

**Zeitschrift:** Archives des sciences [1948-1980]  
**Herausgeber:** Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève  
**Band:** 13 (1960)  
**Heft:** 4

**Artikel:** Développement intracellulaire du Cliphage lambda  
**Autor:** Séchaud, Janine  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-738514>

### **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:** 05.04.2026

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

# DÉVELOPPEMENT INTRACELLULAIRE DU COLIPHAGE LAMBDA

PAR

**Janine SÉCHAUD**

---

## SOMMAIRE

	Pages
Résumé . . . . .	428
Summary . . . . .	428
I. Introduction . . . . .	430
II. Matériel et méthodes . . . . .	433
III. Le système bactérie-phage . . . . .	439
IV. Etude morphologique de bactéries multipliant $\lambda$ . . . . .	441
V. Multiplication des phages végétatifs . . . . .	442
a) Quantité d'ADN par particule phagique . . . . .	442
b) Synthèse d'ADN dans les bactéries infectées . . . . .	444
c) Multiplication des génomes phagiques . . . . .	447
d) Délai dans la variation de la fréquence de recombinaison . . . . .	453
e) Comparaison des augmentations de l'ADN et des génomes phagiques . . . . .	455
f) Effet du chloramphénicol . . . . .	456
g) Action de T2 sur des bactéries infectées par $\lambda$ . . . . .	459
VI. Lysogénisation et réponse lytique . . . . .	461
VII. Discussion . . . . .	465
Bibliographie . . . . .	471

---

## RÉSUMÉ

Le développement intracellulaire du coliphage  $\lambda$  a été étudié par des méthodes morphologiques, chimiques et génétiques. Il présente les caractéristiques suivantes:

- a) Le nucléoïde bactérien persiste malgré l'infection. L'ADN phagique semble se localiser dans la région nucléaire.
- b) Dans des conditions telles que la synthèse d'ADN bactérien est arrêtée passagèrement, les bactéries infectées avec  $\lambda c$  commencent à synthétiser de l'ADN à un taux élevé une dizaine de minutes après l'infection. Plusieurs évidences indiquent que la reprise de la synthèse d'ADN bactérien est inhibée et que l'ADN produit est uniquement phagique.
- c) Dans les conditions d'adsorption utilisées, les premières 8 minutes environ après l'infection sont une période où les génomes infectants ne se multiplient pas encore; on met en évidence cette période d'établissement en mesurant la sensibilité de la recombinaison génétique à une irradiation UV.
- d) Lorsqu'on tient compte de la période d'établissement du phage, on constate que l'augmentation des génomes phagiques est identique à l'augmentation d'ADN. Il y a là une évidence expérimentale en faveur d'une identité entre les unités génétiques en multiplication et l'ADN produit.
- e) Les bactéries infectées par  $\lambda$  dans lesquelles il y a établissement de la lysogénie présentent une synthèse d'ADN plus tardive que les bactéries non infectées; leurs synthèses se différencient donc très tôt de celles des bactéries où il y a multiplication végétative du phage. Ce résultat est discuté en même temps que les distinctions possibles entre les caractères génétiques  $c$  et  $b_2$  du phage  $\lambda$ .

## SUMMARY

The intracellular development of coliphage  $\lambda$  has been studied using morphological, chemical and genetic methods. The following characteristics were found:

- a) The bacterial nucleus persists during  $\lambda$  development. The phage DNA seems to be produced in the nucleoid region, since no nucleic material can be seen anywhere else in the infected cell.
  - b) In conditions such that synthesis of bacterial DNA is temporarily inhibited, bacteria infected with  $\lambda$  begin to synthesize DNA at a high rate some ten minutes after infection. There are evidences that synthesis of bacterial DNA does not start again in these bacteria and that the DNA produced is only phage DNA.
  - c) With the adsorption conditions used in this work, the synthesis of phage DNA starts only after a delay of some minutes. This delay seems to be an establishment period during which the injection of  $\lambda$  DNA and other as yet unknown processes—probably independent of protein synthesis—take place. The establishment period was found to be of the order of 8 minutes by measuring the sensitivity of genetic recombination to UV irradiation.
  - d) When the establishment period is taken into account, one finds that the increase in number of vegetative particles, which are measured genetically, is identical to the increase of DNA. This appears as an experimental evidence of an identity between the replicating genetic particles and vegetative phage DNA.
  - e) Lambda-infected bacteria in which lysogenization takes place show a DNA synthesis which is delayed as compared to the synthesis in uninfected bacteria. Infecting phage DNA does not multiply appreciably before lysogenizing. It then seems that the decision between lysogenization and vegetative multiplication is taken very early after infection.
-

## I. INTRODUCTION.

Deux grandes catégories peuvent être distinguées parmi les bactériophages: celle des phages virulents, qui amènent toujours une réponse lytique de la bactérie, et celle des phages tempérés, qui peuvent dans certaines conditions s'incorporer sous forme de prophage dans le génome bactérien. Or, si le développement intracellulaire d'un groupe de coliphages virulents, les phages T2 et T4, est maintenant bien étudié, les connaissances sur le développement des phages tempérés sont plus fragmentaires. Nous avons donc cherché ici à compléter sur certains points l'image actuelle de la multiplication végétative du phage tempéré  $\lambda$ .

Les études biochimiques et morphologiques du développement intracellulaire de T2 ont montré le déroulement suivant. Après pénétration de l'acide désoxyribonucléique (ADN) phagique, il y a une période sans synthèse d'ADN de T2, et où la possibilité de synthèse de protéines est nécessaire pour la suite du développement (Cohen, 1948; Burton, 1955; Tomizawa et Sunakawa, 1956; Hershey et Melechen, 1957). On a pu mettre en évidence l'apparition durant cette période de « protéines précoces », qui n'ont pas de parenté sérologique avec le phage fini (Watanabe, 1957; Cohen, comm. pers.). Durant cette même période on assiste à la destruction des nucléoïdes bactériens, dont le contenu est dispersé dans des « vacuoles marginales » (Luria et Human, 1950; et d'autres auteurs, voir réf. dans Kellenberger, Séchaud et Ryter, 1959). Ces vacuoles s'effacent alors qu'apparaissent à l'intérieur de la cellule de petites accumulations d'ADN qui augmentent de plus en plus (Kellenberger, Séchaud et Ryter, 1959). Chimiquement on commence à pouvoir mesurer de l'ADN phagique (qui contient chez T2 de l'hydroxyméthylcytosine au lieu de cytosine, ce qui le distingue de l'ADN bactérien) (Wyatt et Cohen, 1952) à peu près en même temps qu'apparaissent les débuts du « pool morphologique »; pendant quelques minutes ensuite il y a synthèse rapide d'ADN (Cohen, 1948; Hershey, Dixon et Chase, 1953; Vidaver et Kozloff, 1957). Puis, tandis que la synthèse d'ADN continue à la même vitesse, il y a condensation de « portions » d'ADN qui deviennent chacune le contenu d'une tête

de phage avec déjà sa forme polyédrique caractéristique; sur ce polyèdre d'ADN se construit probablement la membrane protéique, puis s'attache et se complète la queue pour arriver finalement au phage mûr actif (Kellenberger, Séchaud et Ryter, 1959).

D'après les mesures génétiques et les théories de Visconti et Delbrück (1953), les génomes phagiques formeraient un « pool » où ils auraient de nombreuses chances de se rencontrer. Pendant sa formation chaque phage T2, en effet, semble effectuer en moyenne 5 à 8 rencontres avec possibilité d'échange génétique. Ce « pool génétique » était à l'origine une notion abstraite; de nombreux arguments en faveur de son identité avec l'accumulation d'ADN phagique ont été avancés depuis lors (Hershey, 1956; Delbrück et Stent, 1957; Kellenberger, 1959). Une évidence supplémentaire importante serait apportée par la comparaison quantitative de l'accumulation d'ADN avec le nombre de génomes dans le pool génétique. On peut faire une mesure du pool génétique pour certains phages au moyen d'une surinfection par un phage mutant. Pour T2 malheureusement, la plupart des phages surinfectants est perdue par suite d'une réaction bactérienne (French, Lesley, Graham et Van Rooyen, 1951), et la mesure génétique est impossible. Ces mesures sont en revanche possibles avec le phage  $\lambda$ .

Si l'on compare T2 et  $\lambda$ , la différence essentielle est le caractère tempéré de  $\lambda$ , qui lui permet dans les bactéries lysogènes de se comporter comme une partie du génome bactérien. Cette « parenté » de  $\lambda$  et de sa bactérie hôte est aussi démontrée par le fait que le phage défectif  $\lambda$ dg emporte dans son génome une partie du génome de la bactérie dans laquelle il s'est produit et peut ainsi transduire les caractères Gal d'une bactérie dans une autre (Morse, Lederberg et Lederberg, 1956; Arber, G. Kellenberger et Weigle, 1957).

Il était prévisible que cette différence de comportement entre les deux phages aurait une corrélation au niveau de l'ADN. En effet, alors que l'ADN de T2 (considéré seul, indépendamment du glucose ou autre substance qui pourrait y être attaché) diffère de l'ADN bactérien non seulement par la présence d'une autre base (5-hydroxyméthylcytosine au lieu de cytosine) mais encore par un rapport différent des deux bases puriques, l'ADN de  $\lambda$  ne peut être distingué de celui de la bactérie ni par les bases ni par le rapport de celles-ci (Arber, non publié; Kaiser, 1960).

Une autre différence fondamentale est d'ordre génétique: les phages  $\lambda$  semblent n'effectuer qu'une demie à une rencontre en moyenne (Wollman et Jacob, 1954; Kaiser, 1955), ce qui laisse supposer que le pool des génomes  $\lambda$ , au moins aussi grand que celui de T2, est organisé différemment.

En étudiant le comportement intracellulaire de  $\lambda$ , il faut distinguer clairement deux cas: le cas où il y a réponse lytique de la bactérie et le cas où il y a lysogénéisation. En général, après infection par  $\lambda$ , un certain pourcentage des bactéries devient lysogène, les autres, la majorité, multiplient le phage et se lysent. On peut cependant étudier séparément les deux réponses si, pour l'étude du développement végétatif, on utilise un mutant semi-virulent  $\lambda_c$ , et si, pour la lysogénéisation, on utilise une multiplicité assez élevée de  $\lambda$  dans des bactéries vieilles et carencées (voir VI); dans ce cas toutes les bactéries deviennent lysogènes.

Dans le présent travail, nous étudierons les effets morphologiques du développement végétatif de  $\lambda$ , au moyen d'observations de bactéries infectées entières ou de coupes ultraminesces. Nous confirmerons les résultats de Kellenberger (1953) en montrant que le seul phénomène visible est un empatement graduel des nucléoides sans aucune disposition spatiale particulière ni distinction morphologique entre les nucléoides et une éventuelle accumulation d'ADN phagique.

Le développement de  $\lambda$  sera ensuite étudié du point de vue chimique et génétique. Il s'agira de voir quand commence la production de génomes phagiques, si elle a lieu tout de suite après l'injection ou après un délai comme chez T2, et de vérifier si elle dépend d'une synthèse préalable de protéines. Nous utiliserons pour cette étude deux voies: la mesure chimique de l'ADN, dans des conditions où l'augmentation d'ADN constatée pourra être attribuée au phage seul, et la mesure des génomes phagiques par surinfection avec un autre phage  $\lambda$  génétiquement marqué. La comparaison des résultats obtenus par ces deux méthodes fournira une évidence de la correspondance directe génome — ADN durant la multiplication.

L'identité des ADN de la bactérie et du phage  $\lambda$  sera mise en évidence une fois de plus par l'étude de l'action de T2 sur des bactéries infectées par  $\lambda$ . On constatera en effet que T2 agit de la même façon sur les deux ADN.

Enfin la question de l'établissement de la lysogénie sera abordée par une comparaison — portant surtout sur la synthèse de l'ADN — entre des bactéries en voie de lysogénisation, des bactéries non infectées, et des bactéries multipliant le phage  $\lambda$ c. Cette comparaison montrera que la décision entre la réponse lysogène et la réponse lytique est prise dès les premières minutes après infection et que les génomes  $\lambda$ , dans nos conditions, ne se multiplient probablement pas avant de lysogéniser la bactérie.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Bactéries*: *E. coli* K12S (Weigle et Delbrück, 1951). Souches indicatrices: C600 (Appleyard, 1954), et CR63, mutant de C600, résistant à  $\lambda$  mais sensible à  $\lambda$ h (Appleyard, Mc Gregor et Baird, 1956).

*Phages*: Nous avons utilisé le phage  $\lambda$  sauvage, ses mutants c (plaques claires) et mi (petites plaques) décrits par Kaiser (1955), h (Appleyard, Mc Gregor et Baird, 1956) et b2 (densité moindre; G. Kellenberger, Zichichi et Weigle, 1960. Caractère probablement identique au caractère l de Jacob et Wollman, 1954).

Le phage T2 utilisé dans les expériences de surinfection a été décrit précédemment (Kellenberger et Séchaud, 1957).

### *Milieux.*

Milieu de culture: Bacto-Tryptone Difco 1% avec 0,5% NaCl (pH 6,9-7).

Milieu de dilution: tampon phosphatique (0,7%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4% NaCl) +  $10^{-3}$  M  $\text{MgSO}_4$  ajouté après stérilisation (pH 6,9).

Milieu de carence et d'adsorption (Kaiser, 1955):  $\text{MgSO}_4$   $10^{-2}$  M en eau distillée. Ce milieu n'est pas tamponné et le pH varie fortement (constaté des valeurs de 5,7 à 6,8 avant incubation des bactéries).

On ajoute  $10^{-3}$  M  $\text{MgSO}_4$  au milieu nutritif si la dilution du milieu d'adsorption n'y apporte pas au moins cette concentration d'ions  $\text{Mg}^{++}$ , ceci pour empêcher l'inactivation des phages  $\lambda$ .

Les méthodes générales employées dans le travail avec les phages ont été décrites par Adams (1959).

Les stocks de phages ont été préparés soit en culture liquide pour  $\lambda c$ , soit sur boîtes Pétri pour  $\lambda c^+$ , et purifiés par filtration sur Cellite et centrifugation à basse vitesse, puis concentrés par une centrifugation de 70 minutes à 45.000 g et reprise du sédiment de phages dans du tampon phosphatique.

D'autres méthodes seront décrites dans les paragraphes correspondants.

*Lyse artificielle des bactéries infectées.*

La lyse provoquée par le chloroforme (Séchaud et Kellenberger, 1956) a été généralement utilisée. Elle a été vérifiée par une variante de la technique de Kohn (1960) consistant à congeler à  $-70^{\circ}$  C les bactéries puis à les dégeler à  $37^{\circ}$  en présence de chloroforme (pendant 20 minutes); les cultures se clarifient alors complètement dès la 20<sup>e</sup> minute après infection, ce qui est plus tôt qu'avec le chloroforme seul;  $\lambda$  n'est pas inactivé par ce traitement. Les deux techniques donnent des résultats identiques. Les phages  $\lambda$  ne supportent pas ou supportent mal les techniques suivantes de lyse: traitement aux ultrasons (Anderson et Doermann, 1952), broyage dans un désinté-grateur Mickle à billes de verre (Hotchin, Dawson et Elford, 1952), et lyse par action conjuguée du lysozyme et du Teepol (Colobert, 1957).

