λdg et de 82 actif.

DISCUSSION.

1. *Le défaut dg.*

Nous avons déjà vu que le génome transducteur n'est pas capable de synthétiser des structures liées à la production de

TABLEAU X.

Schéma pour le test des caractères d'immunité de souches transduites par un lysat HFT provenant d'une souche $Gal_1^- Gal_2^- (82)/ex Gal^+ \lambda$ induite.

| Souche | (λ) /ex λ | (λ) /ex 82 | (82) /ex λ | (82) /ex 82 | /ex λ | /ex 82 |
|---|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>Souche syngénote Gal^+:</i> | | | | | | |
| Ségrégation des Gal^- . . . | + | + | + | + | + | + |
| Test par stries | | | | | | |
| immune à λ . . . | + | + | + | — | + | — |
| immune à 82 . . . | — | + | + | + | — | + |
| Goutte de la culture irradiée aux UV forme zone de lyse sur | | | | | | |
| W3110 sensible . . . | + | + | + | + | — | — |
| W3110 (λ) | — | + | + | + | — | + ² |
| W3110 (82) | + | + | + | — | + ¹ | — |
| <i>Souche ségrégeante Gal^-:</i> | | | | | | |
| Test par stries | | | | | | |
| immune à λ . . . | + | + | — | — | — | — |
| immune à 82 . . . | — | — | + | + | — | — |
| Goutte de la culture irradiée aux UV forme zone de lyse sur | | | | | | |
| W3110 sensible . . . | + | + | + | + | — | — |
| W3110 (λ) | — | — | + | + | — | — |
| W3110 (82) | + | + | — | — | — | — |

¹ La bactérie $Gal_1^- Gal_2^- /ex Gal^+ \lambda$ induite adsorbe des phages 82 libérés spontanément de W3110 (82). De la recombinaison résultent des phages actifs conférant l'immunité envers λ se multipliant sur W3110 (82). Lorsqu'on fait le même test avec le lysat au lieu de la culture induite, on n'obtient pas de zone de lyse.

² Constatation analogue à 1.

phages et visibles au microscope électronique, pas plus que du matériel bloquant le sérum anti- λ . Les proportions constantes, soit de phages recombinants actifs, soit de phages transducteurs par rapport aux phages actifs, dans les lysats après des surinfections à des temps différents au cours de la période latente, indiquent que le génome défectif seul ne se multiplie pas végé-

tativement. On peut se demander si le défaut dg intéresse un seul locus qui commande une étape très précoce du développement du phage, bloquant ainsi toutes les réactions ultérieures, ou si dg couvre une région étendue des caractères de λ . L'impossibilité de former des recombinants actifs entre le génome défectif et des phages actifs pour les caractères h , g_1 et m_5 semble prouver que dg est relativement étendu et que cette région dg se situe sur la carte des caractères génétiques de λ (figure 10) entre m_6 et c . Le même résultat est obtenu par

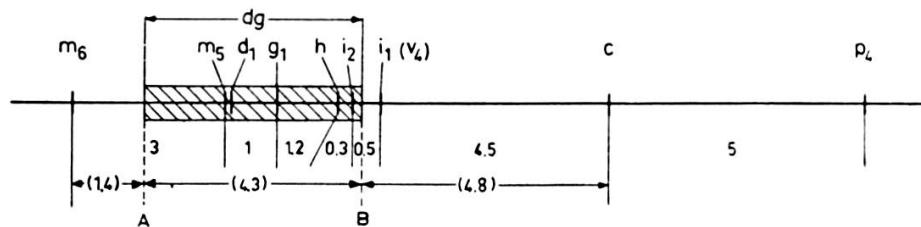


Fig. 10.

Position de la région dg dans le groupe de liaison des caractères génétiques de λ .

Distances en pour-cent de recombinants dans des croisements entre deux phages non irradiés. Pour la localisation des caractères m_6 , m_5 , g_1 , h , v_4 , c et p_4 , voir figure 1. L'endroit de d_1 , responsable du défaut du prophage de la souche P14, a été déterminé par Jacob et Wollman (1956a), tandis que nous avons calculé les positions de i_1 et i_2 , responsables des défauts des phages défectifs λi_1 et λi_2 , à partir des résultats de croisements faits par Whitfield et Appleyard (1958).

l'analyse des fréquences de recombinaison après un croisement entre le génome défectif λdg et des phages actifs $\lambda m_6 c$ ou $\lambda c p_4$. Enfin, l'impossibilité de former des recombinants actifs entre le génome défectif λdg et un des génomes défectifs λd_1 et λi_2 , dont les mutations peuvent être situées en des endroits restreints, confirme notre localisation de la région dg .

Nos expériences ne permettent pas de connaître la nature de ce défaut. On peut s'imaginer qu'il s'agit d'une délétion et que tous les caractères situés normalement sur ce segment manquent. Ils ne peuvent, en effet, jamais être récupérés par recombinaison; il est donc peu probable qu'ils soient rendus inefficaces par l'effet d'un suppresseur. Quant aux caractères Gal, portés par le phage transducteur, ils pourraient être liés ou non au génome phagique. Selon la première possibilité, ils pourraient être substitués ou branchés à l'endroit des caractères

phagiques manquant. Cela n'impliquerait nullement que la longueur de la région des caractères Gal corresponde à la longueur de la région *dg*, qui est par définition celle des caractères absents du génome phagique. La seconde possibilité que les caractères Gal ne soient pas liés du tout au génome phagique est moins probable, car 1^o le génome d'un phage transducteur est toujours défectif, la capacité de transférer des caractères Gal et la défectuosité sont donc liées, 2^o lors de la ségrégation du prophage défectif les bactéries syngénètes lysogènes défективes perdent toujours à la fois l'immunité envers λ et la diploïdie des caractères Gal.

