

ÉTUDE DE L'ACTION DES MEMBRANES DU BACTÉRIOPHAGE T₂ SUR *ESCHERICHIA COLI**

par

V. BONIFAS ET E. KELLENBERGER

Institut d'Hygiène et Institut de Physique, Université de Genève (Suisse)

INTRODUCTION

Le choc osmotique, provoqué par la dilution rapide de bactériophages T₂ en suspension dans une solution saline concentrée, sépare deux constituants de ce virus: La membrane et son contenu^{1,2,3}. Une certaine proportion des membranes, qu'à l'instar des auteurs américains nous appellerons des *killers*, sont capables de tuer les bactéries.

Dans ce travail, nous avons mesuré le nombre de membranes nécessaires pour tuer une bactérie, la vitesse d'adsorption des *killers* et étudié l'effet produit par cette adsorption sur les nucléoides bactériens.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le phage T_{2r+} provient d'un stock obtenu par lyse d'une culture de *E. coli* B en bouillon, centrifugé à 25,000 g pendant 30 minutes, lavé deux fois dans un tampon isotonique (NaCl 0.4%, KH₂PO₄ 0.3%, Na₂HPO₄ 0.7%, MgSO₄ 0.02%) et resuspendu dans ce même tampon. Le titre était, au début, de $5 \cdot 10^{12}$; il est monté, en six mois, à $9 \cdot 10^{12}$.

Le membranes ont été obtenues par la méthode décrite par ANDERSON¹: 0.1 ml du stock de T₂ est dilué dans une solution 5 M de chlorure de sodium. Après 45 minutes, un aliquot de cette dilution est placé dans un tube où l'on verse 10 ml d'eau distillée.

E. coli B est cultivé en milieu liquide aéré (Tryptone "Difco" 1%, NaCl 0.5%). Pour obtenir des bactéries carencées, nous avons centrifugé la culture ($5 \cdot 10^8$ B/ml) après l'avoir refroidie à 0° C, lavée deux fois en tampon et aérée en tampon pendant 2 heures à 37° C.

La numération bactérienne avant l'adsorption a été faite au moyen d'un hémocytomètre modifié⁴.

Les techniques relatives aux bactériophages et aux numérations sont celles qu'ADAMS a décrites⁵.

Pour l'observation des nucléoides, nous nous sommes servis du microscope électronique en utilisant la technique décrite par l'un de nous⁶. Les nucléoides apparaissent en clair sur le fond sombre du corps bactérien.

Pour l'observation des suspensions de membranes, nous avons utilisé la technique de flottation sur nitrate de Lanthane à 2% dans l'eau, qui évite le passage de l'eau à la face supérieure du collodion. Cette même méthode permet leur comptage en présence du latex de polystyrène^{**}. L'ombrage est fait au moyen d'un alliage Au-Pt-Pd.

Certaines préparations ont été faites par la méthode de "freeze-drying" décrite par WILLIAMS¹⁰.

EXPÉRIENCES

1. Adsorption des membranes de T₂, observée au microscope électronique.

A deux aliquots de 1 ml d'une suspension de membranes, on ajoute respectivement 1 ml de tampon et 1 ml d'une suspension dense de bactéries ($5 \cdot 10^9$ B/ml) de façon à

* Ce travail a été exécuté grâce à une subvention accordée par la Fondation Fritz Hoffmann ... La Roche pour l'expansion en Suisse du travail scientifique exécuté par équipes.

** Echantillon gracieusement remis par Dow Chemical Company, Midland (Mich.) USA.

éviter les multiplicités élevées qui produisent la lyse par l'extérieur. On place à 37°C pendant 10 minutes, on centrifuge à 5,000 g pendant 10 minutes, on ajoute une quantité déterminée de latex à un aliquot de chaque suspension surnageante et on prépare pour le comptage au microscope électronique. Pour chaque suspension, nous avons compté les membranes et les boules de latex sur 10 micrographies. Les résultats figurent au Tableau I.