*Préparation des bactéries pour l'étude morphologique.*

a) *Coloration fluorescente* (Anderson, Armstrong et Niven, 1959). Nous avons utilisé une variante de la méthode de préparation de ces auteurs, variante mise au point avec le D<sup>r</sup> Anderson. Les bactéries à colorer sont fixées en suspension par addition d' $\text{OsO}_4$  (solution en tampon de Michaelis à pH 6) jusqu'à une concentration finale de 0,1%. Après 4 heures de fixation, on étale les bactéries sur gélose et les décalque sur une lamelle couvre-objet. La préparation est alors lavée 5 minutes dans du tampon de Walpole pH 5 (60 ml HCl N, 200 ml acétate de Na M, 740 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ), puis colorée 30 minutes dans un bain d'orange d'acridine 0,05% en tampon de Walpole pH 5; elle est ensuite lavée dans 4 ou 5 bains successifs du même tampon, pendant 5 minutes chaque fois. La préparation est enfin montée sur lame dans une goutte du même tampon et scellée. L'observation est faite en lumière bleue (4350 Å), sur fond noir avec un filtre jaune au-dessus de l'objectif pour supprimer la lumière bleue diffusée. On obtient une fluorescence

jaune à verte de l'ADN — d'autant plus verte que l'ADN est plus concentré semble-t-il — et rouge de l'ARN. La micrographie en couleurs de ces préparations n'offre pas de problème avec des films rapides; mais la micrographie en noir et blanc présente des difficultés, à cause du voisinage spectral et de l'intensité relative des deux couleurs. En revanche, ces mêmes préparations se prêtent fort bien à la micrographie en contraste de phase. Et comme en contraste de phase les bactéries colorées à l'orange d'acridine ne présentent aucune différence par rapport à des bactéries non colorées fixées et montées de la même façon, on peut donc employer deux méthodes d'observation sur les mêmes préparations, et contrôler directement les données de la fluorescence par la micrographie en contraste de phase.

b) *Préparation pour l'observation globale des cellules au microscope électronique.* Une modification a été apportée à la méthode décrite par Kellenberger (1953), consistant en la fixation du spécimen en liquide, par addition d'OsO<sub>4</sub> (1% en tampon de Michaelis pH 6) jusqu'à une concentration de 0,1%. La fixation dure environ 40 minutes; puis on étale la suspension sur boîtes d'agar collodionné et après filtration on détache le film en le faisant flotter sur eau distillée. Les micrographies ont été prises avec un microscope Trüb Täuber, type KMk équipé d'un diaphragme de contraste dans l'objectif.

c) *Coupes ultramines.* Les techniques de fixation et d'inclusion de bactéries sont décrites en détail dans des travaux de Ryter et Kellenberger (1958a, 1958b). On résumera ici la « fixation standard » et l'inclusion au Vestopal. Un prélèvement de la culture (20 ml à 2-3.10<sup>8</sup> bact./ml) reçoit 1 ml d'OsO<sub>4</sub> (1% en tampon acétate-véronal de Michaelis, pH 6, avec 0,7% NaCl et 10<sup>-2</sup> M Ca<sup>++</sup>), ce qui stoppe le métabolisme; après centrifugation, les bactéries sont reprises dans 1 ml d'OsO<sub>4</sub>, et 0,1 ml de tryptone, les acides aminés s'étant révélés indispensables à une bonne fixation du nucléoplasme. Après une fixation de 16 heures environ les bactéries sont centrifugées et reprises à 45° environ dans de l'agar (2% dans le même tampon) qui une fois refroidi est découpé en petits blocs. Un bain d'acétate d'uranyl (0,5% dans le même tampon) pendant 2 heures contribue au contraste des préparations et à la stabilité du nucléoplasme. Les blocs sont ensuite déshydratés à l'acétone et inclus au Vestopal W en passant

par une série de bains acétone-Vestopal de plus en plus concentrés en Vestopal.

Les coupes ont été effectuées sur un microtome conçu par Kellenberger (1956) et observées avec un microscope électronique RCA type EMU-2D équipé de diaphragmes Canalco dans le condenseur (diam. 250  $\mu$ ) et dans l'objectif (diam. 50  $\mu$ ).

#### *Extraction et titration de l'ADN.*

La méthode de Burton (1955, 1956) a été utilisée: des prélèvements de 20 ml de culture à  $2-4 \cdot 10^8$  bact./ml sont acidifiés par 0,45 ml d'acide perchlorique 70%, reçoivent 20 mg d'albumine et sont laissés 2 heures à 4° C. Après centrifugation (15 minutes à 3500 tpm) le précipité est repris dans de l'acide perchlorique 0,5 N de façon à obtenir 3,0 ml de suspension. L'extraction des acides nucléiques se fait par chauffage à 70° C pendant 25 minutes, en agitant périodiquement la suspension.

Pour la titration on utilise un réactif à la diphenylamine préparé comme suit: 100 ml d'acide acétique glacial, 1,5 g de diphenylamine et 1,5 ml d'acide sulfurique concentré; au moment de l'emploi on ajoute 0,1 ml d'acétaldéhyde 0,07 m à 20 ml de la solution de diphenylamine.

Un ml de l'extrait dans lequel on veut titrer l'ADN reçoit 2 ml de réactif. Le mélange est laissé à 30° C pendant 16 heures au moins. La densité optique de la couleur bleue obtenue est ensuite déterminée à l'aide du photomètre Meunier en utilisant un filtre avec absorption maximum à 590 m $\mu$ . La calibration de la concentration de l'ADN en fonction de la densité optique a été faite dans chaque expérience, avec une série de dilutions d'une solution connue d'ADN (Acide thymonucléique purissimum de Fluka).

Nous avons étudié la précision de la méthode — extraction et titration — en effectuant 12 prélèvements dans une culture bactérienne redroïdie à 4° C. La table 1 montre que les valeurs obtenues pour la quantité d'ADN présentent une déviation standard de 6%.

#### *Dosage du phosphore.*

La méthode choisie est une adaptation de la réaction de Bell-Doisy-Briggs à de très petites quantités (Machebœuf et Delsal, 1943).

TABLE 1.

*Reproductibilité des titrations d'ADN.*

Une culture S en tryptone à 3 à  $4.10^8$  bact./ml a été refroidie à 4° pendant une heure; douze prélèvements de 20 ml ont été faits et traités séparément pour l'extraction des acides nucléiques et la titration de l'ADN. Un prélèvement fournit 3 ml d'extrait.

Prélèvement	d. o. <sup>a</sup>	ADN/ml d'extrait	$\Delta$ <sup>b</sup>	$\Delta^2$
1	78	40 $\gamma$	+ 0,8	0,64
2	73	36	— 3,2	10,24
3	84	44	+ 4,8	23,04
4	83	43,5	+ 4,3	18,49
5	76	38,5	— 0,7	0,49
6	75,5	38	— 1,2	1,44
7	76,5	39	— 0,2	0,04
8	77	39	— 0,2	0,04
9	78	40	+ 0,8	0,64
10	73,5	36,5	— 2,7	7,29
11	75	37,5	— 1,7	2,89
12	76	38,5	— 0,7	0,49
		470,5		65,73

$$m = \frac{470,5}{12} = 39,2 \text{ } \gamma/\text{ml}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{65,73}{11}} = 2,44 \quad \frac{\sigma}{m} = \frac{2,44}{39,2} = 0,062 = \text{environ } 6\%$$

a) Densité optique après réaction avec la diphenylamine,

b) Déviation.

Elle utilise la réduction de l'acide phosphomolybdique par l'hydroquinone.

Un prélèvement de 1,5 ml de la solution à étudier (contenant jusqu'à 15  $\gamma$  P/ml) est minéralisé par addition de 0,1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. et 0,3 ml HNO<sub>3</sub> conc. et chauffage prudent jusqu'à évaporation de l'eau puis départ des vapeurs jaunâtres de HNO<sub>3</sub>; au 0,1 ml d'acide sulfurique restant, on ajoute 1,4 ml H<sub>2</sub>O et place le tout dans un bain-marie bouillant pendant 15 minutes pour obtenir tout le P sous forme d'orthophosphate.

Le réactif est préparé en mélangeant au moment de l'emploi des parties égales de molybdate de Na 10%, de sulfite de Na 20% et d'hydroquinone 0,5% (contenant 0,05% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc.).

Aux 1,5 ml de l'échantillon minéralisé, on ajoute 0,75 ml du réactif, et 0,75 ml d'eau pour arriver aux 3 ml nécessaires pour la cellule du photomètre. On laisse la réaction se faire exactement 30 minutes à température de chambre et détermine la densité optique de la couleur bleue développée à l'aide du photomètre Meunier muni d'un filtre orange (590 m $\mu$ ). L'étalonnage a été fait chaque fois avec une solution de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, et nous avons vérifié que la minéralisation ne conduisait ni à une perte de phosphore, ni à une attaque du verre dégageant une quantité appréciable de silice (qui donne la même réaction que le phosphore). La précision de la méthode n'a pas été déterminée exactement; nous l'estimons de l'ordre de 5% environ (déviations standard).

*Mesure de l'antigène capable de se combiner avec l'antisérum spécifique de  $\lambda$  (« serum blocking power »).*

Cette méthode décrite par DeMars (1955) a été étendue au phage  $\lambda$  par Jacob et Wollman (1956). Elle consiste à exposer un sérum anti- $\lambda$  à une quantité inconnue d'antigène  $\lambda$  et à déterminer l'activité spécifique restant au sérum. Pour cela on mesure sur une suspension-test de phages l'inactivation qu'il peut encore produire. Cette inactivation est comparée aux inactivations obtenues dans les mêmes conditions lorsque des quantités connues de phages se sont combinées avec le sérum. On peut ainsi déterminer à combien de phages  $\lambda$  correspond la quantité d'antigène qui a réagi.

On ajoute à 0,8 ml d'antisérum (dilution 1:200 d'un antisérum ayant un K de 17 min<sup>-1</sup>) 0,2 ml de la solution à titrer et laisse réagir le mélange pendant 6 heures à 37° C; on ajoute ensuite 0,2 ml de phage  $\lambda$  vir (qui se multiplie sur des bactéries lysogènes pour  $\lambda$ ) à 1-2.10<sup>7</sup>/ml, laisse encore 2 heures à 37° et titre les phages  $\lambda$  vir survivants sur un indicateur lysogène W3110 ( $\lambda$ ). La courbe d'étalonnage est établie avec des dilutions successives d'un stock de  $\lambda$  purifié. Dans ces conditions on peut titrer l'antigène spécifique des phages actifs entre les concentrations d'environ 8.10<sup>8</sup> et 4.10<sup>10</sup> unités phagiques/ml.

## III. LE SYSTÈME BACTÉRIE-PHAGE

La plupart des expériences présentées ici ont été faites sur des bactéries *E. coli* K12S infectées par  $\lambda h^+$ . Ce système présente les caractéristiques suivantes.

a) *Adsorption*. Le phage  $\lambda h^+$  n'adsorbe bien que sur des bactéries vieilles, ou mieux, sur des bactéries carencées en  $MgSO_4$   $10^{-2}$  M (Kaiser, 1955). Le traitement que nous avons toujours appliqué aux bactéries avant l'infection par  $\lambda h^+$ , et auquel nous ferons allusion en parlant de « bactéries vieilles et carencées » est le suivant: les bactéries S sont cultivées en tryptone jusqu'au maximum de leur croissance (environ  $2,5 \cdot 10^9$  bact./ml); elles sont ensuite centrifugées et resuspendues en solution de  $MgSO_4$ , puis carencées pendant 60 minutes. Après la centrifugation, on rince généralement le culot avec un peu de tampon, à la fois pour mieux éliminer le milieu de culture, et pour tamponner un peu le milieu de carence. L'adsorption de  $\lambda h^+$  est de plus de 95% en 5 minutes sur des bactéries S vieilles et carencées à une concentration de  $1,5$  à  $2,5 \cdot 10^9$  bact./ml.

b) *Injection*. Il a été montré que dans les conditions d'adsorption qui viennent d'être décrites, il n'y a qu'une injection négligeable de l'ADN de  $\lambda$  tant que les bactéries sont en milieu de carence (G. Kellenberger, Arber et E. Kellenberger, 1959). Des phages dont l'ADN contenait du  $P^{32}$  ont été adsorbés sur des bactéries S vieilles et carencées. En détachant les phages par traitement au mixeur (Hershey et Chase, 1952) avant la dilution en tryptone et à différents temps après celle-ci, on constate que le  $P^{32}$  ne pénètre dans les bactéries qu'après leur dilution en milieu nutritif, et qu'il ne pénètre pas immédiatement dans toutes les bactéries; il faut environ 2 minutes pour que 50% de l'ADN ne puisse plus être détaché des bactéries, et 6 à 7 minutes pour que plus de 95% de l'ADN soit injecté. La survie des centres infectieux après mixage, qui mesure la proportion des phages ayant complètement injecté leur génome au moment du traitement, augmente parallèlement à la pénétration de l'ADN, avec un décalage entre les deux courbes de 1 à 2 minutes.

Les premières minutes en milieu nutritif après infection dans nos conditions sont donc la période d'injection du phage  $\lambda$ . La situation

est différente avec d'autres conditions d'adsorption. par exemple lorsqu'on stoppe les synthèses bactériennes par addition de 0,01 M KCN et utilise un temps d'adsorption de 10 minutes, 40% de l'ADN sont déjà injectés lors de la remise des cellules en milieu de culture (G. Kellenberger et al., 1959).

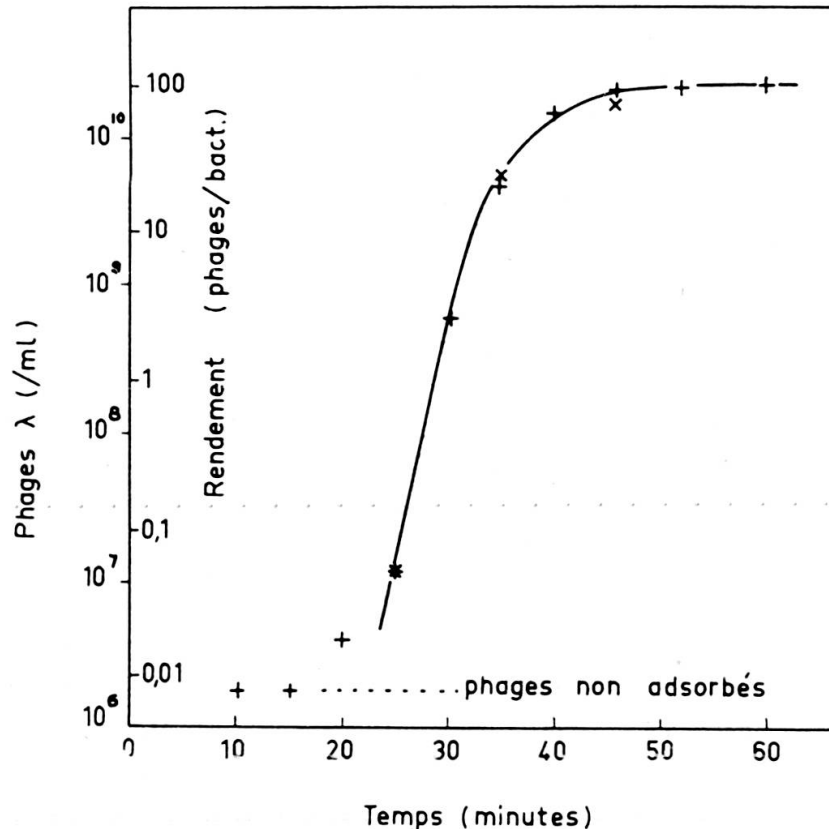


Fig. 1.

Croissance intracellulaire du phage  $\lambda c$  dans des bactéries carencées.

Des bactéries S vieilles et carencées ont été infectées avec  $\lambda c$  (m. d'i. = 4) en milieu d'adsorption et diluées en tryptone à 37° au temps 0. La culture contenait  $2,4 \cdot 10^8$  bactéries infectées par ml et  $4 \cdot 10^6$  phages non adsorbés; il restait  $6 \cdot 10^6$  bactéries non infectées par ml. Le rendement final était de 90 phages en moyenne.

Lyse artificielle obtenue aux temps indiqués par congélation et fonte en présence de chloroforme (+) ou par l'action du chloroforme seul (x).

c) *Apparition intracellulaire des phages  $\lambda$* . Les phages actifs intracellulaires apparaissent dans les bactéries infectées à des temps variant un peu d'une expérience à l'autre. On trouve une moyenne d'un phage par cellule entre la 26<sup>e</sup> et la 30<sup>e</sup> minute, et la

quantité maximum de phages intracellulaires est atteinte entre la 40<sup>e</sup> et la 60<sup>e</sup> minute. On n'a pas déterminé si cette variation dépendait de la multiplicité d'infection ou uniquement de l'état et de la concentration des bactéries. Le rendement final est variable et dépend certainement de la concentration de la culture et de la multiplicité d'infection. La figure 1 présente un cas où il y avait en moyenne un phage par bactérie à 28 minutes et où le rendement final était d'environ 90 phages, pour une population de bactéries infectées de  $2,4 \cdot 10^8$ /ml.

Le phage  $\lambda_{ch}$  a été également utilisé, soit en surinfection, avec  $\lambda_{ch}^+$ , soit seul pour les études morphologiques. Ce phage est capable d'adsorber en milieu tryptone et sur des bactéries en croissance active. L'adsorption est de 70 à 80% en 5 minutes sur des bactéries à  $3-4 \cdot 10^8$ /ml. En milieu de carence, condition nécessaire lors d'une infection simultanée avec  $\lambda_{ch}^+$ , plus de 80% des phages  $\lambda_{ch}$  sont adsorbés en 5 minutes sur des bactéries à environ  $2 \cdot 10^9$ /ml, s'il y a une trace de tampon dans le milieu de carence.

Le système bactéries S en croissance active- $\lambda_{ch}$  produit des phages un peu plus rapidement que les bactéries carencées infectées par  $\lambda_{ch}^+$ . On a une moyenne d'un phage par bactérie entre la 23<sup>e</sup> et la 25<sup>e</sup> minute.