Nos données expérimentales permettent de déterminer approximativement les limites de la région *dg*. Appelons A la limite gauche du côté m_6 et B la limite droite du côté *c* (fig. 10). Nous avons déjà vu qu'on obtient des recombinants actifs entre λdg et le mutant virulent $\lambda 2$. Un (v_4) des quatre caractères déterminant ensemble la virulence se situe entre *c* et *h*, plus près de ce dernier. B doit donc se trouver entre *h* et v_4 . Une localisation plus précise est possible par le fait que λdg n'est pas capable de coopérer et de former des recombinants actifs avec le phage défectif $\lambda i2$, ce qu'il est à même de faire avec le phage défectif $\lambda i1$. Il est donc très probable que B se situe entre *i1* et *i2*. La fréquence d'environ 1% de recombinants entre *i1* et *dg* après irradiation de la bactérie doublement lysogène défective correspond à une fréquence de recombinaison entre deux phages non irradiés (Jacob et Wollman, 1955) qui est en tout cas plus petite que 0,5.

Admettons donc que B se situe à 4,8 unités à gauche de *c*. Pour placer B plus précisément, il faudrait comparer les fréquences de recombinaison entre $\lambda i1$ et λdg avec celle de $\lambda i1$ et $\lambda i2$ en les mesurant dans les deux cas pour des bactéries doublement lysogènes induites. Connaissant la distance B — A, on peut calculer approximativement la distance m_6 — A en se basant sur les fréquences des recombinants actifs trouvés dans le croisement $m_6^+ dg c^+ \times m_6 dg^+ c$. Ne considérons que $m_6^+ dg^+ c$ et $m_6 dg^+ c^+$ résultant d'un seul crossing-over et admettons que ces recombinants se multiplient à la même vitesse, comme c'est le cas pour ces mêmes recombinants

$m_6^+ c$ et $m_6 c^+$ dans un croisement entre les deux phages actifs $\lambda m_6 c$ et $\lambda m_6^+ c^+$ (Kaiser, 1955). Si l'on suppose qu'il n'y a pas de crossing-over sur la distance AB ou alors qu'il en résulte des phages défectifs, les recombinants $m_6 dg^+ c^+$ peuvent être attribués à un crossing-over dans la région B — c et les recombinants $m_6^+ dg^+ c^+$ à un crossing-over dans la région m_6 — A. La proportion entre les deux fréquences de recombinants correspond donc à la proportion formée par les deux distances :

$$\frac{\text{fréquence } m_6 dg^+ c^+}{\text{fréquence } m_6^+ dg^+ c} = \frac{\text{distance B} — c}{\text{distance } m_6 — A}.$$

Elle est en moyenne de 3,4 lorsque la surinfection est effectuée à 0 minute (tableau VI). La distance B — c étant de 4,8 unités on trouve pour la distance m_6 — A 1,4 unités. La distance A — B, donc la longueur de la région dg est alors de 4,3 unités.

La précision de cette estimation est limitée par les faits suivants: a) on ne peut pas mesurer les recombinants complémentaires du fait qu'ils ne sont pas actifs; b) on a négligé une influence éventuelle de la dose d'induction UV sur la vitesse de multiplication des recombinants; c) on a négligé les recombinants ayant fait deux croisements.

La distance totale entre les deux caractères extrêmes connus jusqu'à présent (m_6 et p_4) sur la carte des caractères génétiques de λ est de 15,5 unités. D'après notre estimation, le défaut dg couvre plus d'un quart de cette longueur totale.

La question se pose de savoir si tous les phages transducteurs d'origine indépendante (lysats LFT de souches K12 (λ) indépendantes) portent la région défective au même endroit sur la carte génétique et si elle a toujours la même extension. Des expériences cherchant à fixer la limite B à l'aide de l'effet de coopération entre λdg et $\lambda i1$ et de non-coopération entre λdg et $\lambda i2$ indiquent que B est toujours à l'endroit indiqué (observations non publiées), car dix souches doublement lysogènes défectives (contenant $\lambda i1$ et λdg provenant de lysats LFT indépendants), coopérant dans la multiplication des phages λdg et $\lambda i1$, donnent toujours les mêmes fréquences de recombinants actifs. Cette recherche s'est révélée difficile parce que, pour tester s'il y a coopération, on est obligé d'utiliser des

bactéries doublement lysogènes défectives pour les deux sortes de prophages défectifs en question. Il faut donc, par exemple, transduire des bactéries déjà lysogènes pour $\lambda i1$. Mais on ne sait pas quel est le mécanisme de fixation d'un second prophage dans une bactérie déjà lysogène et il est possible qu'il y ait interaction entre le prophage et le phage infectant avant ou lors de l'établissement de la double lysogénie. Dans les expériences citées, nous avons également trouvé un certain nombre de souches doublement lysogènes défectives pour λdg et $\lambda i1$ qui n'étaient pas capables de coopérer; on pourrait penser que la limite B de dg est dans ces cas entre $i1$ et c . Mais il nous semble plus probable que le phage λdg ait fait une recombinaison avec le prophage $\lambda i1$ lors de la fixation comme second prophage et qu'il soit ainsi devenu doublement défectif dg et $i1$. Il serait alors évidemment incapable de coopérer avec $i1$. Cette hypothèse est appuyée par le fait que des souches capables et incapables de coopérer ont été obtenues à partir de phages transducteurs provenant du même génome défectif.

2. *Le phénomène de coopération.*

Le phage défectif est incapable de se reproduire seul, mais dès qu'un phage surinfectant apporte les fonctions qui lui manquent, il peut se multiplier. Il n'est pas nécessaire de surinfecter par un phage λ actif, comme le prouve l'effet de coopération entre λdg et le phage défectif $\lambda i1$, ou même que le phage surinfectant soit un phage λ , car les phages 82 et 434 apparentés à λ peuvent apporter cette fonction. Le fait qu'il y a coopération entre λdg et $\lambda i1$ montre d'une part que le phage λdg peut procurer à $\lambda i1$ les fonctions qui lui manquent pour produire des phages infectieux, d'autre part que $\lambda i1$ accomplit les fonctions qui manquent à λdg et qui sont nécessaires pour la multiplication du génome λdg . On peut en conclure que la synthèse de phages infectieux est assurée par un jeu complet de gènes phagiques mais que ceux-ci ne doivent pas nécessairement être apportés par le même phage ni par un recombinant génétique.