TABLEAU I

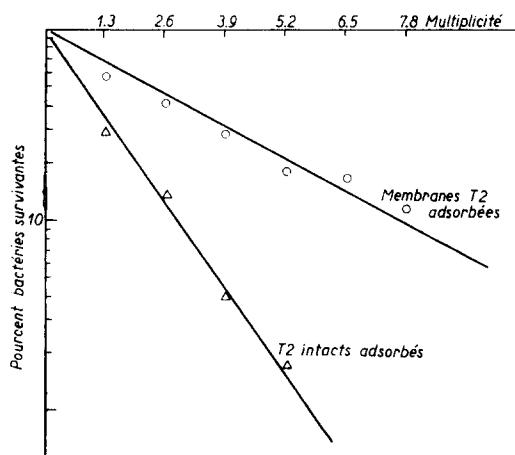
	Comptage		Calcul membranes/ml
	latex	membranes	
Sans adsorption	78	1200	$6 \cdot 10^{10}$
Après adsorption	81	6	$3 \cdot 10^8$

D'après le nombre de phages qui ont subi le choc osmotique, il devrait se trouver $8 \cdot 10^{10}$ membranes/ml dans la solution. Le comptage au microscope électronique donne $6 \cdot 10^{10}$, valeur satisfaisante si l'on tient compte de la précision de $\pm 30\%$ de la méthode⁸. Après adsorption, la concentration des membranes n'est plus que de $5 \cdot 10^{-3}$ de la valeur initiale. Malgré les erreurs d'échantillonage et de comptage on peut assurer qu'au moins 99% des membranes ont été adsorbées.

2. Nombre de membranes de T2 nécessaires pour tuer une bactérie.

Lorsqu'on adsorbe des membranes de T2 sur des bactéries, un certain nombre de celles-ci sont tuées. Pour savoir si une fraction seulement des membranes sont actives comme *killer*, ou si toutes le sont, nous avons mesuré la survie des bactéries en fonction de la multiplicité des membranes. Comme contrôle, nous avons aussi mesuré la survie des bactéries ayant adsorbé sur T2 intact. Les résultats sont représentés dans la Fig. 1.

Fig. 1. Survie de *E. coli* B en fonction de la multiplicité de T2 ou de membranes de T2. On prépare une suspension de membranes et une dilution de T2 en tampon, ayant la même concentration. A une série de dilutions de ces suspensions on ajoute une même quantité de B carencé. On laisse adsorber 30 minutes à 37°C et on mesure la survie des bactéries. Nous avons inscrit les résultats de ces mesures sur le graphique qui comporte, en ordonnées, le logarithme de la proportion des bactéries survivantes et, en abscisses, les concentrations des membranes ou de T2 (mesurées par les dilutions).



On voit que les deux courbes sont du type "single-hit", d'où l'on conclut qu'une seule particule de T2 et qu'une seule membrane est suffisante pour tuer une bactérie. Mais toutes les membranes ne sont pas des *killers*: la différence de pente entre les deux courbes montre qu'il y a un *killer* pour 2.7 phages ayant subi le choc osmotique. Diffé-

rentes préparations de membranes se comportent différemment. La proportion de T₂ survivants au choc a varié entre 0,5 à 10 pour mille, mais, le plus souvent, elle est de 1 à 2 pour mille. La proportion des *killers* a varié entre 1 *killer* pour 1,5 membranes et 1 *killer* pour 5 membranes. Le plus souvent on obtient 1 *killer* pour 2 ou 3 membranes.

3. Vitesse d'adsorption des membranes-killers

La vitesse d'adsorption des *killers* peut être déterminée à l'aide de la courbe de survie des bactéries en fonction du temps.

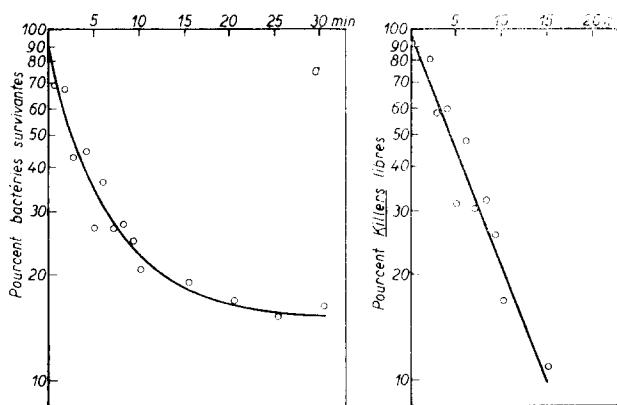


Fig. 2. (a) Survie des bactéries en fonction du temps. (b) Killers libres en fonction du temps. 0,5 ml d'une suspension de membranes de T₂ dans du tampon sont ajoutés à 2 ml de B carencé (concentration finale = $1.3 \cdot 10^8$ B/ml). À des temps déterminés, 0,1 ml du mélange est dilué 100 fois en tampon pour arrêter l'adsorption, puis des aliquots de dilutions convenables sont étalés sur agar pour compter les bactéries survivantes. La Fig. 2(a) montre, en abscisses, le temps, en ordonnées, le logarithme de la survie des bactéries, en pourcent. La Fig. 2(b) montre le logarithme du pourcentage de killers libres (en ordonnées) en fonction du temps (en abscisses).