#### IV. ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DE BACTÉRIES MULTIPLIANT LAMBDA

Les effets visibles de la multiplication végétative de  $\lambda$  ont été étudiés sur des bactéries entières d'une part, et sur des coupes ultra-minces d'autre part. Pour l'observation globale, les bactéries infectées ont été soit observées au microscope optique, en contraste de phase, ou en fluorescence après coloration à l'orange d'acridine, soit observées au microscope électronique.

L'observation globale montre des images similaires, qu'il s'agisse de bactéries S vieilles et carencées infectées par  $\lambda$ , ou de bactéries S en croissance active infectées par  $\lambda_{ch}$ . La planche 1, figures *a* à *f*, présente le changement d'apparence de bactéries S en croissance active au cours de l'infection par  $\lambda_{ch}$ . On voit qu'entre des bactéries non infectées (*a*) et des bactéries infectées depuis 5 (*b*) ou même 10 minutes (*c*), il n'y a

pas de différence visible, si ce n'est peut-être une légère augmentation de matériel chromatinique. Par contre, à 15 minutes (*d*), ou plus tard, on constate une augmentation très nette de ce matériel, qui à 27 minutes (*f*) remplit la plus grande partie de la cellule. A ce moment c'est le début du « stade diffus » montré par Kellenberger (1953) au microscope électronique. Il faut rappeler ici que des phages intracellulaires sont présents dans les bactéries, en quantité augmentant rapidement, durant le stade diffus; ces phages apparaissent comme matériel chromatinique tout comme le noyau bactérien ou l'ADN du phage végétatif, et contribuent certainement à l'apparence diffuse de ce matériel, dans le cas des préparations colorées.

Les coupes ultraminesces de bactéries S en croissance active infectées par  $\lambda$ h montrent la même évolution (planche 2, fig. *a* à *e*): augmentation du nucléoplasme, nulle ou lente durant les premières minutes, puis plus rapide; elle se manifeste par un accroissement de la surface moyenne occupée par les vacuoles — de forme très irrégulière — contenant le nucléoplasme. Les changements apparents se limitent à cette augmentation et à l'apparition parfois de particules phagiques dans les derniers temps avant la lyse. Le cytoplasme en particulier ne présente aucun changement visible.

Ces résultats confirment ceux de Kellenberger (1953). L'infection par  $\lambda$  ne cause aucun dommage visible au noyau bactérien. Quant à l'ADN phagique, d'une part on ne constate pas d'accumulation d'ADN distincte des nucléoïdes ni de changement du cytoplasme qui pourrait correspondre à une répartition de l'ADN phagique dans la cellule, et d'autre part les nucléoïdes semblent augmenter de volume alors que — dans les bactéries carencées à tout le moins — l'infection semble inhiber la synthèse d'ADN bactérien (voir Vb); l'ADN phagique semble donc se multiplier dans le voisinage immédiat ou peut-être même à l'intérieur du noyau bactérien.

## V. MULTIPLICATION DES PHAGES VÉGÉTATIFS

### a) *Quantité d'ADN par particule phagique.*

Pour comparer les nombres de phages végétatifs intracellulaires mesurés génétiquement et les augmentations d'ADN dans les bactéries

infectées, il faut disposer d'une « unité phagique d'ADN », qui est définie comme la masse d'ADN contenue dans un phage  $\lambda$ .

Nous avons donc mesuré cette quantité d'ADN. Mais il faut rappeler ici que, la réaction de la diphenylamine mesurant le deoxyribose, et le standard utilisé étant de l'ADN de thymus, les « quantités d'ADN » dont nous parlerons sont en réalité des « quantités d'ADN de thymus correspondant au deoxyribose mesuré » et qu'elles ne tiennent pas compte des différences possibles entre les ADN, comme par exemple la présence de glucose associé à l'ADN chez T2 (Volkin, 1954; Sinsheimer, 1956; Jesaitis, 1956).

Des phages  $\lambda c$  (portant le caractère  $b_2$ ) ont été purifiés par deux centrifugations à haute vitesse après action de la DNase et de la RNase, puis par centrifugation dans un gradient de densité (Meselson, Stahl et Vinograd, 1957). Le chlorure de caesium utilisé pour obtenir la densité voulue (1,508) a été ensuite éliminé par une centrifugation puis par une dialyse en présence de  $MgSO_4$   $10^{-2}$  M. La suspension de phages finale contenait  $1,15 \cdot 10^{12}$  phages actifs/ml ( $\pm 7\%$ ). Une titration au microscope électronique n'a pas été faite sur ce stock particulier, mais les titrations de plusieurs autres stocks purifiés de la même façon ont donné chaque fois un titre en particules visibles égal au titre actif. La mesure de l'ADN a été faite sur deux échantillons en parallèle, et donnait  $105 \gamma$  d'ADN par ml de stock ( $\pm 4,5\%$ ). On obtient donc une valeur de  $9 \cdot 10^{-17}$  g d'ADN par phage  $\lambda b_2$  ( $\pm 12\%$ ).

Nous avons déterminé également la quantité de phosphore par particule, pour la comparer à la quantité d'ADN. Le rapport de ces deux quantités, en effet, donne une indication sur la présence éventuelle de substances autres que l'ADN mais contenant également du phosphore, soit de l'ARN si l'on admet que la membrane protéique de  $\lambda$  ne contient pas de phosphore. La suspension de phages  $\lambda$  qui contenait  $105 \gamma$  d'ADN/ml contenait  $10 \gamma$  de phosphore par ml; un autre stock, contenant  $36 \gamma$  d'ADN/ml contenait  $3,05 \gamma$  de P par ml. Le rapport P/ADN est ainsi égal à  $1/11$ , à environ  $10\%$  près. Le même rapport mesuré pour l'ADN de thymus utilisé comme standard vaut environ  $1/12$ , et pour T2  $1/12$  également. La valeur théorique de ce rapport pour de l'ADN pur est de 1 à 10,5. Le rapport P/ADN est donc le même, à la précision des mesures près, pour  $\lambda$ , pour de l'ADN chimiquement pur, et pour T2 dont tout l'acide nucléique est de l'ADN; on peut donc conclure que  $\lambda$  ne contient probablement

que de l'ADN comme acide nucléique; ou, si un peu d'ARN était présent, celui-ci formerait moins de 10% du total des acides nucléiques.

b) *Synthèse d'ADN dans les bactéries infectées.*

Pour étudier la synthèse d'ADN dans des bactéries infectées, nous avons choisi des conditions telles que la quantité d'ADN dans des bactéries non infectées reste stationnaire. Deux méthodes ont été employées pour arrêter temporairement la synthèse d'ADN bactérien: la carence et l'irradiation aux rayons ultraviolets.

Carence: Kjeldgaard, Maaløe et Schaechter (1958) ont montré que lorsqu'on transfère des bactéries d'un milieu où leur multiplication est lente à un milieu où la multiplication est plus rapide, l'ARN et la « masse totale » sont immédiatement ou très vite synthétisés à la vitesse correspondant au nouveau temps de génération, alors que la synthèse d'ADN continue pendant une certaine période au taux faible du premier milieu avant de changer brusquement à la nouvelle vitesse; la synthèse d'ADN devient plus rapide lorsque les rapports entre les divers constituants cellulaires ont atteint les valeurs caractéristiques du nouveau taux de croissance. Si donc l'on part de bactéries carencées, dont le taux de croissance est nul, et qu'on les resuspend en milieu nutritif, on peut prévoir que la synthèse d'ADN ne reprendra pas immédiatement. Nous verrons qu'il y a en effet un délai dans cette reprise, délai qui suivant les expériences varie de 15 à 35 minutes.

*Irradiation UV*: Kelner (1953) a montré que dans des bactéries, après irradiation UV, la synthèse d'ADN est complètement inhibée pendant une période dépendant de la dose, tandis que les synthèses de protéines et d'ARN sont beaucoup moins affectées. Il s'agit d'une inhibition réelle et non pas d'une synthèse compensée par une dégradation (Kanazir et Errera, 1954).

Nous avons donc soumis les bactéries, avant infection, à une irradiation UV. Les bactéries S, cultivées et carencées comme nous l'avons décrit plus haut, sont diluées en milieu d'adsorption jusqu'à  $1,2-1,5 \cdot 10^9$  bact. par ml; elles sont irradiées le temps voulu à 53 cm d'une lampe Westinghouse type WL 782-30, en couche ne dépassant pas 1,5 mm et constamment agitée. La suspension de bactéries est ensuite replacée à 37°, puis est infectée ou non, et diluée 1:4 en tryptone

tenu à 37°, et aérée. Le temps de dilution en tryptone est le temps 0. On évite d'exposer les bactéries irradiées à une lumière intense pour ne pas avoir de photorestauration.

Une dose d'irradiation UV de 30 secondes (correspondant à une survie des bactéries d'environ 1%) a été choisie, car elle arrête la synthèse de l'ADN bactérien pendant plus de 30 minutes, tout en permettant un rendement phagique comparable à celui de bactéries non irradiées.

La synthèse d'ADN après infection par  $\lambda c$  a été alors étudiée en parallèle dans des bactéries carencées et des bactéries carencées et irradiées. Une suspension de bactéries S vieilles et carencées, diluées à  $1,4 \cdot 10^9$  bact./ml, a été divisée en deux parties dont l'une a été irradiée pendant 30 secondes. Chacune des deux cultures, irradiée et non irradiée, a été divisée à son tour en deux, une partie ne recevant pas de phage, l'autre étant infectée avec 2,5  $\lambda c$  par bactérie. Après 5 minutes d'adsorption (adsorption de 95% environ), les quatre cultures ont été diluées 1:4 en tryptone à 37°, et la synthèse d'ADN a été suivie au cours du développement phagique (fig. 2). Si l'on considère d'abord les bactéries non infectées, on voit que la quantité d'ADN contenue dans les cellules carencées et irradiées reste constante pendant 30 à 40 minutes, tandis que la synthèse reprend après 15 à 20 minutes dans les bactéries carencées seulement. Les bactéries infectées, au contraire, montrent une synthèse d'ADN identique, qu'elles soient irradiées ou non. Cette synthèse débute un peu après la 10<sup>e</sup> minute, et sa vitesse est plus élevée que dans les bactéries carencées non infectées.

Rendement à	35 min.	50 min.	65 min.
Bactéries non irradiées .	4	63	78
Bactéries irradiées . . .	4	52	70

Dans cette expérience, les bactéries infectées, carencées ou carencées et irradiées, ont produit le même nombre de phages actifs. Pour vérifier d'une autre façon que le développement phagique est identique, nous avons mesuré dans les deux cas l'augmentation des

génomés phagiques (voir méthode au § Vc) et trouvé une multiplication des génomes identique. Le développement de  $\lambda$  est donc bien le même dans des bactéries irradiées à la dose choisie, et des bactéries non irradiées.

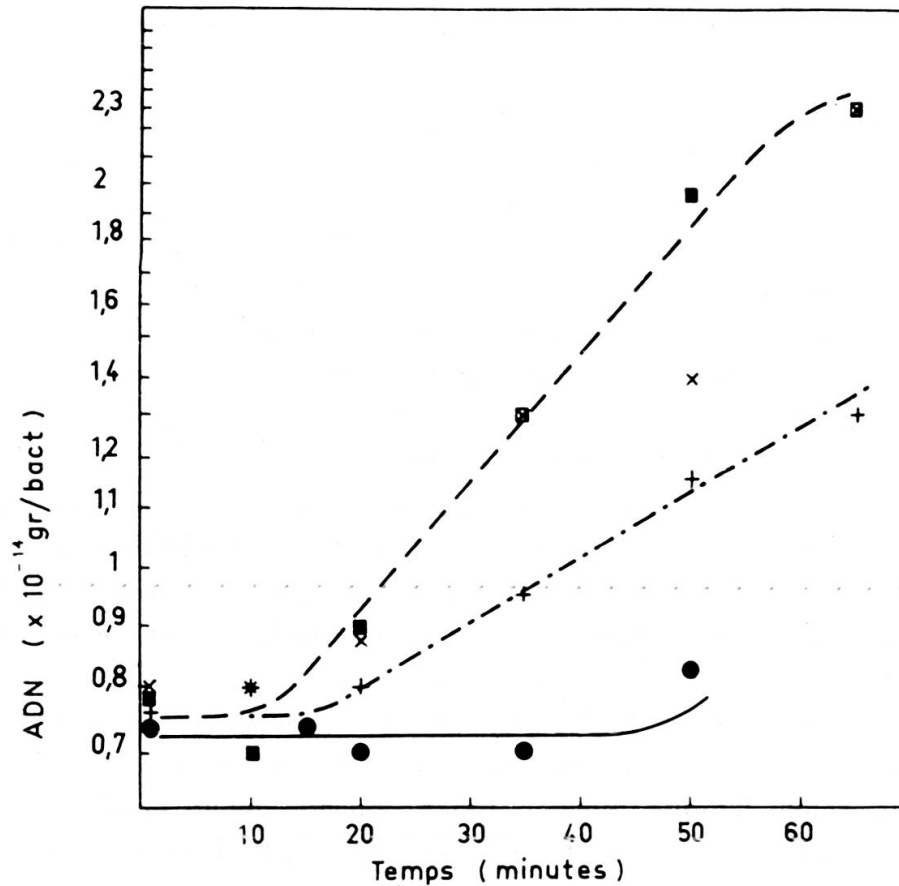


Fig. 2.

ADN dans des bactéries infectées et non infectées, irradiées ou non.

Des bactéries S vieilles et carencées ont été divisées en quatre parties qui ont reçu les traitements suivants: ■ infection par  $\lambda c$  (m. d'i. = 2,5); × irradiation UV de 30 secondes puis infection par  $\lambda c$  (m. d'i. = 2,5; ● irradiation UV 30 secondes; + pas de traitement. Les bactéries ont été ensuite diluées au temps 0 en tryptone à 37° et incubées à une concentration d'environ  $2,5 \cdot 10^8$  bact./ml.

L'ADN synthétisé par les bactéries infectées est-il phagique et bactérien, ou seulement phagique ? Si la synthèse d'ADN et le développement phagique sont identiques dans des bactéries carencées irradiées et non irradiées, on peut conclure que l'ADN bactérien doit également se comporter de façon identique dans ces deux cas. Or les

bactéries carencées non infectées présentent des synthèses d'ADN bien différentes si elles sont irradiées ou non. Cela implique, soit que la synthèse d'ADN bactérien est inhibée par la synthèse d'ADN phagique, soit que l'infection rend les bactéries carencées et irradiées capables à nouveau de synthétiser de l'ADN comme des cellules non irradiées infectées. D'autre part, en considérant l'ADN contenu dans les phages actifs, on peut calculer qu'une éventuelle synthèse d'ADN bactérien doit être beaucoup plus faible que la synthèse ayant lieu dans les bactéries carencées non infectées. En effet, l'ADN dans une bactérie infectée par  $\lambda$  peut être réparti en trois parties: l'ADN bactérien, l'ADN compris dans les phages finis et l'ADN des phages végétatifs; ce dernier ne s'annule jamais complètement au profit des phages finis, pour T2 en tout cas (Hershey, 1953; Hershey et Burgi, 1956). En admettant que l'ADN bactérien augmente dans les bactéries infectées comme dans les bactéries non infectées, on constate que dans l'expérience de la figure 2, à 50 minutes, la différence de  $5,5 \cdot 10^{-15}$  gr ADN par bactérie existant entre les cellules infectées ou non correspond exactement à l'ADN compris dans les 60 phages actifs par bactérie que l'on trouve à ce moment; ce qui ne laisse rien pour l'ADN des phages végétatifs. Dans une autre expérience, le rendement à 40 minutes a été de 100 phages par bactérie; à ce moment l'augmentation d'ADN était de  $1,7 \cdot 10^{-14}$  gr/bact. dans les cellules carencées et infectées et de  $1,1 \cdot 10^{-14}$  gr/bact. dans les cellules carencées seulement; la différence de  $6 \cdot 10^{-15}$  gr correspond à moins de 70 unités phagiques, donc à moins de 70% des phages actifs présents, sans parler des phages végétatifs.

On peut donc conclure que s'il y a synthèse d'ADN bactérien dans les bactéries infectées, celle-ci est fortement réduite par rapport à celle qui a lieu dans les bactéries non infectées et de plus qu'elle est la même dans des bactéries qui, non infectées, sont capables ou non de multiplier leur ADN. Cette dernière conclusion paraissant peu vraisemblable, nous préférons l'hypothèse que la synthèse d'ADN bactérien est complètement inhibée.

### c) *Multiplication des génomes phagiques.*

La mesure génétique du nombre de génomes phagiques a été introduite par Jacob et Wollman (1956) et Whitfield et Appleyard

(1957), dans des travaux sur les phages défectifs. Nous avons modifié la méthode de ces auteurs pour le travail avec des phages actifs. Thomas (1959) a, de façon indépendante, utilisé la même modification.