La plupart des phages défectifs résultant de la multiplication par coopération ne se distinguent pas génotypiquement de leur parent défectif. L'existence de recombinants défectifs ayant

croisé avec le phage surinfectant peut être démontré en surinfectant avec le phage 82. Dans ce cas, on trouve des phages défectifs conférant à la bactérie réceptrice l'immunité envers 82 lors de la lysogénisation.

Nous n'avons pas trouvé dans les lysats obtenus par coopération entre λ normal et λdg des phages ayant recombiné à l'intérieur de la région *dg*. Par contre le phage défectif peut, lors de sa multiplication, échanger des caractères Gal avec la bactérie (Arber, Kellenberger et Weigle, 1957).

Les propriétés d'adsorption du phage défectif transducteur sont toujours celles du phage coopérant: de la coopération entre λdg et λh actif ne résultent que des phages phénotypiquement *h*, de la coopération entre λdg et λh^+ actif uniquement des phénotypes *h⁺*. Les phages d'un lysat obtenu par coopération entre λdg et le phage 82 actif ont tous les propriétés d'adsorption du 82. Le caractère *h* et les caractères de λdg déterminant la non-adsorption sur des bactéries résistantes ne peuvent donc pas fonctionner, même en présence d'un phage coopérant, et il est très probable que ces caractères manquent sur le génome λdg . C'est alors uniquement le phage assistant qui dirige la synthèse des protéines responsables de l'adsorption.

Le phage défectif λdg lysogénise vingt à trente fois moins bien que le phage actif dont il provient, différence qui disparaît lorsqu'on surinfecte simultanément la culture réceptrice avec des phages normaux. Pour expliquer cette différence on pourrait supposer que la faible probabilité de lysogéniser du phage λdg , quand il infecte seul une bactérie, est en relation avec l'incapacité de λdg de se multiplier végétativement. Admettons qu'un génome phagique ait une certaine probabilité par unité de temps d'établir la lysogénie. Si le matériel génétique du phage ne se multiplie pas, il n'y a que peu de bactéries qui établissent la lysogénie. Si, par contre, on a une multiplication du génome phagique, la chance de lysogéniser augmente avec le nombre de copies. λ normal, s'il surinfecte après le premier tiers de la période latente une bactérie ayant adsorbé un phage λdg , n'aide que peu à la lysogénisation par λdg . Ce fait permet de penser que la probabilité de lysogéniser est la plus grande immédiatement après l'infection et qu'elle diminue plus tard.

Elle serait donc une fonction du temps au cours de la période latente. Dans une bactérie surinfectée simultanément avec λ normal, λdg se multiplie par coopération aussi bien que λ normal. Notre hypothèse pourrait donc expliquer pourquoi λdg assisté par λ normal lysogénise aussi fréquemment que λ normal. Une autre possibilité serait que λdg s'associe au phage normal coopérant avant ou lors de la fixation de ce dernier comme prophage. Jacob, Fuerst et Wollman (1957) trouvent parmi leurs phages génétiquement défectifs des phages lysogénisant bien et d'autres qui lysogénisent mal. Ces résultats semblent confirmer notre hypothèse. En effet, ceux qui lysogénisent bien sont ceux qui multiplient végétativement leur génome, tandis que ceux qui n'effectuent pas de multiplication n'établissent que rarement la lysogénie. Nous avons vu nous-mêmes que le phage $\lambda i1$, dont la multiplication végétative a lieu mais à un rythme ralenti (Whitfield et Appleyard, 1957) a une probabilité de lysogéniser inférieure de peu seulement à celle du phage homologue actif.

Les bactéries lysogénisées par λdg seul sont toutes syngénotes lysogènes défectives. Les bactéries lysogénisées par λdg assisté par un phage actif sont toutes syngénotes lysogènes normales. Il semble très probable qu'il s'agit alors de bactéries doublement lysogènes, une fois pour le prophage actif et l'autre fois pour le prophage défectif transducteur: *a)* ces souches donnent après induction des lysats HFT exactement semblables aux lysats des bactéries infectées simultanément par des phages défectifs et des phages actifs; *b)* la ségrégation en Gal^- est accompagnée dans la plupart des cas par la perte du prophage défectif, mais la bactérie reste lysogène normale pour le prophage actif; son lysat après induction n'est alors plus HFT; *c)* de la transduction par λdg avec surinfection par le phage 82 résultent des bactéries immunes envers 82 et envers λ . Elles sont lysogènes normales pour le prophage 82 et syngénotes lysogènes défectives pour le prophage λdg .

La fréquence élevée de bactéries doublement lysogènes après infection mixte avec des phages transducteurs et des phages normaux ne permet pas de conclure quant au mécanisme spécial éventuel de fixation du prophage défectif. En effet, on

obtient également une grande proportion ($\frac{1}{3}$) de bactéries doublement lysogènes K12 (λh , λh^+) lors d'une infection mixte de bactéries sensibles avec λh et λh^+ . Il semble donc assez normal de trouver plus d'un prophage fixé lors d'une infection simultanée.

L'effet de coopération dans la lysogénisation permet une titration des phages transducteurs relativement précise et assez simple: par infection à basse m.i. (10^{-3}) avec des phages transducteurs et surinfection (m.i. = 5) de toutes les bactéries avec des phages normaux, on obtient des conditions de lysogénisation relativement constantes. Tenant compte de la probabilité de lysogénisation, on peut alors déterminer les titres par comptage des colonies transduites. D'autres méthodes de titration ont été discutées dans le chapitre premier.

CHAPITRE V

TRANSDUCTION PAR LE PHAGE λdg IRRADIÉ AU RAYONNEMENT UV

Garen et Zinder (1955) ont trouvé qu'un lysat du phage P22 de *Salmonella typhimurium* ne perd pas sa capacité de transduire après irradiation aux UV, bien qu'une grande proportion des phages soient inactivés. Morse (communication personnelle) a fait la même constatation pour λdg . Dans certaines conditions ces auteurs obtiennent même une augmentation de la transduction, après une faible dose d'UV. Comme le phage λ inactivé aux UV ne lysogénise pas (G. Kellenberger, communication personnelle), on peut se demander par quel mécanisme la transduction par un lysat HFT irradié se produit. Nous avons essayé de répondre à cette question par les expériences suivantes:

Le pouvoir transducteur de notre lysat HFT 78 Gal⁺ irradié par des doses variables d'UV a été déterminé et les résultats sont représentés sur la figure 11. On a utilisé les

souches réceptrices suivantes: 1^o Gal₁⁻Gal₂⁻ sensible, 2^o Gal₁⁻Gal₂⁻/ex Gal₁⁻Gal₂⁻-λ homogénote lysogène défective et 3^o Gal₁⁻Gal₂⁻(λ) lysogène normale.