La Fig. 2(a) montre la survie des bactéries en échelle semilogarithmique en fonction du temps. On voit que pour des valeurs élevées de t , la proportion des bactéries survivantes tend vers une valeur constante b . On peut supposer que cela est dû au fait que les *killers* ont tous été adsorbés. Comme l'expérience précédente l'a montré, un *killer* adsorbé est suffisant pour tuer la bactérie. On peut donc appliquer la loi de Poisson, qui donne pour la proportion b des cellules n'ayant pas adsorbé de *killer*

$$b = e^{-m_0} = e^{-\frac{n_0}{B}}$$

n_0 étant le nombre initial des *killers*, B le nombre des bactéries et m_0 la multiplicité en *killers* à $t = \infty$. La mesure de b permet donc de calculer m_0 et, connaissant B , d'en déduire n_0 . Pour chaque point expérimental de la Fig. 2a, on peut calculer de cette façon la valeur de la multiplicité en *killers* et donc le nombre de *killers* adsorbés au temps t . Il est alors facile, connaissant n_0 , d'en déduire la proportion des *killers* libres en fonction du temps. On voit que les points expérimentaux déterminent une droite. On peut donc écrire

$$n = n_0 \cdot e^{-kBt}$$

d'où l'on tire pour k la valeur $1.43 \cdot 10^{-9}$ ml/min. Cette valeur de la constante d'adsorption est du même ordre de grandeur que celle que l'on trouve pour T₂ intact⁹. Les *killers* s'adsorbent donc sur les bactéries avec une vitesse sensiblement égale à celle avec laquelle les particules de T₂ intactes le font.

4. Stabilité des *killers*

(a) A + 3° C. Une suspension de membranes de T₂, conservée à + 3° C, adsorbée sur B carencé au cours de la conservation, a montré les concentrations en *killers* suivantes:

Jours	1	3	4	6	10
Nombre de <i>killers</i> $\times 10^9/\text{ml}$	2.4	2.5	2.5	1.8	1.8

Il paraît donc possible de conserver une suspension de membranes à froid pendant quelques jours sans variation appréciable du nombre des *killers*.

(b) A 37°C , et en présence de désoxyribonucléase

L'examen des micrographies électroniques de suspensions de membranes de T2 révèle l'existence d'un réseau de fibres d'acide désoxyribonucléique (DNA) provenant des phages (Fig. 11). Un certain nombre de membranes semblent, en outre, contenir des granules.

On pourrait donc penser que les *killers* sont les membranes qui contiennent encore du DNA, ou encore que le réseau de DNA maintient en amas certaines membranes, ce qui pourrait expliquer que le nombre des *killers* soit inférieur au nombre des membranes.

TABLEAU II

Temps	Sans DNAase			Avec DNAase			Témoin B nombre de colonies
	nombre de colonies	% survie	\bar{m}	nombre de colonies	% survie	\bar{m}	
0'	565	25	1.4				2300
30'	647	28	1.3	652	28	1.3	2320
60'	814	35	1	865	37	1	2180
90'				900	39	0.9	2650

Nous avons ajouté de la désoxyribonucléase (DNAase)* à une suspension de membranes de T2 à 37°C . A des moments déterminés, nous avons ajouté 0.1 ml de cette suspension à 0.9 ml de B carencé. Après 15 minutes d'adsorption, nous avons dilué et étalé sur agar pour compter les bactéries survivantes. Comme contrôles, nous avons adsorbé aux mêmes moments des membranes conservées à 37°C sans DNAase; de plus, nous avons mesuré comment, à cette température, B carencé se maintenait pendant l'expérience.