Lorsqu'on infecte une bactérie simultanément avec 2  $\lambda$ c marqués génétiquement,  $h^+$  et  $h$ , le rapport des deux types génétiques dans la descendance est égal au rapport des deux multiplicités d'infection. Si l'on infecte la bactérie avec l'un des phages,  $h^+$ , puis la surinfecte après différentes périodes avec le second phage,  $h$ , on constate, que la proportion du type génétique surinfectant  $h$  diminue dans la descendance quand le délai entre les deux infections augmente. S'il est correct d'appliquer à ce cas la relation constatée lors d'une infection simultanée, on peut calculer le nombre de génomes du premier type qui formaient le pool des génomes en multiplication au moment où les génomes surinfectants ont commencé leur propre multiplication: si le rapport  $h/h^+$  dans la descendance est de 1 à 10, et que la multiplicité d'infection du phage  $h$  était de 2,5, on calcule qu'il y avait environ 25 génomes  $h^+$  en train de se multiplier quand les génomes  $h$  ont commencé à faire de même.

L'identité postulée du rapport des génomes  $h$  et  $h^+$  pendant le développement phagique avec le rapport des phages génotypiquement  $h$  et  $h^+$  dans la descendance n'est réelle que si plusieurs conditions sont remplies. Tout d'abord la descendance doit donner une image juste du pool, c'est-à-dire, à défaut de comprendre tous les génomes produits, en présenter un échantillon pris au hasard; cette maturation des phages au hasard, l'une des hypothèses de base de la théorie de Visconti et Delbrück (1953) et largement utilisée, semble justifiée. Il faut aussi que les deux types de génomes se multiplient à la même vitesse; c'est le cas lors d'une infection simultanée puisque le rapport des deux génotypes dans la descendance est égal au rapport des multiplicités d'infection; c'est également le cas lors d'une surinfection tardive comme le montre l'expérience décrite dans la table 2: après surinfection à 14 minutes, une culture est lysée artificiellement à différents temps et le rapport des génotypes  $h$  et  $h^+$  déterminé dans les phages libérés; on voit que ce rapport est constant au cours du développement. Il faut encore que n'apparaisse pas au cours du développement du premier phage un phénomène d'exclusion du phage surinfectant, qui aurait pour conséquence d'en diminuer la multiplicité effective; nous n'avons sur ce point, plus difficile à

vérifier, qu'une évidence indirecte; si l'on surinfecte des aliquots de la même culture avec la même multiplicité de  $\lambda$ ch, on trouve la même quantité de bactéries ne produisant pas de phages surinfectants après une surinfection tardive qu'après une surinfection précoce; il semble donc que la multiplicité effective n'a pas, ou a peu, varié. Enfin la mesure n'est certainement plus correcte lors d'une surinfection si tardive que les génomes surinfectants commencent à se multiplier pendant la période de maturation; en effet le rapport  $h^+/h$  dans la descendance est faussé par la présence des phages  $h^+$  qui n'étaient plus végétatifs quand a débuté la multiplication des phages  $h$ , et l'on obtient des valeurs trop élevées pour le nombre de génomes  $h^+$  en multiplication.

TABLE 2.

*Constance du rapport génotypes  $h^+$ /génotypes  $h$  au cours du développement.*

Temps (min.)	Phages $h^+$	Phages $h$	Rapport $h^+/h$
24	$370 \cdot 10^3$	$120 \cdot 10^3$	$3,1 \pm 0,32$
27	$86 \cdot 10^4$	$210 \cdot 10^3$	$4,1 \pm 0,54$
30	$260 \cdot 10^4$	$70 \cdot 10^4$	$3,7 \pm 0,51$
35	$400 \cdot 10^4$	$120 \cdot 10^4$	$3,3 \pm 0,35$

L'erreur indiquée est l'écart type  $\sigma$ . Pour les comptages,  $\sigma = \sqrt{m}$ ; pour les rapports  $\frac{m_1}{m_2}$ ,  $\sigma = \sqrt{\left(\sigma_1 \frac{1}{m_2}\right)^2 + \left(\sigma_2 \frac{m_1}{m_2^2}\right)^2}$ .

Des bactéries S vieilles et carencées ont été infectées par  $\lambda$ c (m. d'i. = 3); 14 minutes après remise en tryptone, la surinfection a été faite avec une m. d'i. effective d'environ 9  $\lambda$ ch. Après traitement à l'antisérum et dilution à  $2,1 \cdot 10^5$  bact./ml, les bactéries ont été stoppées aux temps indiqués par addition de KCN (concentration finale  $10^{-2}$  M); la titration a été faite sur indicateur mixte après 60 minutes supplémentaires à 37°. Le rendement obtenu dans ces conditions était d'environ deux phages par bactérie à 24 minutes et 25 à 35 minutes. On n'a pas tenu compte dans cette expérience de l'effet des bactéries n'ayant reçu que  $\lambda$ ch<sup>+</sup>, leur effet étant constant et leur nombre négligeable d'autre part.

On constate qu'une sur les quatre valeurs du rapport dépasse les limites données par  $\sigma$ , limites qui ont 30 chances sur 100 d'être dépassées. On peut donc conclure que les variations de ce rapport ne sont pas significatives.

Les expériences ont été effectuées de la façon suivante. Des bactéries S vieilles et carencées, à une concentration d'environ  $2.10^9$  bact./ml, sont infectées en milieu d'adsorption avec des multiplicités variables du phage  $\lambda c$ . Après une période d'adsorption de 5 minutes (adsorption d'environ 95%), la culture infectée est diluée 1:5 en tryptone tenu à 37°, et aérée. Elle est divisée en autant d'aliquots qu'il y aura de temps différents de surinfection. Aux temps voulus le phage  $\lambda ch$  est ajouté; 7 minutes plus tard — 80 à 85% des phages surinfectants sont adsorbés — on dilue la culture 1:  $10^4$  en tryptone et l'incubation est poursuivie. La descendance est titrée après traitement des lysats au chloroforme 60 à 80 minutes après l'infection; on utilise un indicateur mixte C600-CR63 (une partie de CR63 pour cinq à dix parties de C600). Lors d'une infection simultanée, le phage  $\lambda ch$  est ajouté dans le milieu d'adsorption en même temps que le phage  $\lambda c$ . L'adsorption de  $\lambda c$  et celle du surinfectant sont chaque fois mesurées, et les multiplicités d'infection réelles calculées.

Il faut encore considérer le fait qu'une certaine proportion des bactéries ne reçoit qu'un des deux types de phages, et que leur descendance devrait être retranchée de la descendance totale avant qu'on calcule le rapport des deux génotypes. La descendance des bactéries infectées par  $\lambda c$  seulement fausse le rapport  $\lambda c/\lambda ch$  surtout pour les surinfections précoces où la quantité de  $\lambda c$  produite est du même ordre de grandeur que celle de  $\lambda ch$ ; pour les surinfections tardives, où  $\lambda c$  devient fortement majoritaire, l'effet diminue en proportion. Inversément, la descendance des bactéries infectées par  $\lambda ch$  seulement exerce la plus forte influence sur le rapport  $\lambda c/\lambda ch$  lors d'une surinfection tardive, quand la quantité de  $\lambda ch$  produite est petite. Nous avons tenu compte des bactéries n'ayant reçu que le premier phage — que nous avons titrées en considérant comme telles toutes les bactéries infectées donnant naissance à une plaque trouble sur l'indicateur mixte utilisé — en soustrayant leur descendance du total avant de calculer le rapport  $\lambda c/\lambda ch$ . Ces bactéries formaient suivant les expériences 5 à 15% des bactéries infectées. Quant aux bactéries infectées par  $\lambda ch$  seulement, nous avons admis que leur quantité était négligeable, car le nombre de bactéries survivant à la première infection (3 à 10% de la population) ne diminuait pas de façon mesurable après la surinfection.

La figure 3 résume quatre expériences où les multiplicités d'infection du premier phage,  $\lambda_c$ , ont varié de 2,3 à 5, et celles du phage surinfectant,  $\lambda_{ch}$ , de 3 à 4. Le nombre de génomes  $h^+$  en multiplication dans la bactérie infectée, exprimé en génomes par phage infectant,

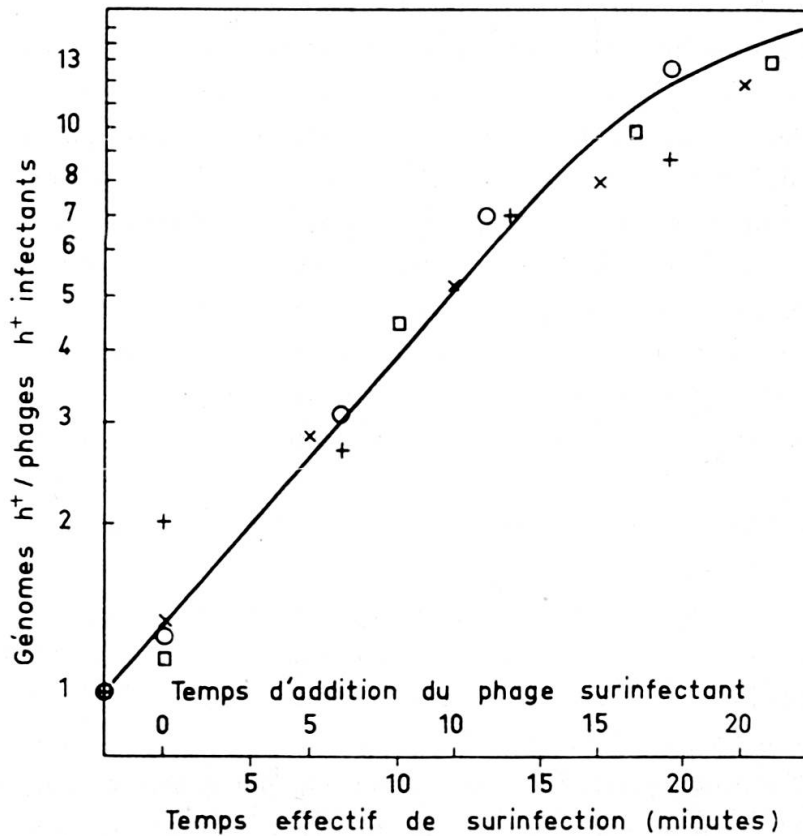


Fig. 3.

#### Mesure de la production de génomes phagiques.

Des bactéries S vieilles et carencées ont été infectées avec diverses multiplicités de phages  $\lambda_{ch}^+$  ( $\times$  m. d'i. = 5;  $\circ$  m. d'i. = 3,2;  $\square$  m. d'i. = 2,8;  $+$  m. d'i. = 2,3), et surinfectées avec  $\lambda_{ch}$  à divers temps au cours du développement phagique. On a déterminé la proportion de génotypes  $h^+$  et  $h$  dans leur descendance et calculé le nombre  $n$  de génomes  $h^+$  qui se multipliaient dans la bactérie quand les génomes surinfectants ont commencé leur propre multiplication, en utilisant pour cela la relation

$$\left( \frac{\text{génotypes } h^+}{\text{génotypes } h} \right)_{\text{descendance}} = \frac{n}{\text{m. d'i. phage surinfectant}}$$

Le nombre  $n$  divisé par la multiplicité d'infection du phage  $\lambda_{ch}^+$  donne le nombre moyen de génomes par phage initial, donc le facteur de multiplication des génomes infectants. Le temps effectif de surinfection est discuté dans le texte. Notons que le génome surinfectant ne commence sa multiplication que quelques minutes après le temps effectif de surinfection. Ce délai sera déterminé ultérieurement.

est donné en fonction du « temps effectif de surinfection ». Ce dernier a été introduit parce que l'on constate qu'une mesure des génomes  $h^+$  faite en mettant le phage surinfectant au temps 0 dans la culture infectée indique un nombre de  $h^+$  plus élevé que leur multiplicité d'infection, tandis que la même mesure faite par infection simultanée dans le milieu d'adsorption donne bien un nombre de génomes  $h^+$  égal à la multiplicité d'infection. La différence entre ces deux expériences est que le phage surinfectant est déjà adsorbé au temps 0 dans le second cas et pas dans le premier; il ne peut pas y avoir d'autre différence, concernant l'injection ou le développement, puisque, l'injection n'a pas lieu en milieu d'adsorption. Les deux mesures sont donc faites à des « temps effectifs » différents séparés par la période d'adsorption de  $\lambda ch$ . Le délai entre les deux mesures peut être déterminé graphiquement (fig. 3) sur la courbe des génomes  $h^+$  en fonction du temps d'addition du phage surinfectant, en extrapolant cette courbe jusqu'à une valeur égale à la multiplicité d'infection: on obtient ainsi un délai de 2 minutes environ. Si d'autre part on mesure l'adsorption de  $\lambda ch$  dans des conditions identiques aux expériences de surinfection, on trouve qu'en 2 à 3 minutes se sont déjà adsorbés 70% environ des phages qui seront adsorbés finalement; cela fournit une définition du temps effectif de surinfection, qui est le temps où environ 70% des phages surinfectants qui adsorberont l'ont fait.

La figure 3 permet trois constatations. On voit que les génomes  $\lambda ch^+$  se multiplient exponentiellement, en tout cas pendant les 15 premières minutes environ de leur multiplication, avec un temps de génération d'environ 5 minutes. Tous les génomes injectés se multiplient de la même façon, que 2 ou 5 phages infectent la bactérie; les phages infectants semblent donc se comporter d'une façon indépendante les uns des autres. Enfin la courbe reflète un comportement identique des deux phages, infectant et surinfectant: ou bien tous deux commencent à se multiplier dès qu'ils sont adsorbés, ce qui est exclu par les résultats des expériences d'injection de G. Kellenberger (voir III), ou bien chaque phage, pour se multiplier, doit passer par une période préliminaire d'établissement — comprenant à tout le moins l'injection — dont la durée est la même pour tous; en effet, une période d'établissement plus longue pour le premier phage que pour les phages surinfectants se traduirait sur la courbe par un plateau d'une certaine durée avant que le nombre de génomes  $h^+$  commence à augmenter.

Comme la mesure des génomes ne fournit aucun renseignement sur la durée de la période d'établissement, nous avons cherché une autre méthode, également génétique, qui permette de mettre en évidence cette période.

d) *Délai dans la variation de la fréquence de recombinaison.*

Jacob et Wollman (1955) ont montré qu'une irradiation UV augmente fortement la fréquence de recombinaison dans un croisement entre deux phages  $\lambda$  si l'irradiation est effectuée sur les phages parents ou sur les bactéries infectées au début de l'infection; l'efficacité des UV décroît très rapidement au cours du développement phagique. Dans l'expérience de ces auteurs, qui avaient utilisé du KCN pour arrêter le métabolisme des bactéries pendant l'adsorption des phages, la fréquence de recombinaison entre les caractères utilisés était de 7% sans irradiation et de 32% après irradiation à 0 minute; elle descendait déjà à 22% à 5 minutes et à 15% à 10 minutes.

Cette diminution de l'efficacité des UV n'est pas discutée par les auteurs, mais indique à tout le moins que quelque chose change pour les génomes  $\lambda$  au cours du développement phagique, et cela dès les premières minutes après l'infection dans les conditions de Jacob et Wollman.

Si, dans nos conditions d'infection, les premières minutes après remise en milieu nutritif sont une période préliminaire où les génomes ne se multiplient pas encore, la variation de l'efficacité des UV pourrait bien être autre durant cette période que durant la multiplication des génomes.