Après une faible irradiation le pouvoir transducteur du lysat HFT augmente fortement pour atteindre un maximum

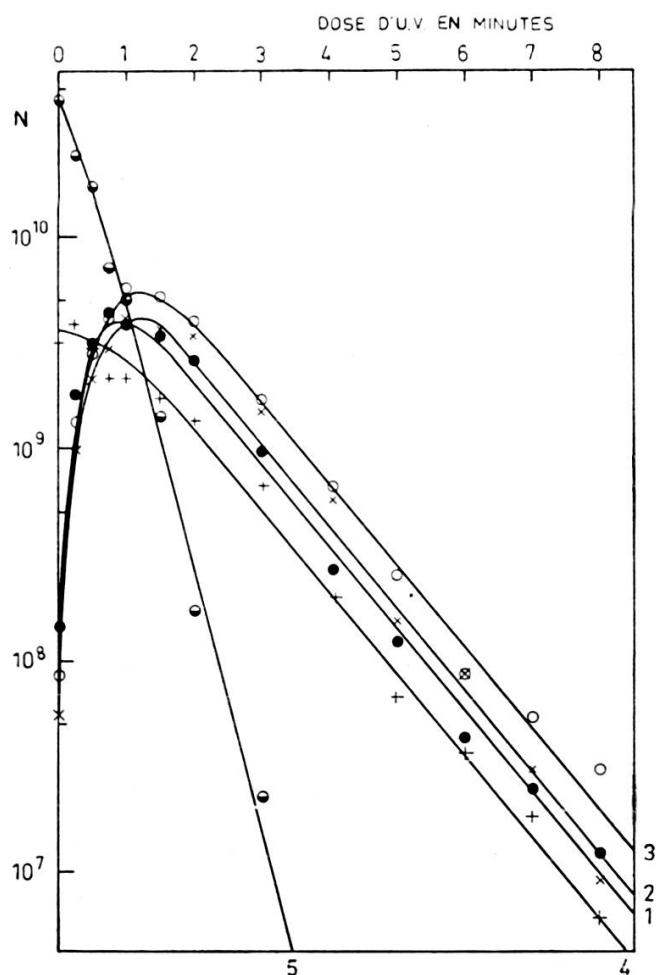


Fig. 11.

Transduction par le lysat HFT 78 irradié aux UV.

Le lysat HFT contenant $4,4 \cdot 10^{10}$ phages actifs et $2,3 \cdot 10^{10}$ phages transducteurs par ml est irradié avec des doses variables de rayonnement UV à une distance de 55 cm de la lampe. La survie des phages actifs est mesurée pour chaque dose (courbe 5; ○). Le lysat irradié est adsorbé pendant 30 minutes à 37° sur des bactéries (1; ●) sensibles Gal₁⁻Gal₂⁻, (2; ✕) homogénotes lysogènes défectives Gal₁⁻Gal₂⁻/ex Gal₁⁻Gal₂⁻-λ et (3; ○) lysogènes normales Gal₁⁻Gal₂⁻(λ). Les multiplicités d'infection sont (1) $3 \cdot 10^{-3}$, (2) $4,1 \cdot 10^{-3}$ et (3) $4,4 \cdot 10^{-3}$ phages morphologiquement intacts par bactérie. Après adsorption, des dilutions adéquates sont étalées sur des boîtes TTC-galactose. Après 20 heures d'incubation, les colonies transduites en Gal⁺ sont comptées. La courbe 4 (+) représente la proportion des bactéries transduites après le même traitement, mais avec surinfection simultanée par 10 phages actifs par bactérie réceptrice sensible. En abscisse: dose UV en minutes. En ordonnée: N = nombre de bactéries transduites par ml du lysat HFT 78 (courbes 1 à 4) ou nombre de phages actifs survivants par ml du lysat HFT (courbe 5).

à une dose de 60 secondes environ (survie de λ actif = 10^{-1}). Après une irradiation plus forte le pouvoir de transduction diminue exponentiellement en fonction de la dose. La sensibilité apparente des caractères $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ serait d'environ trois fois moindre que celle du phage λ actif.

La transduction par le lysat HFT irradié aux UV est un peu meilleure sur des récepteurs lysogènes que sur les sensibles. L'analyse des colonies transduites aidera à comprendre ces différences.

1. Souche réceptrice sensible.

Infectées à une m.i. de $3 \cdot 10^{-3}$ phages morphologiquement intacts, les bactéries transduites par le lysat HFT non irradié sont la plupart hétérogénètes lysogènes défectives (tableau XI).

TABLEAU XI.

Analyse des colonies transduites en Gal^+ après adsorption du lysat HFT 78 irradié au rayonnement UV sur des bactéries réceptrices $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ sensibles.

| Dose UV secondes | Colonies transduites testées | | | |
|---------------------|------------------------------|--|--|-----------|
| | Total | Hétérogénètes lysogènes normales | Hétérogénètes lysogènes défectives | Sensibles |
| 0 | 20 | 2 | 17 | 1 |
| 15 | 12 | 1 | 6 | 5 |
| 30 | 12 | 0 | 1 | 11 |
| 60 | 12 | 0 | 0 | 12 |

Des colonies transduites en Gal^+ sont isolées des boîtes d'étalement TTC-galactose de l'expérience décrite dans le texte de la figure 11. Elles sont nettoyées deux fois et testées ensuite quant à leur ségrégation, à leur production de phages actifs et à leur immunité envers λc .