La première colonne montre que, même sans DNAase, le nombre des *killers* diminue lentement à 37°C . La présence de DNAase n'a aucun effet sur l'activité et sur le nombre des *killers*. Ceci confirme les résultats de HERRIOTT³, qui a observé que la DNAase ne modifiait pas l'activité lytique des membranes de T2 sur *E. coli* B. Les *killers* ne sont donc pas les membranes qui contiennent encore du DNA et ils ne sont pas en nombre inférieur à celui des membranes à cause du réseau de DNA qui les retiendrait en amas.

5. *Effet de l'adsorption des membranes de T2 sur les nucléoides de E. coli B.*

Normalement, *E. coli* B présente des nucléoides du type "chromosomique" décrit entre autres par ROBINOW¹¹. KELLENBERGER⁶ les a étudiés au microscope électronique (Fig. 5). Lorsque *E. coli* adsorbe du phage T2, les nucléoides subissent une transformation très caractéristique décrite par LURIA ET HUMAN¹² et par MURRAY, GILLEN ET HEAGY¹³ (Figs. 3 et 4).

* Un peu de poudre prélevée à l'anse de platine est dissoute dans la suspension: la viscosité diminue en quelques secondes à la température de la chambre.

Lorsque *E. coli* adsorbe des membranes de T2, les nucléoides prennent un aspect tout à fait différent de celui qui est dû au phage intact: les noyaux occupent une plage diffuse au centre de la cellule ou bien prennent une forme vésiculaire (Figs. 6, 7 et 8).

Les expériences, dans lesquelles des multiplicités croissantes de membranes T2 ont été adsorbées sur *E. coli*, ne nous ont pas permis d'établir une relation entre le nombre de *killers* et la transformation des nucléoides. En effet, le nombre des bactéries présentant des nucléoides normaux est toujours inférieur à celui des bactéries survivantes, mais il est fréquemment plus élevé que celui des bactéries qui n'ont adsorbé aucune membrane.

Cela indiquerait que les membranes incapables de tuer les bactéries appartiennent à deux catégories: les unes n'agissent apparemment pas sur les nucléoides, tandis que les autres le font.

La transformation observée, sous l'action des membranes de T2, n'est pas spécifique. La forme vésiculaire s'observe aussi sous l'action d'antibiotiques du groupe de l'auréomycine^{6,14}, tandis que la forme diffuse résulte d'un arrêt du métabolisme.

6. Surinfection, par T2 intact, de bactéries ayant adsorbé des membranes de T2.

Si l'on adsorbe, en bouillon, pendant 15 minutes, des membranes de T2 sur des bactéries, on observe la transformation diffuse ou vésiculaire des nucléoides. Si on surinfecte ces bactéries par du T2 intact, on n'observe pas la transformation nucléaire caractéristique de T2, mais, au contraire, les noyaux conservent l'aspect qu'ils avaient pris lors de l'adsorption des membranes vides. En effet, les bactéries atteintes au moins 5 minutes auparavant par des *killers*, ne multiplient plus le phage T2 surinfectant. Par contre, une lyse par l'extérieur se produit facilement, d'autant plus importante que la multiplicité des membranes était plus élevée. Il est facile d'observer cette lyse par turbidimétrie ou par le microscope électronique (Figs. 9 et 10).

DISCUSSION

Les observations au microscope électronique décrites ci-dessus ont montré que 99% des membranes de T2 s'adsorbent sur les bactéries sensibles. Par contre, FRENCH *et al.*⁹ ont observé que, lorsque l'on adsorbe des membranes marquées par ³⁵S sur des bactéries, on retrouve 25% de l'isotope dans le liquide surnageant après centrifugation. Ces auteurs ont donc pensé que 25% des membranes ne s'adsorbaient pas. La contradiction entre nos observations et celles de FRENCH pourraient s'expliquer par l'existence d'un constituant du phage, qui contiendrait ³⁵S et qui, se détachant de certaines membranes au moment du choc osmotique, resterait dans le liquide surnageant: les membranes restées complètes pourraient être des *killers*. On pourrait aussi imaginer qu'une partie des protéines de la membrane T2 entreraient dans les bactéries; lors de la lyse d'une partie des bactéries infectées, ces matières protéïniques seraient libérées dans le milieu.

La mesure de l'effet de l'adsorption des membranes sur la survie des bactéries montre qu'une partie seulement des membranes sont des *killers*. L'allure de la courbe de survie en fonction de la multiplicité suggère un effet "one-hit", un *killer* étant suffisant pour tuer la bactérie sur laquelle il s'est adsorbé. Toutefois, nos expériences n'excluent pas la possibilité qu'une petite proportion des membranes soient capables de tuer lorsque deux ou plus d'entre elles sont adsorbées sur une bactérie.