Nous avons donc répété l'expérience de Jacob et Wollman dans les conditions d'infection habituelles. Nous avons utilisé les phages  $\lambda_{cmi}$  et  $\lambda_{c^+mi^+}$  portant tous deux le caractère b2. Des bactéries S vieilles et carencées, à  $2.10^9$  bact./ml, ont été infectées en milieu d'adsorption avec 7 phages de chaque type. Après 8 minutes d'adsorption (adsorption de plus de 98%), elles ont été diluées 1:100 en tryptone à 37° au temps 0. A intervalles de 3 minutes, des prélèvements ont été dilués 1:100 en tampon, exposés aux UV pendant 60 secondes, et dilués 1:50 en tryptone à 37°. Après 2 heures, les échantillons ont été chloroformés, et la proportion des types parents,  $cmi$  et  $c^+mi^+$ , et des types recombinants,  $cmi^+$  et  $c^+mi$ , a été déter-

minée par titration sur des bactéries indicatrices C600 irradiées. Le rendement total a été d'environ 50 phages par bactérie infectée. La figure 4 montre la diminution de l'efficacité des UV au cours du

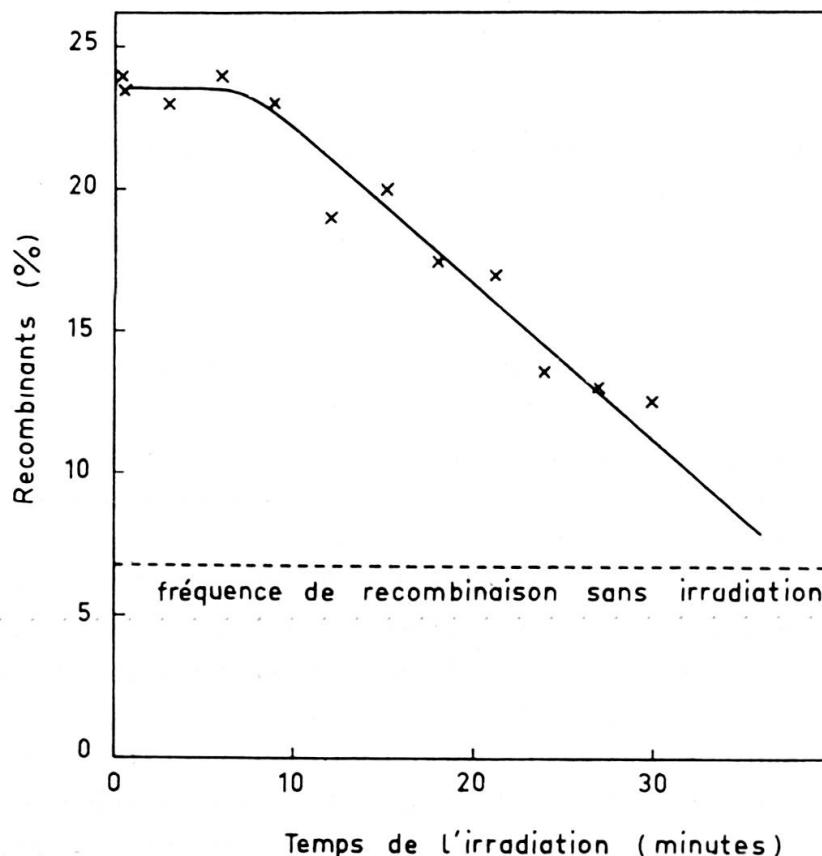


Fig. 4.

Effet de l'irradiation UV des bactéries infectées sur la fréquence de recombinaison.

Des bactéries S vieilles et carencées ont été infectées en milieu d'adsorption avec des phages  $\lambda_{cmib2}$  et  $\lambda_{c^+mi^+b2}$  (m. d'i. de chaque type = 7). Elles ont été diluées en tryptone à 37° au temps 0; aux temps indiqués des prélèvements ont été dilués en tampon, irradiés aux UV pendant 60 secondes, puis remis en tryptone à 37°. Après 2 heures d'incubation les lysats ont été chloroformés et le rapport des types parentaux et des types recombinants déterminé dans la descendance. La fréquence de recombinaison dans une culture non irradiée était de 6,8% (ligne pointillée).

développement phagique. La fréquence de recombinaison entre les caractères *c* et *mi*, qui était de 6,8% dans le témoin non irradié, est de 23 à 24% pour l'irradiation au temps 0; cette fréquence reste la même pendant les 7 à 8 premières minutes, puis décroît assez lentement.

Les 7 à 8 premières minutes après remise des bactéries infectées en milieu nutritif sont donc une période où, du point de vue des UV favorisant la recombinaison, rien ne modifie l'état des phages infectants. La période suivante, de diminution de l'effet des UV, correspond certainement à la période de multiplication des génomes. Nous constatons donc ici que la période d'établissement des génomes, par laquelle ils doivent passer avant de se multiplier, doit être de l'ordre de 7 à 8 minutes.

La diminution de l'effet des UV sur la fréquence de recombinaison constatée par Jacob et Wollman dès les premières minutes après infection semble indiquer que l'établissement peut se faire en présence de KCN. Il a été montré d'autre part que le KCN à la concentration utilisée ne supprime pas toute injection de l'ADN phagique (G. Kellenberger, Arber et E. Kellenberger, 1959).

e) *Comparaison des augmentations de l'ADN et des génomes phagiques.*

Si pendant la multiplication végétative les génomes phagiques sont bien composés d'ADN, nous mesurons l'augmentation d'une même grandeur de deux façons différentes, chimiquement d'une part, génétiquement d'autre part; les vitesses de production des génomes et de l'ADN doivent alors être les mêmes, et l'on doit pouvoir superposer les deux courbes en ajoutant aux temps effectifs de surinfection la période d'établissement qui vient d'être déterminée.

La figure 5 montre une expérience où les mesures chimiques et génétiques ont été faites en parallèle. Les deux courbes se superposent si l'on ajoute environ 8 minutes aux temps effectifs de surinfection. Dans une autre expérience semblable, on obtenait la même superposition en décalant d'environ 7 minutes. Notons que la précision des valeurs, indiquées pour l'ADN est faible, de l'ordre de 30%, car d'une part la précision de la valeur de l'unité phagique intervient, et d'autre part il s'agit de différences, petites, entre l'ADN mesuré et l'ADN bactérien, considéré comme constant. La période de décalage n'est donc déterminée qu'à  $\pm 2$  minutes près, environ.

On constate ainsi qu'en tenant compte de la période d'installation on obtient une bonne correspondance entre l'augmentation des génomes et celle de l'ADN, ce qui semble une évidence expérimentale en faveur de l'identité des deux grandeurs.

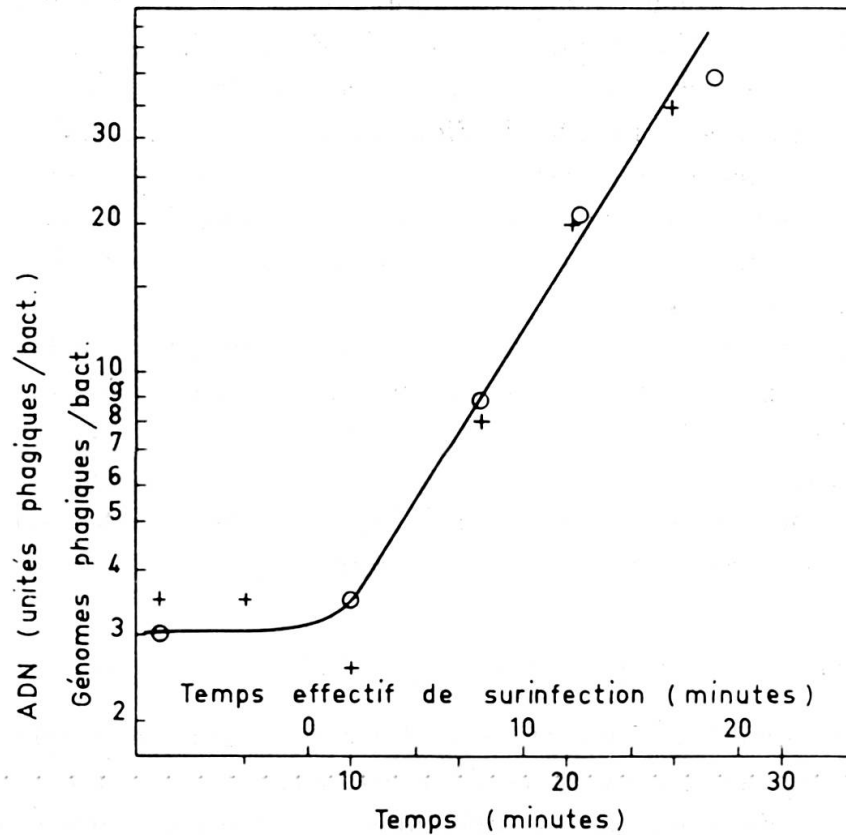


Fig. 5.

## ADN et génomes phagiques.

La synthèse d'ADN et la production de génomes phagiques, mesurée par surinfection, ont été suivies en parallèle dans des bactéries S vieilles et carencées infectées par  $\lambda$  (m. d'i. = 3; + ADN, O génomes).

Graphiquement le temps effectif de surinfection est décalé d'environ 8 minutes par rapport au temps écoulé depuis la remise en milieu nutritif, qui est aussi le temps des mesures chimiques.

Les valeurs données pour l'ADN sont les différences entre les quantités d'ADN mesurées, exprimées en unités phagiques (une unité phagique étant définie comme  $9 \cdot 10^{-17}$  g, masse d'ADN contenue dans un phage  $\lambda$ ) et la quantité d'ADN bactérien; celui-ci a été déterminé en soustrayant des 128 unités phagiques par bactérie mesurées durant les premières minutes les trois unités qui étaient en principe dues aux phages infectants. Considérant que ces différences sont petites par rapport aux quantités mesurées, et que d'autre part la valeur de l'unité phagique elle-même est déterminée à 10-15% près, on calcule que la précision des valeurs données pour l'ADN est de l'ordre de 30%.

## f) Effet du chloramphénicol.

La période d'installation de  $\lambda$  peut-elle avoir lieu en présence d'un inhibiteur de la synthèse de protéines ?

On sait en effet que, dans le cas du phage T2, il y a une période de quelques minutes après l'infection pendant laquelle la bactérie doit être capable de synthétiser des protéines pour que la multiplication de l'ADN phagique ait lieu ultérieurement. Si une inhibition de la synthèse normale de protéines — présence de chloramphénicol (Tomizawa et Sunakawa, 1956; Hershey et Melechen, 1957) ou de 5-méthyltryptophane ou d'autres analogues (Cohen, 1948; Burton, 1955), absence de l'acide aminé nécessaire pour un mutant exigeant (Burton, 1955) — est produite dès l'infection avec T2, il n'y a pas de production d'ADN phagique; mais si l'inhibition n'a lieu qu'autour de la 8<sup>e</sup> minute, l'ADN phagique se produit plus ou moins normalement. La nécessité de modifier le système enzymatique bactérien avant que la bactérie puisse fabriquer l'ADN de T2, différent du sien, suffit à rendre compte de ce fait; cependant une hypothèse existe qui propose soit un transfert de l'information de l'ADN à une structure qui contiendrait des protéines et qui serait le moule nécessaire à la duplication de l'ADN (Stent, 1958), soit une modification structurelle de l'ADN injecté dans laquelle interviendrait une protéine (Stent, 1958; Kellenberger, 1959).

Nous avons donc étudié l'effet du chloramphenicol sur la production des génomes  $\lambda$  en ajoutant l'antibiotique à divers temps et en surinfectant à divers temps. Ce problème a été également étudié par Thomas (1959), qui est arrivé à des conclusions similaires aux nôtres.

Le chloramphénicol (abréviation CP) a été utilisé à la dose de 25  $\gamma$ /ml, dose qui a été trouvée suffisante pour empêcher pendant 3 heures au moins toute production de phages intracellulaires actifs. L'antibiotique a été ajouté soit dans le milieu de carence 2 minutes avant l'infection, soit dans le tryptone avant la dilution des bactéries infectées de façon à être présent au temps 0, soit à différents temps après remise en culture. On l'a éliminé par dilution 1:10<sup>4</sup> ou 1:10<sup>3</sup> en tryptone, généralement 5 minutes après la surinfection; mais les résultats sont identiques si le CP est éliminé 5, 20 ou 40 minutes après la surinfection.

La figure 6 résume les résultats obtenus. Si le CP ajouté à 8 et à 16 minutes semble n'affecter que peu la vitesse de production des génomes, il diminue fortement cette vitesse lorsqu'il est présent au temps 0; le temps de génération est alors d'environ 15 minutes alors qu'il est de 5 minutes environ sans CP. La multiplication des génomes

est encore plus ralentie si l'inhibiteur est présent déjà pendant l'adsorption des phages, mais elle n'est pas négligeable; le temps de génération est de l'ordre de 30 minutes.

Si l'on étudie la synthèse d'ADN dans des bactéries carencées, non infectées, remises en tryptone en présence de 25  $\gamma$  CP/ml, on constate

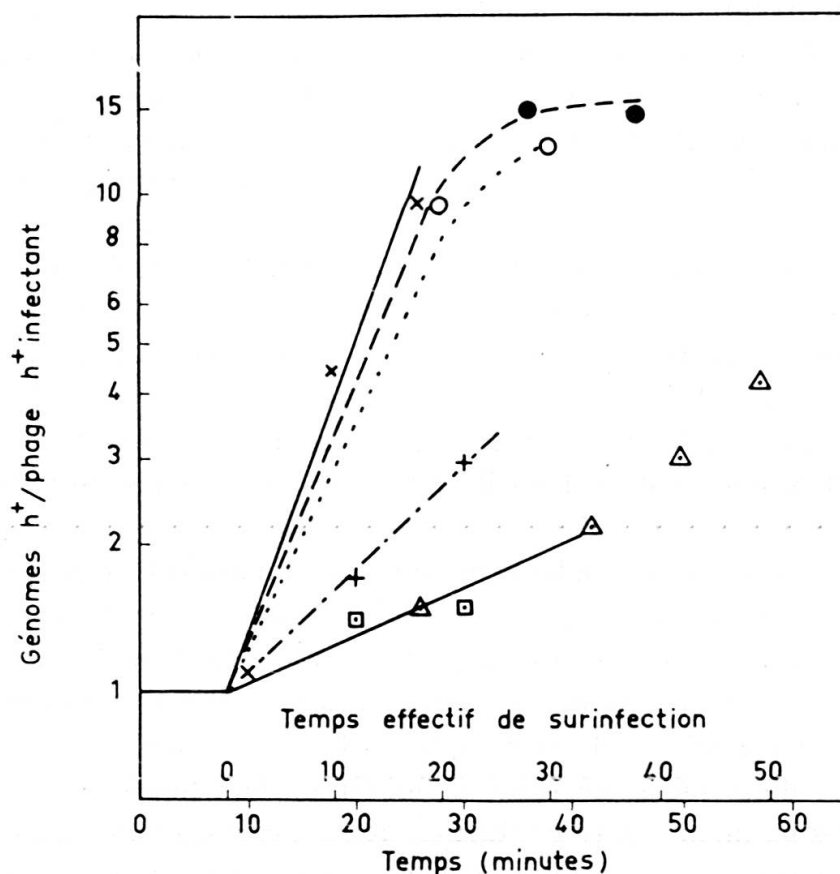


Fig. 6.

Augmentation des génomes phagiques en présence de chloramphénicol.

Des bactéries S vieilles et carencées infectées avec  $\lambda ch^+$  à une multiplicité de 2,8 (multiplicité de 7 dans l'expérience représentée par les points  $\Delta$ ) ont reçu 25  $\gamma$ /ml de chloramphénicol à différents temps et l'augmentation des génomes  $h^+$  a été mesurée par surinfection avec  $\lambda ch$  dans les différentes cultures (+ CP à 0 min.;  $\circ$  CP à 8 min.;  $\bullet$  CP à 16 min.;  $\square$  et  $\Delta$  CP 2 min. avant l'infection;  $\times$  sans CP).

qu'il n'y a pas de reprise de la synthèse d'ADN. Au contraire ce dernier diminue peu à peu (à 50 minutes il ne reste qu'environ 80% de l'ADN présent au temps 0). Par contre, si les bactéries sont infectées, il y a une augmentation d'ADN, faible et variable mais certaine.

Il semble donc que la période d'installation de  $\lambda$  n'est pas identique au premier stade de l'infection par T2, car une certaine synthèse d'ADN de  $\lambda$  a lieu même si la bactérie était incapable de synthétiser des protéines pendant cette installation. Mais le chloramphénicol semble exercer une action complexe sur les bactéries carencées, qui ne permet pas de tirer des conclusions plus précises.

g) *Action de T2 sur des bactéries infectées par  $\lambda$ .*

On sait que dans une bactérie infectée par  $\lambda$  et par T2, T2 exclut  $\lambda$ . Nous nous sommes demandé si toutes les synthèses de  $\lambda$  sont arrêtées et en particulier ce que devient l'ADN de  $\lambda$ . Le phage T2 traite-t-il cet ADN comme l'ADN bactérien, ou les distingue-t-il ?

Nous avons d'abord déterminé l'effet morphologique d'une surinfection par T2 sur des bactéries multipliant  $\lambda$ . Des bactéries S en croissance active ont été infectées par  $\lambda$ ch (m. d'i. = 3) et surinfectées 14 minutes plus tard avec 4 T2r/bact.. La culture a été fixée 6 minutes après la surinfection. On constate alors que pratiquement toutes les bactéries présentent les vacuoles marginales caractéristiques de l'infection T2 (environ 2% des bactéries n'ont pas reçu de T2), et que ces bactéries ne montrent aucun matériel chromatinique resté intact au centre de la cellule (planche 1, fig. g). Compte tenu du fait que les synthèses  $\lambda$  semblent être un peu plus rapides dans des bactéries en croissance active que dans des bactéries carencées, on calcule qu'au moment de la surinfection par T2, l'ADN de  $\lambda$  devait être de l'ordre d'un dixième de l'ADN bactérien et aurait donc pu être visible s'il était resté isolé du matériel chromatinique bactérien.