Après une dose de 15 secondes d'irradiation déjà, la moitié des bactéries transduites sont sensibles et après des doses plus fortes on ne retrouve plus que des sensibles Gal^+ . Celles-ci sont stables et ne ségrègent jamais de Gal^- . En multipliant lytique-

ment des phages λ dans une telle souche, on n'obtient jamais de phages transducteurs, même si l'on irradie les bactéries avant l'infection avec une dose d'induction de rayonnement UV. De même, après lysogénisation par λ , ces souches sont toujours lysogènes normales non syngénotes et ne donnent pas de lysat HFT.

Il doit probablement se produire une incorporation stable des caractères Gal du phage transducteur dans le génome de la bactérie; ce que l'expérience suivante semble confirmer: un lysat HFT $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- \lambda$ provenant d'une souche $\text{Gal}^+ (\lambda) / \text{ex } \text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- \lambda$ a été irradié aux UV à une survie de 1% des phages actifs. Ensuite, les phages irradiés ont été adsorbés sur des bactéries W3110 Gal^+ carencées et celles-ci étalées sur des boîtes TTC-galactose. Après 16 heures d'incubation à 37° on a trouvé des colonies transduites en Gal^- . Parmi 20 colonies Gal^- testées, 8 étaient $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$ sensibles, 8 $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^+$ sensibles, 3 $\text{Gal}_1^+ \text{Gal}_2^-$ sensibles et une était Gal^- pour un autre caractère. Cette dernière pourrait être due à une mutation spontanée.

2. Souche réceptrice homogénote lysogène défective.

La transduction du lysat HFT non irradié sur la souche réceptrice homogénote lysogène défective $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- / \text{ex } \text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- \lambda$ est environ trois fois moins efficace que sur la souche sensible $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^-$. Parmi douze colonies transduites examinées, toutes étaient restées syngénotes lysogènes défectives.

Par de faibles doses d'UV l'efficacité de transduction est fortement augmentée, dans les mêmes proportions que chez les récepteurs sensibles. Pour les fortes doses, elle diminue parallèlement à la survie des caractères Gal constatée sur les récepteurs sensibles.

Parmi 12 colonies transduites avec le lysat HFT irradié pendant 7 minutes (survie des phages actifs = $2 \cdot 10^{-7}$) on a trouvé 10 syngénotes lysogènes défectives, ségrégant toutes des Gal^- , et 2 sensibles Gal^+ stables. Ces dernières peuvent être produites par transduction de bactéries ségrégeantes sensibles Gal^- se trouvant dans la culture réceptrice, et il est probable que les bactéries syngénotes lysogènes défectives restent

toujours syngénotes lysogènes défectives lors de la transduction par le lysat HFT irradié.

3. Souche réceptrice lysogène normale.

L'efficacité de transduction du lysat HFT non irradié sur la souche lysogène normale $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (\lambda)$ est un peu plus petite que celle de la souche sensible. Les colonies transduites sont hétérogènes du type $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (\lambda)/\text{ex } \text{Gal}_1^+ \text{Gal}_2^+ - \lambda$. Le phage défectif se fixe donc en établissant une double lysogénie.

Si l'on irradie des phages défectifs, ils transduisent les bactéries réceptrices lysogènes normales avec plus d'efficacité qu'ils ne transduisent les bactéries sensibles. La majorité (10 sur 12) des colonies transduites par le lysat HFT irradié avec la dose de 7 minutes d'UV (survie des phages actifs = $2 \cdot 10^{-7}$) sont syngénotes lysogènes normales et donnent après induction un lysat HFT. Ces souches sont donc devenues doublement lysogènes $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (\lambda)/\text{ex } \text{Gal}_1^+ \text{Gal}_2^+ - \lambda$. Les deux autres sont des souches stables Gal^+ non syngénotes $\text{Gal}^+ (\lambda)$.

Le phage λdg ayant été fortement irradié, il est difficile de comprendre pourquoi les caractères Gal apportés par ce phage se trouvent dans la bactérie transduite en position exogénote et liés à un prophage λdg apparemment non lésé par les UV. Il faut s'imaginer que le phage λdg irradié a une grande affinité pour le prophage λ de la bactérie réceptrice lysogène normale et qu'il est capable de se rétablir avec l'aide du bon prophage tout en laissant ce dernier intact. On devrait donc trouver sur le prophage λdg de la bactérie transduite les caractères génétiques du prophage de la bactérie réceptrice ou une partie au moins de ceux-ci. Ne connaissant pas de marqueurs génétiques de λ qui à la fois lysogénisent bien et ne sont pas inclus dans la région dg , nous avons cherché si, après transduction par le phage λdg irradié d'une souche lysogène normale portant le prophage 82, on trouve l'immunité envers 82 ou envers λ associée au prophage défectif.

Une culture $\text{Gal}_1^- \text{Gal}_2^- (82)$ a été transduite par le lysat HFT 78 irradié aux UV pendant 7 minutes. Parmi vingt-quatre colonies transduites testées nous avons trouvé deux hétéro-

génotes lysogènes normales donnant un lysat HFT après induction. Les autres souches étaient Gal⁺ (82) stables. La proportion des bactéries dans lesquelles les caractères Gal ont été incorporés d'une façon stable dans le génome bactérien est donc plus grande chez la souche lysogène pour 82 que chez celle qui est lysogène pour λ . Les deux souches syngénotes lysogènes normales étaient du type Gal⁻(82)/ex Gal⁺-82. L'immunité du prophage défectif provenait donc dans les deux cas du prophage actif 82 tandis que l'immunité envers λ n'a dans aucun cas pu être retrouvée. On peut donc penser que le phage défectif λdg irradié peut se compléter avec les caractères du « bon » prophage pour devenir un prophage défectif transducteur.

4. Souche réceptrice sensible surinfectée avec λ actif.

La courbe 4 de la figure 11 est plus basse que la courbe obtenue sans surinfection parce qu'il y a une proportion constante de bactéries qui sont lysées par le phage surinfectant, alors que les phages inactivés par irradiation ne tuent pas les bactéries à eux seuls.