L'effet des membranes sur les nucléoides des bactéries n'est pas spécifique (la forme

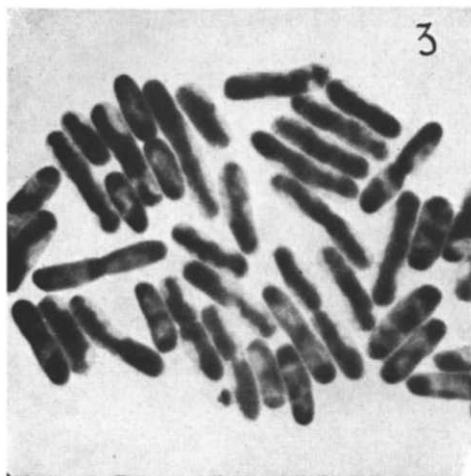


Fig. 3. *E. coli* B infecté par T2 ($m = 10$, 25 min à 37°C), montrant les vacuoles marginales caractéristiques ($5000 \times$).



Fig. 4. Même sujet que Fig. 3, mais photographié au microscope ordinaire après hydrolyse et coloration au Giemsa ($5000 \times$).

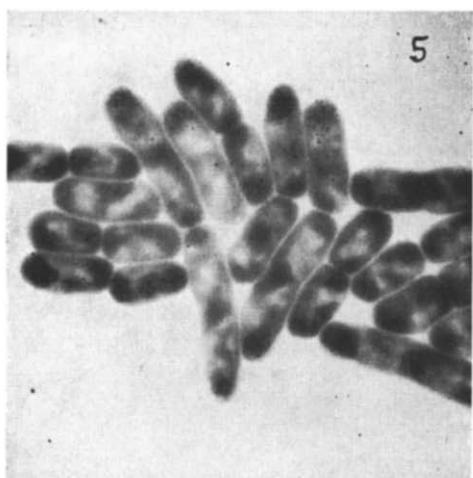


Fig. 5. *E. coli* B pendant la phase exponentielle de croissance, montrant la forme "chromosomal" des nucléoïdes ($7000 \times$).

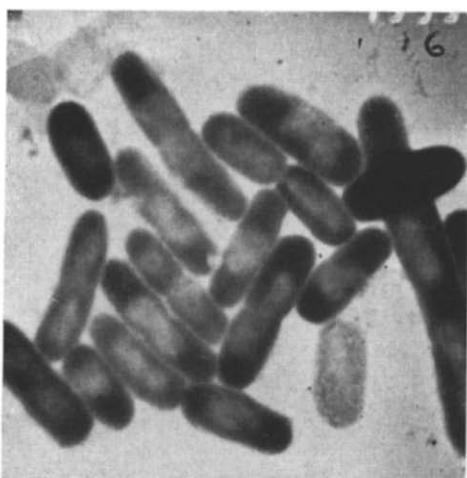


Fig. 6. *E. coli* infecté par des membranes de T2 ($\bar{m} = 15$, soit 5 *killers* par bactérie) depuis 40 minutes à 25°C . On voit les deux formes que peuvent prendre les nucléoïdes: diffuse ou vésiculaire. On voit aussi quelques rares lyses ($7000 \times$).

vésiculaire s'observe sous l'action de l'auréomycine entre autres, la forme diffuse résulte d'un arrêt du métabolisme). On constate que beaucoup de bactéries survivantes présentent un noyau modifié. Par ailleurs, FRENCH *et al.*⁹, mesurant la respiration de bactéries infectées par une forte multiplicité de membranes de T2, ont constaté que la respiration était bloquée immédiatement après l'adsorption pour une durée de 20 à 80 minutes. Ce blocage affecte toutes les bactéries qui ont reçu des membranes. Les membranes inactives comme *killers* exercent donc un effet physiologique réversible, qui est visible au niveau du nucléoïde dans nos expériences. Nous ne savons pas, toutefois