Au point de vue chimique, Hershey (1953) a montré que si des phages T2 se développaient dans des bactéries dont les acides nucléiques étaient marqués au P<sup>32</sup>, ces phages contenaient du P<sup>32</sup> en quantité correspondant à peu près à la moitié de l'ADN bactérien. Qu'une partie du P<sup>32</sup> dans les phages provint de l'ARN de la bactérie n'était pas exclu, mais cette contribution éventuelle était négligeable.

Nous avons étudié si T2 utilise l'ADN de  $\lambda$  comme celui de la bactérie et mesuré en même temps s'il l'expulse de la bactérie. Pour cela, des bactéries S vieilles et carencées ont été infectées avec  $\lambda$ c marqué par du P<sup>32</sup> (m. d'i. = 6), puis remises en tryptone à 37° à une concentration d'environ 3,5.10<sup>8</sup> bact./ml. Après 12 minutes permet-

tant l'installation et le début du développement de  $\lambda$ , les bactéries ont été surinfectées avec T2 (m. d'i. = 3,5). On a constaté que la radioactivité attachée aux bactéries infectées, mesurée après deux lavages des culots de centrifugation, était la même avant la surinfection avec T2 et 18 minutes après cette surinfection. Il n'y a donc pas expulsion de l'ADN de  $\lambda$ . Dans les conditions utilisées, le développement de T2 était lent et son rendement faible. 18 minutes après addition de T2, plus de 90% des bactéries présentaient encore des vacuoles marginales; l'inhibition de lyse était forte bien que le phage T2 utilisé soit du type r en tryptone dans des conditions normales, et le rendement était d'environ 30 phages par bactérie. Ces phages ont été traités à la DNase, centrifugés à haute vitesse (21.000 g pendant 45 minutes), repris dans de l'eau distillée et laissés 2 heures à 37° (Sagik, 1954), puis centrifugés deux fois à basse vitesse avec des bactéries B/2 comme ballast pour enlever les débris bactériens. Après ces manipulations, il restait environ 7 phages par bactérie initiale, et ces phages, adsorbés sur B, contenaient 2,1% du P<sup>32</sup> contenu à l'origine dans  $\lambda$ . La purification des phages était suffisante pour qu'on puisse affirmer que 70% au minimum de la radioactivité adsorbée sur B était due à des phages T2. Il y a donc une réutilisation de l'ADN de  $\lambda$  par T2, et il est à présumer que si l'on pouvait obtenir un bon développement de T2, on constaterait une utilisation de l'ADN de  $\lambda$  comparable à celle de l'ADN bactérien. En effet, 7 phages par bactérie représentent approximativement un trentième des phages T2 produits dans de bonnes conditions, qui devraient alors contenir au moins 40 à 50% de l'ADN de  $\lambda$ . Le mauvais développement de T2 pourrait être dû soit au caractère r du phage utilisé, soit à la carence des bactéries.

Il semble donc que T2 dégrade, pour le réutiliser ensuite, l'ADN de  $\lambda$ . Nous nous sommes alors demandé si, après une surinfection avec T2 inactivé aux UV, qui ne se multiplie plus mais qui détruit le noyau bactérien et donc probablement les génomes  $\lambda$ , une certaine production de protéines de  $\lambda$  pouvait avoir lieu malgré l'absence présumée des génomes. Des bactéries S vieilles et carencées ont été infectées par  $\lambda$  (m. d'i. = 4); 14 minutes plus tard elles ont été surinfectées par des phages T2 inactivés aux UV (m. d'i. = 2; dose d'UV telle qu'environ 0,1% des bactéries infectées à cette multiplicité produisait des phages T2); environ 85% des bactéries recevait du phage T2. Morphologiquement on assistait à la formation des vacuoles

marginales; il n'y avait ensuite ni apparition, ni augmentation de matériel chromatinique. Ces cellules, lysées artificiellement à différents temps après la surinfection, ne contenaient aucun phage intracellulaire. Elles ne produisaient pas non plus de quantité appréciable d'antigène spécifique de  $\lambda$ , comme le montrait la mesure dans leur lysat de la capacité de bloquer le sérum anti- $\lambda$ ; on trouvait dans le lysat de la culture surinfectée avec T2 irradié 15% environ de la quantité d'antigène  $\lambda$  présente dans le lysat de la culture témoin non surinfectée, ce qui correspondait bien à la proportion de bactéries qui n'avaient pas reçu de T2 lors de la surinfection et qui produisaient donc du phage  $\lambda$ . On peut noter en passant que la quantité d'antigène trouvée dans un lysat normal est toujours deux à trois fois plus élevée que le nombre des phages présents.

## VI. LYSOGÉNISATION ET RÉPONSE LYTIQUE

On peut contribuer à l'étude de l'établissement de la lysogénie (Lieb, 1953; Bertani, 1958) par la mesure de l'augmentation de l'ADN dans les bactéries infectées. Par là, on peut espérer répondre à la question: y a-t-il multiplication des génomes phagiques avant que la lysogénisation ait lieu ?

On a constaté qu'en infectant des bactéries S vieilles et carencées avec 5 à 10  $\lambda$  (type sauvage de Kaiser), on obtient plus de 90% de bactéries lysogènes. Il faut noter cependant que pendant les premières minutes après l'infection, l'étalement probablement dérange le processus de lysogénisation si bien qu'une proportion variable des bactéries qui, en culture liquide, deviennent lysogènes, apparaissent comme centres infectieux; ce n'est que 30 minutes environ après l'infection que le nombre de bactéries infectées apparaissant comme lysogènes dans les titrations se stabilise à environ 100% du titre des bactéries avant l'infection. Fry et Gros (Fry, 1959; Fry et Gros, 1959) ont également constaté dans certaines conditions la lysogénisation de la presque totalité de bactéries infectées avec une haute multiplicité de phages  $\lambda 22$ .

Dans ces conditions on peut faire une comparaison directe entre une réponse lysogène pratiquement complète et la réponse lytique produite par  $\lambda c$ .

Une culture S carencée a été divisée en trois parties: l'une a été infectée avec du phage  $\lambda$  (m. d'i. = 7), la seconde a reçu  $4 \lambda c$  par bactérie, et la troisième partie n'a pas été infectée et sera le témoin du développement bactérien. L'augmentation d'ADN a été suivie dans les trois cultures, de même que la densité optique qui correspond au poids sec donc à la quantité totale de matière (Schachter, Maaløe et Kjeldgaard, 1958) (fig. 7). Les titrations, tant par comptage au microscope à contraste de phase que par étalement, indiquent que les bactéries lysogénisées n'ont commencé à se multiplier que vers la 70<sup>e</sup> minute, alors que les témoins se divisaient déjà autour de la 40<sup>e</sup> minute. Ce retard dans la multiplication est un des aspects du dérangement causé par le phage dans la bactérie en voie de lysogénisation, dérangement qui se manifeste également dans l'évolution de la densité optique et celle de l'ADN.

L'ADN des bactéries en voie de lysogénisation n'augmente pas de façon décelable à partir de la 10<sup>e</sup> minute environ comme dans les bactéries où se développe le phage  $\lambda c$ ; au contraire, il semble diminuer un peu. Le nombre et la précision des mesures étaient suffisants pour affirmer que s'il y a une augmentation des génomes, elle est très faible et ne dépasse pas 5 à 10 unités. Ce qui revient à dire qu'on a au maximum un doublement des phages  $\lambda$  injectés, puisque la multiplicité d'infection était de 7. Il semble donc que le choix entre la voie de la lysogénisation et la réponse lytique est fait très tôt, pendant les premières 10 à 15 minutes après infection. Cette conclusion avait déjà été atteinte par Arber (1958) lors de l'étude de la coopération d'un phage  $\lambda$  à la lysogénisation par le phage défectif  $\lambda dg$ ; cette coopération n'a pleinement lieu que si  $\lambda$  est ajouté en même temps que  $\lambda dg$ ; dès la remise en milieu nutritif il y a baisse progressive de l'efficacité du phage actif surinfectant et à partir de la 10<sup>e</sup> minute environ la coopération est presque nulle.

La densité optique comme l'ADN montrent que la lysogénisation retarde l'augmentation de masse et la reprise de la synthèse d'ADN d'environ 20 minutes par rapport aux bactéries témoins.

Dans une autre expérience semblable, les bactéries témoins reprenaient un peu plus lentement leur croissance qui était aussi plus lente que dans l'expérience de la figure 7. Il y avait alors un retard plus long, de l'ordre de 60 minutes, entre les développements — ADN et densité optique — des bactéries lysogénisées et des témoins. Les

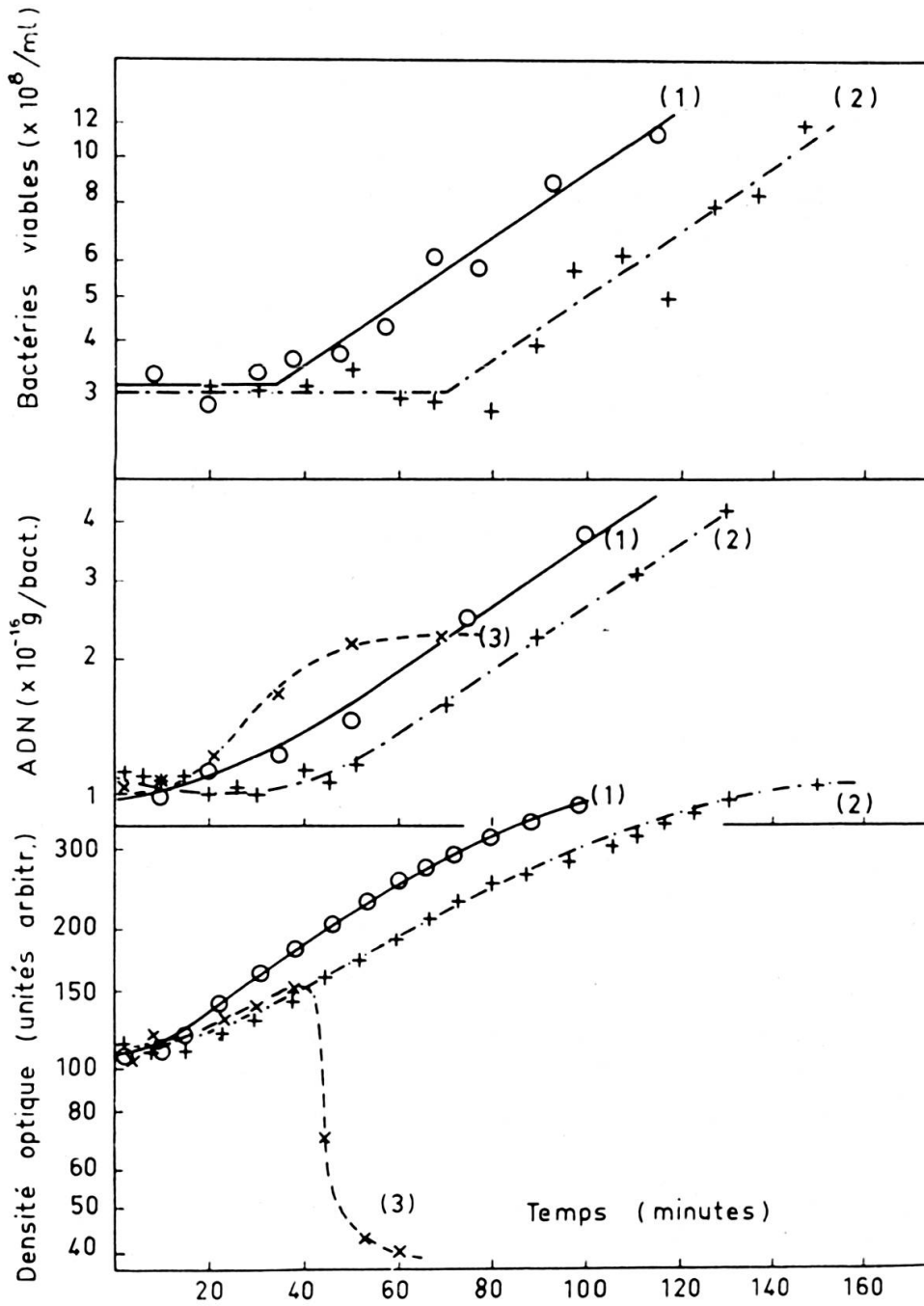


Fig. 7.

Comparaison des comportements de bactéries infectées par  $\lambda c^+$ , infectées par  $\lambda c$ , et non infectées.

Une culture S carencée a été divisée en trois aliquots. L'un n'a pas été infecté (courbes 1,  $\bigcirc$ ), le second a été infecté avec  $\lambda c^+$  (m. d'i. = 7; courbes 2, +) et le troisième l'a été avec  $\lambda c$  (m. d'i. = 4; courbes 3,  $\times$ ). Tous trois ont été dilués en tryptone à 37° au temps 0, et le nombre de cellules viables, la quantité d'ADN et la densité optique suivis dans les trois cultures.

bactéries infectées avec  $\lambda c$ , cependant, présentait une synthèse d'ADN et une évolution de la densité optique identiques à celles de la figure 7. On constatait alors que la densité optique des bactéries en voie de lysogénisation augmentait sensiblement plus lentement que celle des bactéries développant le phage  $\lambda c$ , et que les deux courbes

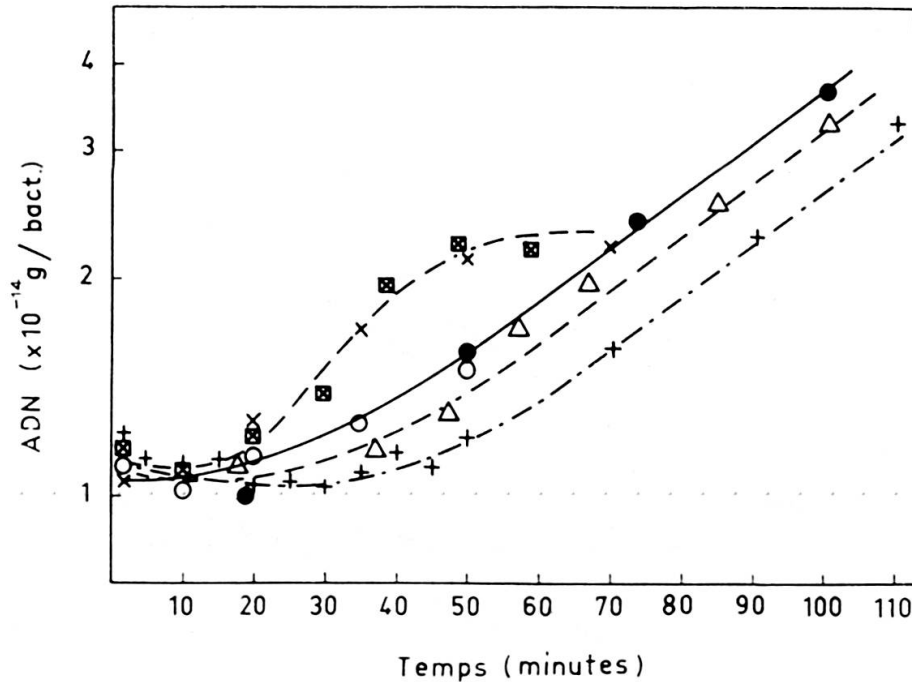


Fig. 8.

Augmentation d'ADN dans des bactéries infectées par  $\lambda c^+$ ,  $b2^+$  et  $b2$ , et par  $\lambda c$ ,  $b2^+$  et  $b2$ .

La figure est composée de l'expérience de la figure 7, où des bactéries S vieilles et carencées avaient été infectées soit par  $\lambda c^+ b2^+$  (m. d'i. = 7, +), soit par  $\lambda c b2$  (m. d'i. = 4, ×), et d'une expérience semblable où les phages utilisés étaient  $\lambda c^+ b2$  (m. d'i. = 7, Δ) et  $\lambda c b2^+$  (m. d'i. = 3,5, ⊠). Les bactéries non infectées (○ et ●) présentaient la même augmentation d'ADN dans les deux expériences.

de densité optique, qui coïncident pendant les premières 20 minutes environ dans la figure 7, divergeaient presque immédiatement; autre évidence du fait que la décision entre lysogénisation et réponse lytique est prise très tôt.

Un retard dans la reprise des bactéries en voie de lysogénisation par rapport aux bactéries témoins a été constaté également par Fry

et Gros (1959) pour toutes les synthèses bactériennes qu'ils ont étudiées.