Les colonies transduites par le lysat HFT non irradié avec surinfection simultanée sont toutes hétérogénées lysogènes normales. Parmi les colonies transduites par des phages défectifs fortement irradiés, la moitié environ est hétérogénote lysogène normale tandis que l'autre moitié est lysogène normale Gal⁺ stable ne donnant pas de lysat HFT. On trouve donc, comme pour les souches réceptrices lysogènes normales, que le phage défectif λdg irradié a la possibilité de se rétablir avec l'aide du phage surinfectant actif tout en permettant l'établissement de la lysogénie normale. Dans le cas de la surinfection avec plusieurs phages, comme ici, on pourrait penser que ce n'est pas le même phage actif qui lysogénise et qui rétablit λdg .

DISCUSSION.

La transduction par le phage λdg semble toujours être liée à l'établissement de la lysogénie pour λdg et de l'état syngénote

pour les caractères Gal. On trouve des bactéries transduites sensibles stables seulement après ségrégation, c'est-à-dire après perte du prophage λdg et de la polyploïdie du Gal, perte qui est souvent accompagnée par une recombinaison entre caractères Gal endo- et exogénotes.

Par contre les bactéries transduites par des phages λdg irradiés aux UV sont toujours sensibles et stables pour les caractères Gal, lorsqu'il s'agit d'une souche réceptrice sensible. Cette stabilité des souches transduites et le fait qu'on peut même transduire des bactéries Gal⁺ en Gal⁻ par un lysat HFT Gal⁻ irradié font penser qu'il s'agit d'une incorporation dans le génome bactérien des caractères Gal apportés par le phage. Une recombinaison aurait donc lieu entre les caractères endo- et exogénotes. On a déjà trouvé une situation analogue lors de la ségrégation de bactéries sensibles à partir de syngénotes lysogènes défectives. Morse, Lederberg et Lederberg (1956b) ont montré par des croisements entre bactéries que les différents caractères de la région Gal sont étroitement liés. Pour expliquer la fréquence élevée des recombinaisons entre la région Gal du phage λdg irradié et la partie homologue du chromosome bactérien, il faut admettre une forte interférence négative, c'est-à-dire que les échanges sont localement nombreux dès qu'il y a une recombinaison. Cet effet pourrait être dû au rayonnement UV.

Quand on infecte des bactéries lysogènes normales ou défectives avec λdg irradié, le phage lésé peut être restauré par le prophage et on trouvera dans la bactérie transduite un prophage défectif transducteur pour les caractères Gal apportés par λdg irradié; en conséquence, la bactérie est syngénote. Si ces bactéries étaient lysogènes normales, elles le restent après la transduction; le prophage actif ayant effectué la restauration du phage lésé est donc resté actif. Une partie cependant des bactéries infectées peuvent devenir stables pour la région Gal et non syngénotes. Il doit s'agir alors d'une recombinaison entre endo- et exogénote Gal comme chez les récepteurs sensibles, donc sans restauration de la partie phagique du génome. La proportion des bactéries réagissant de cette façon à l'infection est plus grande chez les lysogènes normales pour 82 que pour λ .

Dans le cas de la bactérie homogénote Gal^- défective, la transduction pourrait s'expliquer de différentes manières: on peut s'imaginer qu'il s'agit d'une recombinaison de la région Gal du phage irradié soit avec la région Gal du génome bactérien, soit avec celle du prophage défectif, ou encore qu'il s'agit d'une restauration du phage irradié par le prophage défectif et qu'il en résulte une bactérie doublement lysogène défective.

Tandis que λdg non irradié a une probabilité de transduire de 1% environ, la probabilité d'incorporation d'un morceau du phage λdg irradié et dont les caractères Gal sont « survivants » est très grande. Par extrapolation de la courbe de transduction en fonction de la dose UV à la dose 0 minute, on peut déterminer le titre des phages défectifs effectuant une telle transduction. Par extrapolation linéaire dans l'échelle exponentielle (fig. 11), on obtient ainsi pour le lysat HFT 78 le titre de $1,2 \cdot 10^{10}$ phages transducteurs pour la souche réceptrice sensible, $1,6 \cdot 10^{10}$ pour la souche réceptrice syngénote lysogène défective et $2,5 \cdot 10^{10}$ pour la souche lysogène normale. Le titre trouvé pour ce même lysat 78 par d'autres méthodes est de $2,3 \cdot 10^{10}$ phages transducteurs par *ml*. Le titre obtenu confirme les résultats des autres méthodes de titration; l'efficacité de transduction d'un phage λdg irradié, dont les caractères Gal survivent, serait alors de 100% sur la souche lysogène normale. Dans le cas des récepteurs sensibles, où l'incorporation stable des caractères Gal dans le génome bactérien est responsable de la transduction, on ne s'attend pas à trouver une efficacité de 100% vu que l'on ne compte que les bactéries transduites en Gal^+ pour les deux caractères Gal_1 et Gal_2 .

Nos expériences montrent que le même phage transducteur λdg peut transduire: *a)* par lysogénération de la bactérie réceptrice ou *b)*, dans son état « inactivé » par le rayonnement UV, par recombinaison entre endo- et exogénote. On ne sait pas si d'autres moyens d'inactivation que le rayonnement UV peuvent avoir un effet analogue sur λdg . Le cas *a)* produit des bactéries syngénotes lysogènes défectives, le cas *b)* des bactéries sensibles, stables pour la région Gal. Ce dernier mécanisme de transduction est comparable au type de transduction générale-

ment trouvé, découvert par Zinder et Lederberg (1952) chez *Salmonella typhimurium*. Demerec et Demerec (1956) décrivent cette transduction comme incorporation par recombinaison des caractères apportés par le phage PLT22 dans le génome de la bactérie réceptrice. Il semble donc que le phage défectif λdg pourrait servir de modèle non seulement pour les transductions du type dit λdg , donnant des bactéries syngénètes lysogènes défectives, mais aussi pour les transductions qui donnent des bactéries sensibles. Ces dernières n'étant pas syngénètes, il ne sera pas possible d'obtenir des lysats HFT à partir de ces bactéries transduites. Le phage défectif pourrait transduire selon l'un ou l'autre des mécanismes décrits, suivant l'état de son génome, son mode de liaison au morceau du génome bactérien porté et l'extension de son défaut.