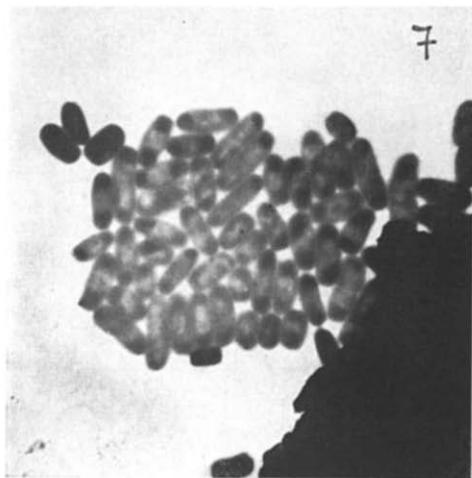


Fig. 7. *E. coli* B infecté par des membranes de T2 ($m = 1.2$, soit 0.3 killer par bactérie) depuis 25 minutes à 25°C . On voit qu'il peut être difficile de distinguer les cellules qui n'ont pas été infectées des cellules qui n'ont pas reçu de killers (5000 \times).

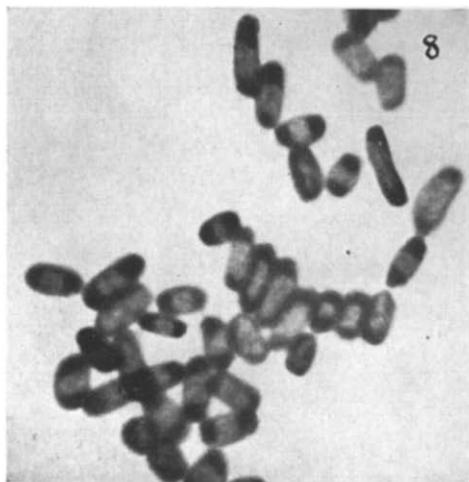


Fig. 8. *E. coli* B infecté par des membranes de T2 ($m = 2.4$, soit 0.6 killer par bactérie). Après 25 minutes à 25°C , on ne voit plus que quelques cellules normales, les autres montrant un nucléoïde vésiculaire ou diffus (5000 \times).

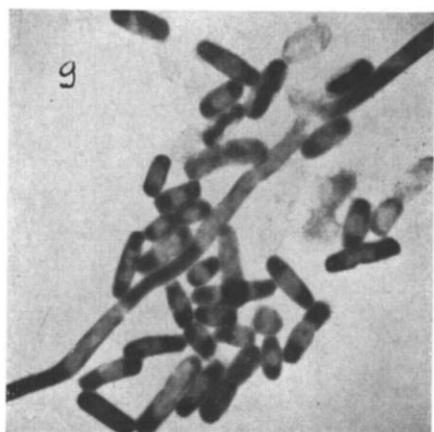


Fig. 9. Surinfection de *E. coli* B (infecté 15 minutes auparavant par 2.4 membranes de T2, en moyenne) par T2 intact ($m = 4$). Après 30 minutes à 25°C , on voit 4 cellules qui montrent les vacuoles marginales caractéristiques de l'infection par T2; les autres cellules ont un nucléoïde de forme vésiculaire ou diffuse. Si seuls les killers excluaient T2 intact, on devrait observer les vacuoles marginales dans 55%, des cellules (5000 \times).

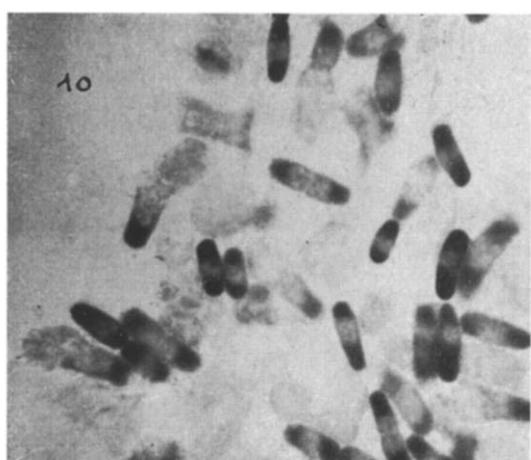


Fig. 10. *E. coli* B, infecté d'abord avec des membranes de T2 ($m = 9.6$), puis par T2 intact ($m = 4$). Après 30 minutes à 25°C , on ne peut pas trouver de cellules dont les nucléoïdes soient transformés en vacuoles marginales. Par contre, plus de 50% des bactéries ont subi la lyse par l'extérieur, tandis que les autres montrent un nucléoïde diffus ou vésiculaire (5000 \times).