On peut se demander si ce retard est lié à la lysogénisation elle-même, au fait qu'un génome phagique s'associe sous forme de prophage au chromosome bactérien, ou si c'est un effet spécifique; on peut imaginer par exemple que les phages infectants ont causé des dommages à la paroi et la membrane bactériennes, dommages qui doivent être réparés avant que le métabolisme normal de la bactérie puisse reprendre. Nous avons tenté d'étudier cette question en répétant la mesure de l'ADN dans des bactéries infectées avec des phages  $\lambda b2$  (m. d'i. = 7; conditions identiques à celles de l'expérience de la figure 7). Dans les conditions utilisées, le phage  $\lambda b2$ , dont le caractère  $b2$  empêche une lysogénie stable (G. Kellenberger, Zichichi et Weigle, 1960), ne provoque pas la réponse lytique d'une proportion appréciable des bactéries infectées; tout se passe comme si  $\lambda b2$  restait dans la bactérie sans pouvoir se fixer sur le chromosome bactérien et suivre ainsi le rythme de division de la cellule-hôte (G. Kellenberger, Zichichi et Weigle, 1961). Nous avons vérifié en même temps que les bactéries où  $\lambda$  se multiplie végétativement présentent la même augmentation d'ADN, que le phage soit  $b2^+$  (fig. 8). On constate que l'augmentation d'ADN dans les bactéries infectées par  $\lambda b2$  accuse un certain retard par rapport à l'augmentation dans les bactéries témoins mais que ce retard est beaucoup plus faible que celui des bactéries en voie de lysogénisation.

Le phénomène de lysogénisation lui-même semble donc déterminer en grande partie le retard constaté dans la synthèse de l'ADN.

## VII. DISCUSSION

Les expériences qui viennent d'être rapportées ont montré les faits suivants: dans nos conditions d'infection le phage  $\lambda$  végétatif ne se multiplie pas immédiatement, mais seulement après une « période d'installation » de quelques minutes; il se multiplie alors exponentiellement, dans le voisinage immédiat — très probablement — du noyau bactérien qu'il laisse intact semble-t-il.

La période d'installation, qui semble durer environ 7 à 8 minutes dans des bactéries carencées, présente les caractéristiques suivantes:

Il n'y a ni dégradation chimique, ni modification morphologique visible du noyau bactérien. L'installation semble n'être pas inhibée par le chloramphénicol. D'autre part la synthèse d'ADN phagique ne commence pas durant cette période, et l'effet des UV sur la fréquence de recombinaison reste constant.

D'après les résultats des expériences d'injection de G. Kellenberger et al. (1959; voir III), et considérant qu'on observe une valeur moyenne de la période d'installation sur des bactéries infectées par plusieurs phages, on peut estimer qu'en moyenne les 3 ou 4 premières minutes de cette installation sont la période d'injection proprement dite, c'est-à-dire de passage de l'ADN phagique à travers la paroi bactérienne. Que représente le reste de la période d'établissement ? On pourrait imaginer que l'ADN phagique n'a pas seulement à pénétrer dans la bactérie, mais qu'une fois à l'intérieur de celle-ci il a encore à gagner une place déterminée où il se multipliera; cette place, d'après les évidences morphologiques, pourrait être dans la région du nucléoïde.

Ensuite intervient la seule différence que nous ayons pu constater entre l'ADN de  $\lambda$  et l'ADN de la bactérie. L'ADN du phage se multiplie, alors que celui de la bactérie ne semble pas le faire, ni lorsque la synthèse d'ADN phagique commence, ni quand celle de l'ADN bactérien reprend dans les cellules non infectées. Des expériences sur des bactéries en croissance active n'ont pas montré d'arrêt temporaire de la synthèse d'ADN après infection par  $\lambda$ ch (Séchaud, non publié). Mais il faut noter que la mesure de la quantité totale d'ADN telle que nous la pratiquons ne peut pas rendre compte d'un arrêt de la synthèse d'ADN bactérien causé par la multiplication même de l'ADN phagique, cette dernière étant probablement au moins aussi rapide que la première (cf. fig. 7 et 8). On peut dire cependant que la synthèse d'ADN dans des bactéries en croissance active infectées par  $\lambda$ ch est inférieure à la somme de la synthèse de l'ADN phagique mesurée dans des bactéries carencées infectées par  $\lambda$ c, et de la synthèse d'ADN bactérien qui a lieu dans les bactéries non infectées en croissance active. Si la synthèse d'ADN phagique est la même pour  $\lambda$ c et  $\lambda$ ch, il y a donc diminution de la synthèse d'ADN bactérien.

En admettant que l'ADN bactérien n'augmente pas dans les bactéries carencées infectées, on peut estimer le nombre de phages végétatifs en soustrayant de l'augmentation d'ADN mesurée la

quantité correspondant aux phages actifs intracellulaires trouvés. Il faut souligner qu'il s'agit ainsi non seulement des phages végétatifs présents dans le pool génétique, mais aussi de tous les phages qui sont en cours de maturation. On trouve une moyenne d'environ 70 unités phagiques, la valeur la plus élevée ayant été 80 à 90 unités. On ne connaît pas, dans le cas de  $\lambda$ , le nombre de phages en voie de maturation, mais par analogie avec T2 où ce nombre est au moins égal à celui des phages végétatifs dans le pool génétique (Koch et Hershey, 1959; Kellenberger, 1961), on peut dire que le pool génétique de  $\lambda$  contient entre 30 et 60 phages végétatifs.

D'une façon générale, l'ADN phagique peut être synthétisé dans une bactérie infectée à partir de deux sources: le milieu et les acides nucléiques de la bactérie. La contribution de la bactérie a été étudiée par G. Kellenberger (comm. pers.): des bactéries dont les acides nucléiques contenaient du  $P^{32}$  ont multiplié  $\lambda$  en milieu non radioactif; les phages produits emportaient certainement moins de 1% de l'ADN des bactéries. Il apparaît donc que l'ADN bactérien ne contribue pratiquement pas à l'ADN phagique; et cela apporte une évidence de plus à l'image d'un noyau bactérien figé, mais non détruit, dans une cellule où les génomes phagiques se multiplient.

Le faible nombre de croisements, caractéristique génétique de  $\lambda$ , pourrait avoir une raison topologique (Kellenberger, 1959). Comme le phage semble se multiplier dans la région nucléaire, le nucléoplasme bactérien persistant pourrait faire barrière entre les différentes accumulations d'ADN phagique dues chacune à un phage infectant, si  $\lambda$  forme un « pool d'ADN phagique » comme T2; on pourrait aussi imaginer que les génomes en multiplication se dispersent continuellement, et à nouveau le nucléoplasme bactérien les diluerait suffisamment pour qu'ils aient peu de chance de se rencontrer.

Lorsqu'on infecte les bactéries avec des multiplicités de 2 à 5 phages, on constate que chaque génome se multiplie exponentiellement. Les bactéries infectées présentent donc aux mêmes temps des nombres de génomes très différents, suivant le nombre de phages injectés. Or ces variations ne se répercutent pas sensiblement sur le rendement en phages actifs, qui tend même plutôt à diminuer lorsque la multiplicité devient forte. Cette absence de corrélation pourrait avoir deux causes: ou bien la lyse est déterminée par le nombre de génomes présents dans la bactérie, et la bactérie lyse alors à des

temps variables, lorsqu'elle contient un nombre à peu près constant de génomes et de phages finis; ou bien la lyse est fixée dans le temps indépendamment de la production de phages, et la production de protéine phagiques ou une étape ultérieure de la maturation des phages est relativement ralentie quand la synthèse d'ADN phagique augmente. La réponse à cette question, qui touche aux causes et au mécanisme de la lyse, n'est pas encore possible.

Nous avons vu que si l'on tient compte de la période d'installation du phage, on constate que l'augmentation des génomes et celle de l'ADN se superposent. Si cette constatation n'est pas une preuve, à cause de la précision relative des expériences, elle est cependant une évidence expérimentale en faveur de l'identité des génomes se multipliant et de l'ADN augmentant, ou en tout cas de leur relation directe: à un génome formé correspond en même temps la synthèse d'une unité phagique d'ADN. Il serait souhaitable de pouvoir répéter cette expérience dans des conditions où la période d'établissement est différente; la même superposition des deux courbes apporterait une confirmation de poids de la signification de cette expérience.

Lorsqu'on étudie l'établissement de la lysogénie, on constate que les phages  $\lambda c^+$  ne provoquent pas, dans les bactéries infectées, la synthèse d'ADN rapide rencontrée dans les bactéries infectées avec  $\lambda c$ . Les génomes infectants semblent stationnaires; l'augmentation de masse des bactéries et la reprise de la synthèse d'ADN bactérien sont ralenties. Le caractère  $c$ , au contraire, se manifeste par une mise en route rapide des synthèses du phage végétatif dès après la période d'installation.

La région  $c$ , à peu près au milieu du groupe de liaison génétique de  $\lambda$ , et occupant un dixième environ de la longueur de ce groupe, comporte au moins trois cistrons; des phages portant des mutations  $c$  appartenant à différents cistrons peuvent coopérer pour l'établissement de la lysogénie; d'autre part cette région comprend le gène responsable de l'immunité spécifique, ainsi que la plupart des gènes responsables de la mutation rare « virulent inducteur » (Jacob et Wollman, 1954; Kaiser, 1957).

La coopération de deux mutants  $c$  différents permettant un comportement semblable à celui de  $c^+$  ne s'explique que si le caractère  $c^+$  est responsable de la production d'une substance reliée

directement à la capacité de lysogéniser, production stoppée en divers stades par des mutations dans les différents cistrons *c*.

Il est alors tentant, en considérant les figures 7 et 8, de former l'hypothèse suivante, qui rejoint celle de Jacob et Campbell (1959): injecté dans une bactérie un phage portant le caractère  $c^+$  cause en tout premier la production d'un inhibiteur temporaire — ou l'apporte éventuellement —, inhibiteur qui interdit les synthèses du phage végétatif, et peut-être, celles de la bactérie. Pendant la période d'inhibition, le génome phagique se fixe ou non, par un mécanisme inconnu, sur le génome bactérien, la décision de se fixer dépendant du caractère  $b2^+$  du phage entre autres. L'inhibition diminuerait petit à petit et permettrait finalement dans la plupart des cas les synthèses phagiques dans les bactéries où le génome ne se fixe pas. Dans les bactéries en voie de lysogénisation, l'inhibition deviendrait l'immunité qui interdit les synthèses phagiques mais non celles de la bactérie. L'inhibiteur du début serait-il identique au suppresseur de Jacob et Campbell, responsable de l'immunité de la bactérie lysogène ? Le suppresseur permet évidemment les synthèses bactériennes; une tentative de déterminer si l'inhibiteur postulé arrête la synthèse de l'ADN bactérien dans des bactéries en croissance active infectées par  $\lambda c^+$  n'a pas fourni de réponse, la proportion de bactéries lysogénisées étant trop faible dans ces conditions. L'inhibiteur ne serait-il pas plutôt différent, et modifié en la substance immunité par l'interaction du caractère  $c^+$  et de son homologue sur le chromosome bactérien lors de la fixation ? La baisse de l'inhibition, qui permettrait la réponse lytique quand il n'y a pas lysogénisation, pourrait-elle être due à la synthèse d'un contre-inhibiteur dirigée par exemple par le locus bactérien *Lp* (localisation de  $\lambda$ ) ? Ces questions sont actuellement sans réponse. On peut cependant noter que si le schéma proposé correspondait à la réalité, il y aurait deux façons principales d'influencer la fréquence de lysogénisation: en produisant plus d'inhibiteur et là la multiplicité d'infection pourrait jouer un rôle, et en ralentissant ou supprimant la baisse de l'inhibition; les effets d'une température abaissée (Lieb, 1953), ceux du chloramphénicol ou d'autres inhibiteurs de la synthèse de protéine (Christensen, 1957; L. E. Bertani, 1957, sur d'autres phages tempérés que  $\lambda$ ) pourraient être dus à une action sur la baisse de l'inhibition.

## PLANCHE 1.

*Figures a-f.* Bactéries *S* cultivées en tryptone jusqu'à  $2,5 \cdot 10^8$  bact./ml et infectées par  $\lambda$ ch (m. d'i. = 3). Préparations observées en contraste de phase. Grossissement  $3500 \times$ .

*a:* bactéries non infectées.

*b-f:* bactéries infectées, fixées 5 minutes (*b*), 10 minutes (*c*), 15 minutes (*d*), 20 minutes (*e*) et 27 minutes (*f*) après infection.

*Figure g.* *E. coli* S en croissance active (environ  $2,5 \cdot 10^8$  bact./ml) infectées par  $\lambda$ ch à une multiplicité de 3 et surinfectées à 14 minutes par T2 (m. d'i. = 4). Bactéries fixées à 20 minutes. Observation globale au microscope électronique; grossissement  $3500 \times$ .

## PLANCHE 2.

*E. coli* S cultivées en tryptone jusqu'à  $2,5 \cdot 10^8$  bact./ml et infectées par  $\lambda$ ch (m. d'i. = 4). Inclusion au Vestopal W. Grossissement  $34.000 \times$ .

*a:* bactérie témoin non infectée.

*b-e:* bactéries infectées fixées 7 minutes (*b*), 15 minutes (*c*), 25 minutes (*d*) et 35 minutes (*e*) après l'infection.