RÉSUMÉ

Les lysats obtenus par induction de souches lysogènes normales *Escherichia coli* K12 (λ) contiennent environ un phage sur 10^4 capable de donner à des bactéries réceptrices des caractères Gal de la bactérie productrice (donatrice). Les bactéries isolées après transduction par un tel lysat LFT sont toujours syngénètes (diploïdes pour certains caractères Gal) et immunes envers le phage λ . Après induction, les souches syngénètes lysogènes normales donnent des lysats HFT contenant à peu près autant de phages transducteurs que de phages normaux. Les phages λ transducteurs se sont révélés être génétiquement défectifs (λdg). Le défaut provient de la présence des caractères Gal bactériens liés au génome phagique. Lorsque les phages λdg infectent des bactéries sensibles, environ 1% de ces phages rendent les bactéries syngénètes lysogènes défectives, tandis que les autres lysent les bactéries sans que des phages ni même des structures liées à la production de phages puissent être formés.

Les souches syngénètes lysogènes défectives contiennent un prophage défectif λdg qui les rend immunes envers les phages

homologues et qui peut contribuer à la restauration partielle de phages virulents $\lambda 2$ inactivés par le rayonnement UV.

Le prophage λdg se propage avec le génome bactérien lors de la division de la bactérie. Cependant il se perd une fois sur 200 divisions environ, de sorte que la bactérie hôte devient sensible. Cette disparition du prophage est toujours accompagnée de la perte de la diploïdie pour Gal. Les caractères Gal de la bactérie ségrégeante sont stables et sont souvent de provenance exogénote: une recombinaison génétique entre endo- et exogénote doit donc avoir eu lieu. Parmi les ségrégeantes sensibles il n'a pas été possible de mettre en évidence des marqueurs génétiques phagiques du prophage λdg .

Des ségrégeantes Gal⁻ qui sont restées lysogènes défectives apparaissent environ une fois par 10^4 divisions bactériennes; ces souches sont des homogénotes Gal⁻/ex Gal⁻- λ .

Les bactéries syngénotes lysogènes défectives sont inducibles à la lyse. La courbe d'induction par les UV correspond à la courbe d'induction trouvée pour les bactéries K12 (λ). Comme ces dernières, les bactéries syngénotes lysogènes défectives induites sont photorestaurables. Dans les lysats obtenus par induction on ne trouve ni phages actifs, ni phages défectifs. L'analyse au microscope électronique montre qu'il n'y a pas de phages morphologiquement intacts, ni même de structures liées à la production de phages (membranes de têtes vides ou queues). Les lysats ne contiennent pas non plus de matériel neutralisant le sérum anti- λ . Une multiplication végétative du matériel génétique de λdg ne semble pas avoir lieu.

La bactérie syngénote lysogène défective induite correspond au complexe obtenu par infection d'une bactérie sensible par un phage λdg , ce dernier n'étant pas capable de diriger les synthèses nécessaires à sa reproduction. Cependant, si l'on surinfecte avec des phages actifs soit la bactérie syngénote lysogène défective induite soit la bactérie sensible, infectée par λdg , la production aussi bien des phages génétiquement défectifs λdg que des phages actifs du type des surinfectants a lieu. Le phage surinfectant coopère avec λdg pour la multiplication de ce dernier. Les phages 82 et 434, apparentés à λ , sont également capables de coopérer avec λdg .

Si l'on effectue la surinfection avec des phages actifs génétiquement marqués, on obtient des phages recombinants actifs pour les caractères p_4 , c et m_6 , tandis que les caractères h , g_1 et m_5 n'ont jamais pu être récupérés par recombinaison entre λdg et λ normal surinfectant. Le défaut dg peut donc être localisé dans la région de ces caractères manquants; il doit couvrir toute une région de la carte des caractères génétiques et son étendue peut être calculée approximativement. Elle correspond à un quart de la longueur totale connue. On ne sait pas s'il s'agit d'une délétion et si les caractères Gal bactériens sont substitués ou branchés à l'endroit dg .

Les lysats obtenus par coopération entre λdg et λ actif après surinfection sont toujours HFT et correspondent aux lysats HFT produits par les souches syngénotes lysogènes normales $Gal^+(\lambda)/ex Gal^-\lambda$, qui elles semblent être doublement lysogènes pour un prophage normal et un prophage défectif transducteur.

Les phages génétiquement défectifs produits par coopération sont phénotypiquement du type du phage actif coopérant quant à leurs propriétés d'adsorption; seul ce dernier est donc capable de diriger la production des substances déterminant l'adsorption.

Parmi les phages transducteurs on en trouve qui sont des recombinants génétiques entre le parent défectif et le phage coopérant. Surinfectant avec des phages 82 une souche $Gal^-/ex Gal^+\lambda$ induite, on trouve dans le lysat des phages défectifs transducteurs procurant à la bactérie transduite l'immunité envers 82. Il n'a, par contre, pas été possible de trouver des phages ayant recombiné pour des caractères situés dans la région dg .

La probabilité de transduction par le phage λdg est augmentée d'un facteur de 20 à 30 dans les bactéries qui sont infectées également par un phage actif. Ce dernier peut donc coopérer aussi pour la lysogénisation par λdg et il en résulte dans ce cas des bactéries syngénotes lysogènes normales $Gal^-(\lambda)/ex Gal^+\lambda$. Ce phénomène est utilisé pour la titration des phages transducteurs.

Des phages λ génétiquement défectifs, pour lesquels le caractère responsable du défaut se localise dans une région autre que dg , sont également capables de coopérer avec λdg . Le

lysat se compose alors essentiellement de phages génétiquement défectifs des deux génotypes parentaux et de quelques recombinants actifs. La présence de recombinants actifs dans la bactéries productrice n'est pas nécessaire pour qu'elle puisse reproduire les deux parents défectifs.