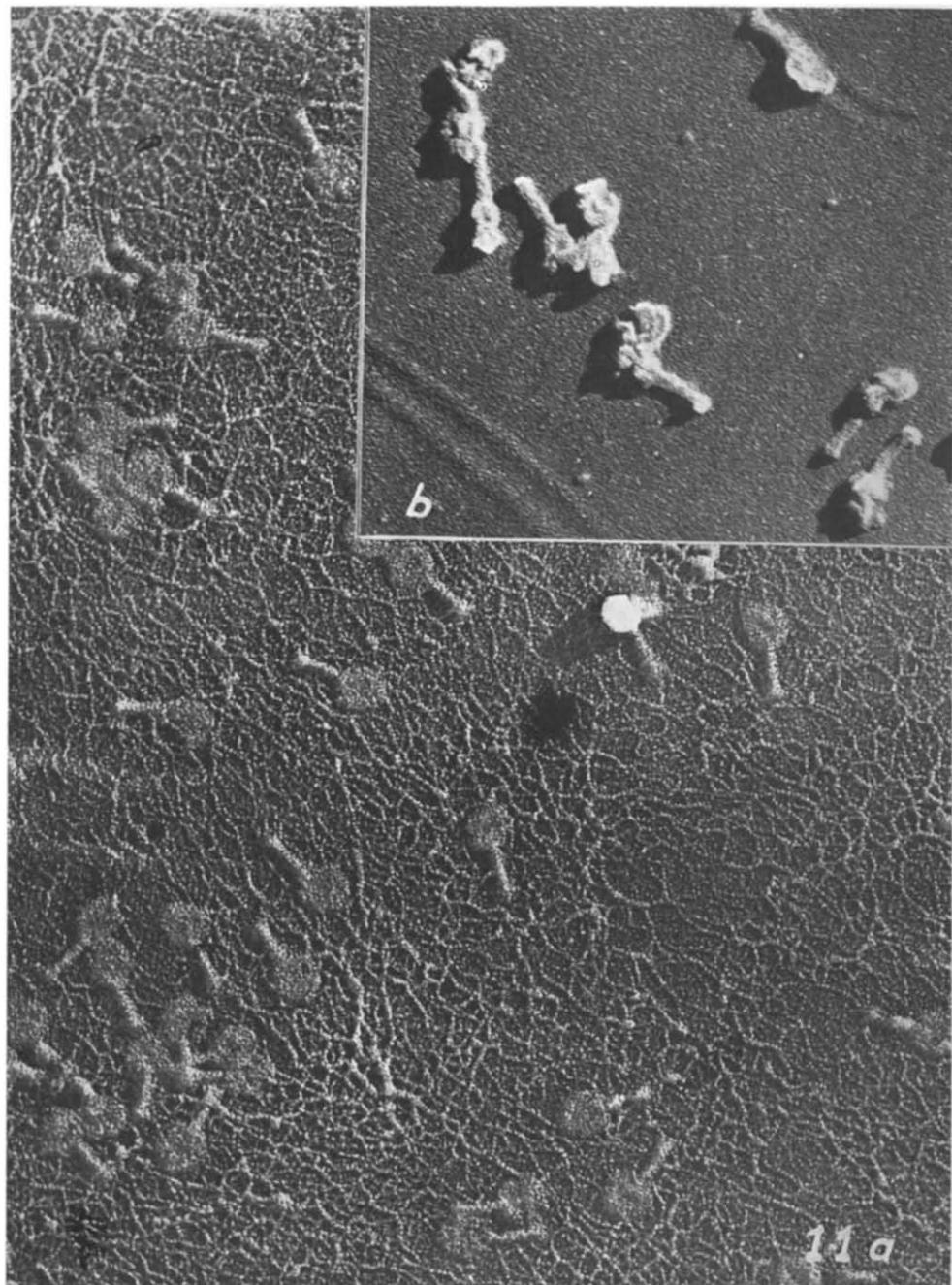


Fig. 11. a. Membranes de T2 obtenues par le choc osmotique et préparées par la méthode de filtration. Un phage survivant intact montre sa forme polyédrique caractéristique. Les membranes vides et aplatis sont entourées d'acide désoxyribonucléique formant un réseau dense (70,000 \times). b. La suspension de membranes a été traitée par la désoxyribonucléase, puis dialysée pour éloigner les produits d'hydrolyse et les sels. La suspension aqueuse de membranes a été alors préparée par "freeze-drying" selon WILLIAMS (70,000 \times).

si les bactéries qui ne montrent pas de modification nucléaire peuvent avoir subi une atteinte physiologique ou nucléaire, car le délai qui s'écoule entre l'adsorption et la fixation par l'acide osmique, dans la technique d'examen que nous avons utilisée, atteint ou dépasse les 20 minutes qui constituent la durée minimum du blocage respiratoire observé par FRENCH.