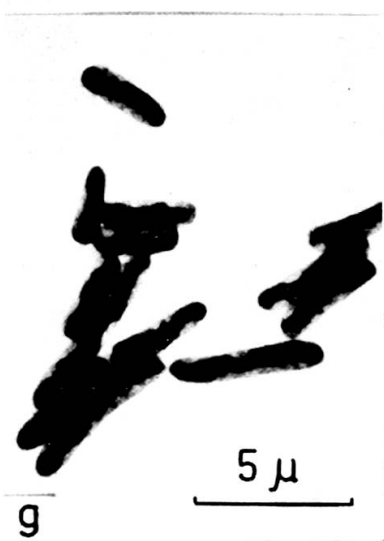
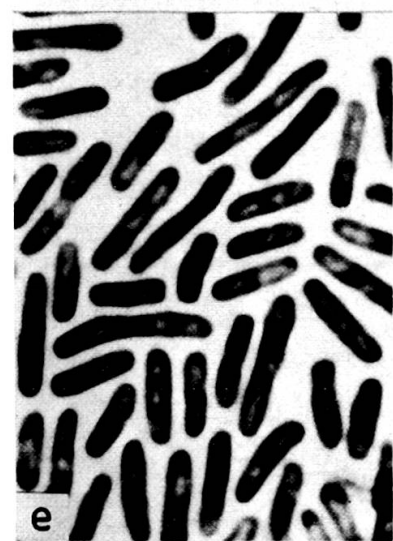
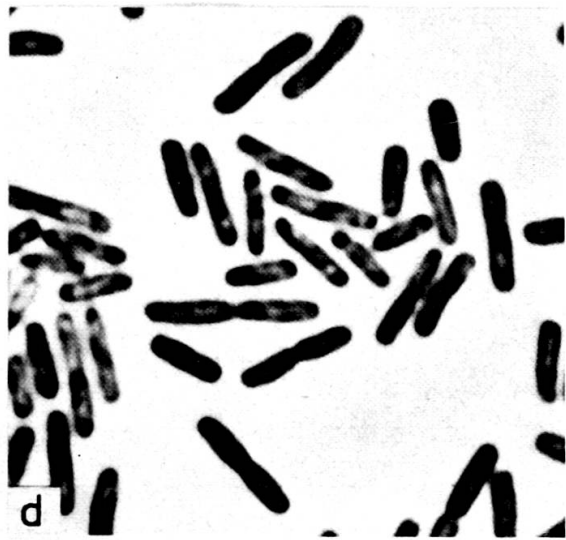
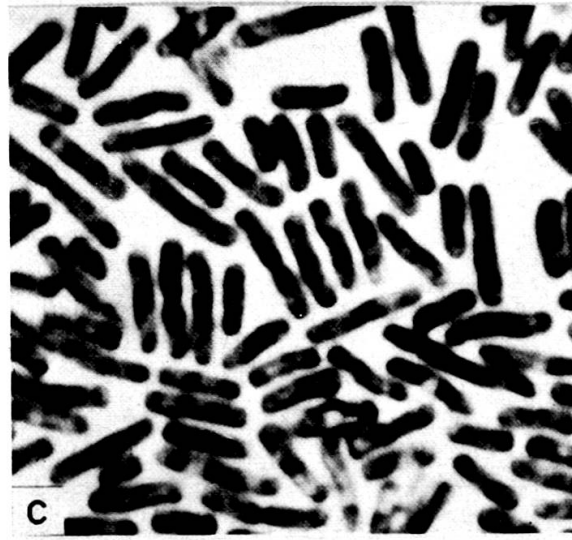
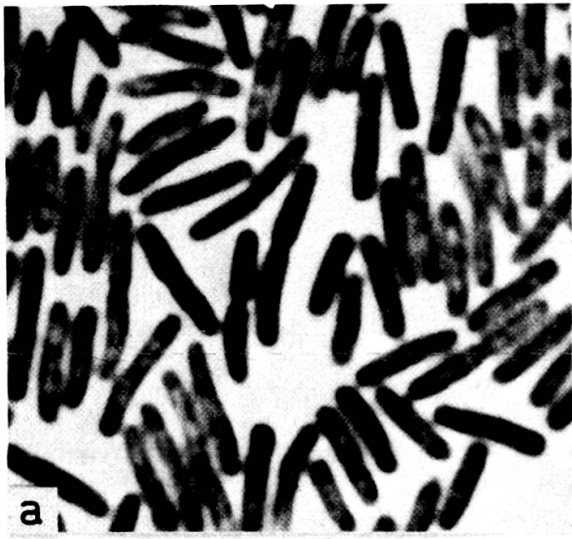
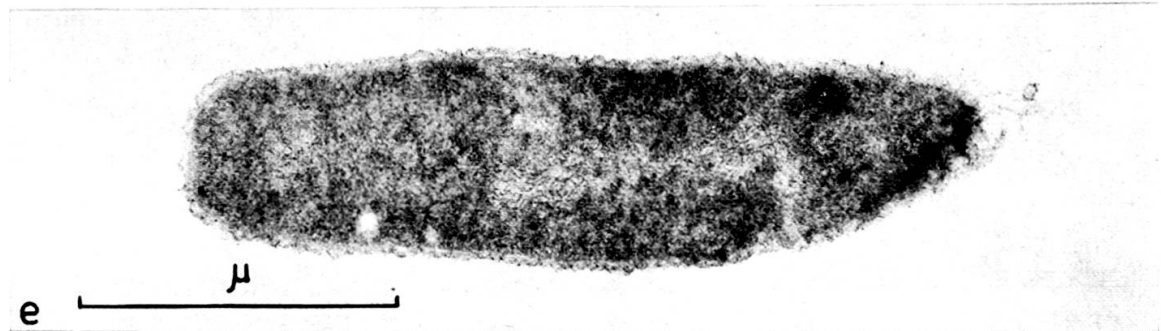
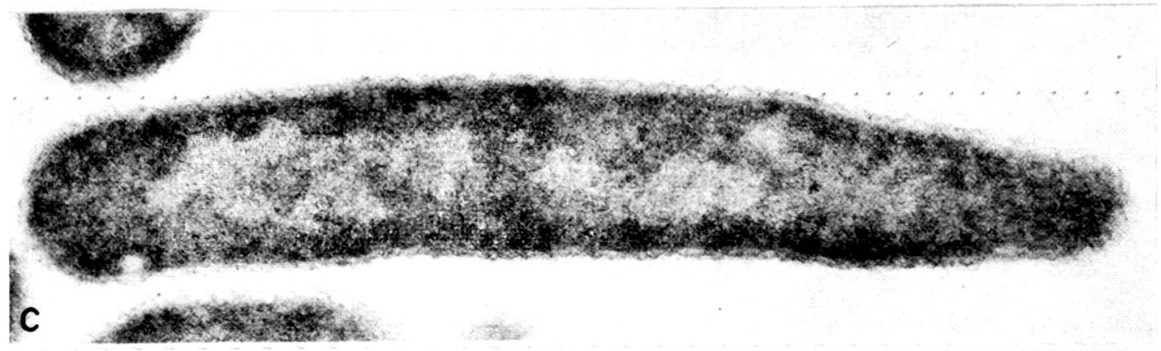
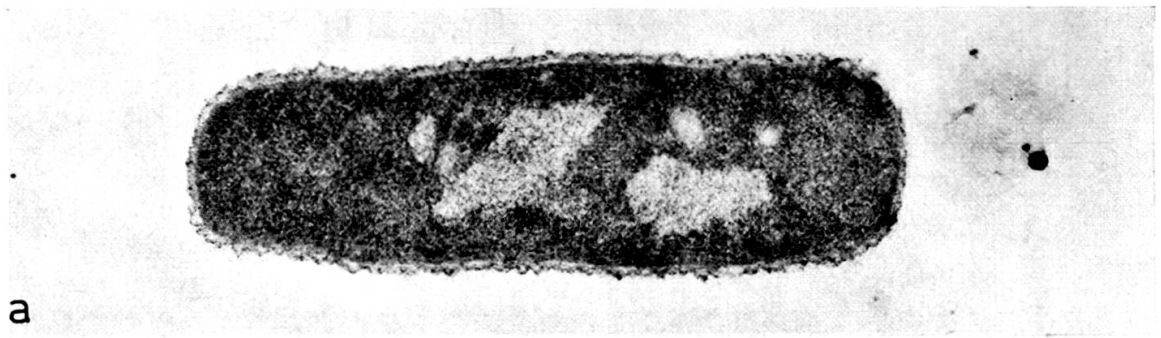


PLANCHE 2



## BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, M. H., Bacteriophages. *Interscience Publ. Inc.*, New York (1959).
- ANDERSON, E. S., J. A. ARMSTRONG et J. S. F. NIVEN, Fluorescence microscopy: observation of virus growth with aminoacridines. Dans *Virus Growth and Variation* (Society for general Microbiology, ed.), pp. 224-255, University Press, Cambridge (1959).
- ANDERSON, T. F. et A. H. DOERMANN, The intracellular growth of bacteriophages. II. The growth of T3 studied by sonic disintegration and by T6-cyanide lysis of infected cells. *J. gen. Physiol.*, *35*, 657-667 (1952).
- 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).
- , J. F. MCGREGOR et 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., Transduction des caractères Gal par le bactériophage lambda. *Arch. Sci. (Genève)*, *11*, 259-338 (1958).
- , G. KELLENBERGER et J. WEIGLE, La défektivité du phage lambda transducteur. *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, *20*, 659-663 (1957).
- BERTANI, G., Lysogeny. Dans *Advances in Virus Research* (K. M. Smith and M. A. Lauffer, ed.), Acad. Press Inc. New York, *5*, 151-193 (1958).
- BERTANI, L. E., The effect of the inhibition of protein synthesis on the establishment of lysogeny. *Virology*, *4*, 53-71 (1957).
- BURTON, K., The relation between the synthesis of deoxyribonucleic acid and the synthesis of protein in the multiplication of bacteriophage T2. *Biochem. J.*, *61*, 473-483 (1955).
- BURTON, K., A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, *62*, 315-323 (1956).
- CHRISTENSEN, J. E., Effect of chloramphenicol on lysogenization by temperate phage P1. *Virology*, *4*, 184-185 (1957).
- COHEN, S. S., The synthesis of bacterial viruses. I. The synthesis of nucleic acid and protein in *Escherichia coli* B infected with T2r<sup>+</sup> bacteriophage. *J. Biol. Chem.*, *174*, 281-293 (1948).
- COLOBERT, L., Destruction par le lysozyme, après délipidation de la paroi externe de Salmonelles pathogènes. *Compt. rend.*, *245*, 1674-1676 (1957).
- DELBRÜCK, M. et G. S. STENT, On the mechanism of DNA replication. Dans *The Chemical Basis of Heredity* (W. D. McElroy and B. Glass, ed.), pp. 699-736. The John Hopkins Press, Baltimore (1957).
- DE MARS, R. I., The production of phage-related materials when phage development is interrupted by proflavine. *Virology*, *1*, 83-99 (1955).
- FRENCH, R. C., S. M. LESLEY, A. F. GRAHAM et C. E. VAN ROOYEN, Studies on the relationship between virus and host cell. III. The breakdown of p<sup>32</sup> labelled T2r<sup>+</sup> bacteriophage adsorbed to *E. coli* previously infected by other coliphages of the T group. *Can. J. Med. Sci.*, *29*, 144-148 (1951).

- FRY, B. A., Conditions for the infection of *Escherichia coli* with lambda phage and for the establishment of lysogeny. *J. gen. Microbiol.*, **21**, 676-684 (1959).
- et F. GROS, The metabolic activities of *Escherichia coli* during the establishment of lysogeny. *J. gen. Microbiol.*, **21**, 685-692 (1959).
- HERSHEY, A. D., Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. II. Phage precursor nucleic acid. *J. gen. Physiol.*, **37**, 1-23 (1953).
- Chemistry and viral growth. Dans *Currents in Biochemical Research* (D. E. Green, ed.), pp. 1-28, Interscience, New York (1956).
- HERSHEY, A. D. et E. BURGI, Genetic significance of the transfer of nucleic acid from parental to offspring phage. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **21**, 91-101 (1956).
- et M. CHASE, Independant functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. gen. Physiol.*, **36**, 39-56 (1952).
- , J. DIXON et M. CHASE, Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. I. Purine and pyrimidine composition. *J. gen. Physiol.*, **36**, 777-789 (1953).
- et N. MELECHEN, Synthesis of phage-precursor nucleic acid in the presence of chloramphenicol. *Virology*, **3**, 207-236 (1957).
- HOTCHIN, J. E., I. M. DAWSON et W. J. ELFORD, The use of empty bacterial membranes in the study of the adsorption of *Staphylococcus* K phage upon its host. *Brit. J. exptl Pathol.*, **33**, 177-182 (1952).
- JACOB, F. et A. CAMPBELL, Sur le système de répression assurant l'immunité chez les bactéries lysogènes. *Compt. rend.*, **248**, 3219-3221 (1959).
- et E. L. WOLLMAN, Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*Escherichia coli*. I. Le système génétique du bactériophage  $\lambda$ . *Ann. Inst. Pasteur*, **87**, 653-673 (1954).
- et E. L. WOLLMAN, Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*Escherichia coli*. III. Effet du rayonnement ultraviolet sur la recombinaison génétique. *Ann. Inst. Pasteur*, **88**, 724-749 (1955).
- et E. L. WOLLMAN, Recherches sur les bactéries lysogènes défectives. I. Déterminisme génétique de la morphogenèse chez un bactériophage tempéré. *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, 282-302 (1956).
- JESAITIS, M. A., Differences in the chemical composition of the phage nucleic acids. *Nature*, **178**, 637 (1956).
- KAISER, A. D., A genetic study of the temperate coliphage  $\lambda$ . *Virology*, **1**, 424-443 (1955).
- Mutations in a temperate bacteriophage affecting its ability to lysogenize *Escherichia coli*. *Virology*, **3**, 42-61 (1957).
- et D. S. HOGNESS, The transformation of *Escherichia coli* with desoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage  $\lambda$ dg. *J. Mol. Biol.*, **2**, 392-415 (1960).
- KANAZIR, D. et M. ERRERA, Métabolisme des acides nucléiques chez *E. coli* B après irradiation ultraviolette. *Biochim. et Biophys. Acta*, **14**, 62-66 (1954).
- KELLENBERGER, E., Les formes caractéristiques des nucléoïdes de *E. coli* et leurs transformations dues à l'action d'agents mutagènes-inducteurs et de bactériophages. Dans *Symposium on bacterial cytology*, pp. 45-66, 6th Intern. Congr. Microbiol., Rome (1953).

- KELLENBERGER, E., Ultramikrotom mit mechanischem Vorschub. *Experientia*, **12**, 282-284 (1956).
- Growth of bacteriophage. Dans *Virus Growth and Variation* (Society for general Microbiology, ed.), pp. 11-33. University Press, Cambridge (1959).
- Vegetative bacteriophage and the maturation of the virus particles. Dans *Advances in Virus Research* (sous presse).
- et J. SÉCHAUD, Electron microscopical studies of phage multiplication. II. Production of phage-related structures during multiplication of phages T2 and T4. *Virology*, **3**, 256-274 (1957).
- , J. SÉCHAUD et A. RYTER, Electron microscopical studies of phage multiplication. IV. The establishment of the DNA pool of vegetative phage and the maturation of phage particles. *Virology*, **8**, 478-498 (1959).
- KELLENBERGER, G., W. ARBER et E. KELLENBERGER, Eigenschaften UV-bestrahlter  $\lambda$ -Phagen. *Z. Naturforschg.*, **14b**, 615-629 (1959).
- , M. L. ZICHICHI et J. WEIGLE, Mutations affecting the density of bacteriophage  $\lambda$ . *Nature*, **187**, 161-162 (1960).
- , M. L. ZICHICHI et J. WEIGLE, A mutation affecting the DNA content of bacteriophage  $\lambda$  and its lysogenizing properties (en préparation).
- KELNER, A., Growth, respiration and nucleic acid synthesis in ultraviolet-irradiated and in photoreactivated *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **65**, 252-262 (1953).
- KJELDGAARD, N. O., O. MAALØE et M. SCHAECHTER, The transition between different physiological states during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. gen. Microbiol.*, **19**, 607-616 (1958).
- KOCH, G. et A. D. HERSHEY, Synthesis of phage-precursor protein in bacteria infected with T2. *J. Mol. Biol.*, **1**, 260-276 (1959).
- KOHN, A., Lysis of frozen and thawed cells of *Escherichia coli* by lysozyme and their conversion into spheroplasts. *J. Bacteriol.*, **79**, 697-706 (1960).
- LIEB, M., The establishment of lysogenicity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **65**, 642-651 (1953).
- LURIA, S. E. et M. L. HUMAN, Chromatin staining of bacteria during bacteriophage infection. *J. Bacteriol.*, **59**, 551-560 (1950).
- MACHEBŒUF, M. et J. DELSAL, Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans des matières organiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **25**, 116-120 (1943).
- MESELSON, M., F. W. STAHL et J. VINOGRAD, Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **43**, 581-588 (1957).
- MORSE, M. L., E. M. LEDERBERG et J. LEDERBERG, Transduction in *Escherichia coli* K12. *Genetics*, **41**, 142-156 (1956).
- RYTER, A. et E. KELLENBERGER, L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomie. *J. Ultrastructure Research*, **2**, 200-214 (1958a).
- et E. KELLENBERGER, Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. I. Les nucléoïdes des bactéries en croissance active. *Z. Naturforschg.*, **13b**, 597-605 (1958b).
- SAGIK, B. P., A specific reversible inhibition of bacteriophage T2. *J. Bacteriol.*, **68**, 430-436 (1954).

- SCHAECHTER, M., O. MALLØE et N. O. KJELDGAARD, Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. gen. Microbiol.*, *19*, 592-606 (1958).
- SÉCHAUD, J. et E. KELLENBERGER, Lyse précoce, provoquée par le chloroforme chez les bactéries infectées par du bactériophage. *Ann. Inst. Pasteur*, *90*, 102-106 (1956).
- SINSHEIMER, R. L., The glucose content of the deoxyribonucleic acids of certain bacteriophages. *Proc. Natl Acad. Sci.*, *42*, 502-504 (1956).
- STENT, G. S., Mating in the reproduction of bacterial viruses. Dans *Advances in Virus Research*, *5*, 95-149 (1958).
- THOMAS, R., Effects of chloramphenicol on genetic replication in bacteriophage  $\lambda$ . *Virology*, *9*, 274-289 (1959).
- TOMIZAWA, J. et S. SUNAKAWA, The effect of chloramphenicol on deoxyribonucleic acid synthesis and the development of resistance to ultraviolet irradiation in *E. coli* infected with bacteriophage T2. *J. gen. Physiol.*, *39*, 553-565 (1956).
- VIDAVER, G. A. et L. M. KOZLOFF, The rate of synthesis of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* B infected with T2<sup>r+</sup> bacteriophage. *J. Biol. Chem.*, *225*, 335-347 (1957).
- VISCONTI, N. et M. DELBRÜCK, The mechanism of genetic recombination in phage. *Genetics*, *38*, 5-33 (1953).
- VOLKIN, E., The linkage of glucose in coliphage nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, *76*, 5892-5893 (1954).
- WATANABE, I., Formation of non-phage-antigenic protein in *E. coli* infected with T2 phage. *Biochim. et Biophys. Acta*, *25*, 665-666 (1957).
- WEIGLE, J. et M. DELBRUCK, Mutual exclusion between an infecting phage and a carried phage. *J. Bacteriol.*, *62*, 301-318 (1951).
- WHITFIELD, J. F. et R. K. APPELYARD, Formation of the vegetative pool by induced defective and healthy lysogenic strains of *Escherichia coli*. *J. gen. Microbiol.*, *17*, 453-466 (1957).
- WOLLMAN, E. L. et F. JACOB, Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*Escherichia coli*. II. Mécanisme de la recombinaison génétique. *Ann. Inst. Pasteur*, *87*, 674-691 (1954).
- WYATT, G. R. et S. S. COHEN, A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids. *Nature*, *170*, 1072-1073 (1952).
-