Le phage λdg irradié au rayonnement UV est encore capable de transduire. Tandis que le phage λdg non irradié a une probabilité de 1% seulement de transduire en établissant la lysogénie défective, pratiquement tous les phages λdg irradiés aux UV transduisent, pourvu que les caractères Gal survivent à l'irradiation. Il s'agit cependant d'un mécanisme de transduction autre que par la lysogénisation : sur les bactéries sensibles, la transduction par λdg irradié consiste en l'incorporation d'une partie des caractères Gal de λdg dans l'endogénote du récepteur. Après cette recombinaison la bactérie reste sensible et stable pour les caractères Gal acquis. Sur les bactéries réceptrices lysogènes normales ce même mode de recombinaison est possible, mais on trouve plus fréquemment des bactéries syn-génotes lysogènes normales portant donc en plus du prophage normal un prophage défectif.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à M. le professeur J. Weigle et à M. le Dr E. Kellenberger qui m'ont proposé ce sujet et qui n'ont pas cessé de m'aider, de me conseiller et de m'encourager tout au long de l'exécution de ce travail. Je remercie tout particulièrement M^{me} G. Kellenberger pour ses précieuses suggestions lors de nombreuses discussions et pour sa collaboration active dans certaines expériences. Je désire remercier également M. le Dr M. L. Morse et M. le Dr A. Campbell d'avoir bien voulu me communiquer leurs résultats non publiés, M. le professeur J. Lederberg, M. le professeur J. Weigle et M. le Dr A. D. Kaiser pour les souches de bactéries et de phages qu'ils ont mises à ma disposition.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, M. H., Methods of study of bacterial viruses; in *Methods in medical research*, Vol. II, pp. 1-73 (The Year Book Publ., Chicago, 1950).
- APPLEYARD, R. K., Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics*, 39, 440-452 (1954). — The transfer of defective lambda lysogeny between strains of *Escherichia coli*. *J. gen. Microbiol.*, 14, 573-582 (1956).
- APPLEYARD, R. K., J. F. McGREGOR and K. M. BAIRD, Mutation to extended host range and the occurrence of phenotypic mixing in the temperate coliphage lambda. *Virology*, 2, 565-574 (1956).
- ARBER, W., G. KELLENBERGER et J. WEIGLE, La défectuosité du phage lambda transducteur. *Schweiz. Z. allgem. Pathol. u. Bakteriol.*, 20, 659-665 (1957).
- ARBER, W. and G. KELLENBERGER, Study of the properties of seven defective-lysogenic strains derived from *Escherichia coli* K12 (λ). *Virology*, 5, 458-475 (1958).
- CAMPBELL, A., Transduction and segregation in *Escherichia coli* K12. *Virology*, 4, 366-384 (1957).
- DEMERECK, M. and Z. E. DEMERECK, Analysis of linkage relationships in *Salmonella* by transduction techniques. *Mutation, Brookhaven Symposia in Biology*, 8, 75-87 (1956).
- GAREN, A. and N. D. ZINDER, Radiological evidence for partial genetic homology between bacteriophage and host bacteria. *Virology*, 1, 347-376 (1955).
- HARTMAN, P. E., Transduction: a comparative review; in *The chemical basis of heredity*, pp. 408-462 (Baltimore, The Johns Hopkins Press, 1957).
- JACOB, F., Les bactéries lysogènes et la notion de provirus. *Monographies de l'Institut Pasteur* (Masson & Cie, Paris, 1954). — Transduction of lysogeny in *Escherichia coli*. *Virology*, 1, 207-220 (1955).
- JACOB, F., C. R. FUERST et E. L. WOLLMAN, Recherches sur les bactéries lysogènes défectives. II: Les types physiologiques liés aux mutations du prophage. *Ann. Inst. Pasteur*, 93, 724-753 (1957).
- JACOB, F. et E. L. WOLLMAN, Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*Escherichia coli*. I: Le système génétique du bactériophage λ . *Ann. Inst. Pasteur*, 87, 653-673 (1954). — III: Effet du rayonnement ultraviolet sur la recombinaison génétique. *Ann. Inst. Pasteur*, 88, 724-749 (1955). — Recherches sur les bactéries lysogènes défectives. I: Déterminisme génétique de la morphogénèse chez un bactériophage tempéré. *Ann. Inst. Pasteur*, 90, 282-302 (1956a). — Sur le processus de conjugaison et de recombinaison chez *Escherichia coli*. I: L'induction par conjugaison ou induction zygotique. *Ann. Inst. Pasteur*, 91, 486-510 (1956b).

- KAISSER, A. D., A genetic study of the temperate coliphage λ . *Virology*, 1, 424-443 (1955). — Mutations in a temperate bacteriophage affecting its ability to lysogenize *Escherichia coli*. *Virology*, 3, 42-61 (1957).
- KELLENBERGER, E. and W. ARBER, Electron microscopical studies of phage multiplication. I: A method of quantitative analysis of particle suspensions. *Virology*, 3, 245-255 (1957).
- KELLENBERGER, G. and E. KELLENBERGER, Electron microscopical studies of phage multiplication. III: Observation of single cell bursts. *Virology*, 3, 275-285 (1957).
- LEDERBERG, J. and E. M. LEDERBERG, Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63, 399-406 (1952).
- LEDERBERG, E. M. and J. LEDERBERG, Genetic studies of lysogenicity in *Escherichia coli*. *Genetics*, 38, 51-64 (1953).
- MESELSON, M., F. W. STAHL and J. VINOGRAD, Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 43, 581-588 (1957).
- MORSE, M. L., E. M. LEDERBERG and J. LEDERBERG, Transduction in *Escherichia coli* K12. *Genetics*, 41, 142-156 (1956a). — Transductional heterogenotes in *Escherichia coli*. *Genetics*, 41, 758-779 (1956b).
- WEIGLE, J., Transduction by coliphage λ of the galactose marker. *Virology*, 4, 14-25 (1957).
- WHITFIELD, J. F. and R. K. APPLEYARD, Formation of the vegetative pool by induced defective and healthy lysogenic strains of *Escherichia coli*. *J. gen. Microbiol.*, 17, 453-466 (1957). — Recombination and phenotypic mixing during phage growth in strains of *Escherichia coli* doubly lysogenic for coliphage lambda. *Virology*, 5, 275-290 (1958).
- WOLLMAN, E. L., Sur le déterminisme génétique de la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*, 84, 281-293 (1953).
- ZINDER, N. and J. LEDERBERG, Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, 64, 679-699 (1952).