Les bactéries surinfectées par T2 intact, après avoir adsorbé des membranes de T2, ne montrent pas la transformation caractéristique de T2. Les membranes excluent donc le phage homologue. Par contre, à l'inverse de ce que VISCONTI¹⁵ a observé lors de la surinfection de complexes B-T2 par T2, la lyse par l'extérieur n'est pas exclue. Elle est même d'autant plus forte que la multiplicité des membranes est plus élevée. Cette observation doit être rapprochée de celle de DOERMANN¹⁶ qui, utilisant des lysats de B par T6 pour ouvrir des bactéries au cours du développement de T4, a constaté que certains lysats pouvaient fort bien lyser les complexes, tandis que d'autres en étaient incapables. Cette activité pourrait être mise en rapport avec la proportion de membranes de T6 contenues dans ces lysats.

RÉSUMÉ

Parmi les membranes obtenues par choc osmotique du phage T2 on trouve des *killers* capables de tuer les bactéries. Leur vitesse d'adsorption est égale à celle du phage intact. Un seul *killer* suffit à tuer une bactérie. Les membranes adsorbées ont une action sur les nucléoïdes bactériens qui est totalement différente de celle des phages T2 intacts.

SUMMARY

Membrane preparations of T2 obtained by osmotic shock contain a proportion of killer particles in which one particle can kill one bacterium. The rate of adsorption of these killers is the same as for the intact phage. The adsorbed membranes produce a transformation of the bacterial nucleus which is totally different from the action of intact T2.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch osmotischen Schock erhaltene Membranen des Phagen T2 enthalten *killers*, von denen einer genügt, um ein Bakterium zu töten. Die Adsorptionsgeschwindigkeit dieser *killers* ist dieselbe wie die von aktiven Phagen. Die Bakteriennukleoïde werden durch die adsorbierten Membranen verändert, aber in ganz anderer Weise als wie durch die intakten T2-Phagen.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 T. F. ANDERSON, *J. Appl. Phys.*, 21 (1950) 70.
- 2 T. F. ANDERSON, C. RAPPAPORT ET N. A. MUSCATINE, *Ann. inst. Pasteur*, 84 (1953) 5.
- 3 R. M. HERRIOTT, *J. Bact.*, 61 (1951) 752.
- 4 V. BONIFAS, *Ann. inst. Pasteur*, 83 (1952) 152.
- 5 M. H. ADAMS, *Methods in Medical Research*, Vol. 2, The Year Book Pub., Inc., Chicago, 1950.
- 6 E. KELLENBERGER, *Symposium de Cytologie Bactérienne. Istituto Superiore di Sanità, Roma*, 1953.
- 7 G. ET E. KELLENBERGER, *Schweiz. Z. allgem. Pathol. u. Bakteriol.*, 15 (1952) 225.
- 8 E. KELLENBERGER, *Proc. Intern. Conf. on E.M.*, London 1954 (sous presse).
- 9 FRENCH ET L. SIMINOVITCH, Communication personnelle.
- 10 R. C. WILLIAMS, *Exptl. Cell Research*, 4 (1953) 188.
- 11 C. F. ROBINOW, Addendum Dubos "The Bacterial Cell" Harvard Univ. Press, 1949.
- 12 S. LURIA ET M. L. HUMAN, *J. Bact.*, 59 (1950) 56.
- 13 R. G. MURRAY, D. H. GILLEN ET F. G. HEAGY, *J. Bact.*, 59 (1950) 603.
- 14 B. STEINBERG, *Schweiz. Z. allgem. Pathol. u. Bakteriol.*, 4 (1952) 15, 432.
- 15 N. VISCONTI, *J. Bact.*, 66 (1953) 247.
- 16 A. H. DOERMANN, *J. gen. Phys.*, 35 (1952) 645.

Reçu le 30 août 1954