

ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DES TRANSFORMATIONS NUCLEAIRES DE *E. COLI* K12 S ET K12 S (λ_{26}) APRES IRRADIATION AUX RAYONS ULTRAVIOLETS ET AUX RAYONS X

ANTOINETTE RYTER, lic. ès sc.

De Laboratoire de Médecine Expérimentale, Collège de France, Paris

ABSTRACT

Nuclear transformations induced in *E. coli* K12S and K12S(λ_{26}) by ultraviolet radiations and x-rays have been studied with ultrathin sections in the electron microscope. The nucleoplasm keeps its normal aspect during "fragmentation" and during "condensation" of the nucleus into the "vesicular" form. Serial sections show that the "fragmented" nucleus consists in reality of only one very tortuous vacuole. No difference either in the shape or in the fine structure of the nucleus could be observed between the lysogenic strain and the non-lysogenic strain. A high concentration of NaCl has a "condensation" effect on the fragmented nuclei and decreases the induction rate.

INTRODUCTION

L'irradiation aux rayons ultraviolets provoque chez *E. coli* K12 S et K12 S (λ) des transformations morphologiques caractéristiques (4, 9): les cellules s'allongent et les nucléoïdes semblent se scinder en fragments toujours plus petits, ce qui leur a valu les noms de noyaux polychromosomiques pour le premier stade et fragmentés pour le stade plus avancé. Ces transformations se produisent lorsqu'on incube les cellules durant les 30 minutes qui suivent l'irradiation et intéressent aussi bien les cellules survivantes que les non survivantes. La différence entre bactéries survivantes et bactéries condamnées n'apparaît que 60 à 90 minutes (suivant la dose) après irradiation: les cellules survivantes reprennent leur aspect normal tandis que les cellules condamnées présentent un noyau de plus en plus diffus. Cette évolution s'observe pour des doses variant de 10 à 90 pour cent des bactéries.

L'irradiation aux rayons x (10) produit des transformations nucléaires semblables à celles des rayons ultraviolets, pour des doses allant de 800 à 3000 r, doses correspondant à une survie de 90 à 100 pour cent. Des doses plus élevées (10^4 à 5.10^5 r) font apparaître, à côté des noyaux fragmentés, des noyaux vésiculaires; la proportion de ceux-ci augmente en fonction de la dose et avec 10^5 à 5.10^5 r la plupart des cellules ne s'allongent plus et portent des noyaux vésiculaires.

Ces transformations nucléaires provoquées par les rayons x et les rayons ultraviolets ont été observées par Kellenberger et Hartmann *et al.* sur des bactéries colorées à l'hydrolyse-Giemsa ou sur des bactéries observées in toto au microscope électronique (méthode globale). Ces méthodes donnent des résultats parfaitement significatifs quant à la forme générale du noyau (12) mais n'apportent aucune indication sur la structure

Received for publication, April 17, 1960.

fine de son contenu (19). De plus l'effet de superposition qui se manifeste lors de l'observation de cellules entières ne permet pas de connaître l'arrangement spatial du noyau; en particulier, dans le cas des noyaux polychromosomiques et fragmentés, les images peuvent correspondre soit à la représentation d'un noyau composé réellement de plusieurs fragments, soit à celle d'un noyau unique mais de forme extrêmement découpée, soit encore à celle d'un noyau volumineux et massif mais dont le nucléoplasme se serait très grossièrement coagulé au cours des manipulations de préparation.

Nous avons repris l'étude de *E. coli* K12 S (λ_{26}) et K12 S irradiées aux rayons x et aux rayons ultraviolets en utilisant la technique des coupes ultra-fines pour essayer de répondre à deux questions.

1°. Le nucléoplasme subit-il des transformations visibles après irradiation aux rayons ultraviolets et aux rayons x? Cette question a pu être résolue en examinant les coupes de bactéries irradiées aux rayons ultraviolets et à différentes doses de rayons x.

2°. Le chromosome bactérien est-il réellement scindé en plusieurs morceaux par les rayons x et les rayons ultraviolets? Nous avons pu répondre à cette question en reconstituant dans l'espace le noyau fragmenté à partir de coupes en série. Une question annexe se posait aussi: étant donné que les rayons x, les rayons ultraviolets et la "moutarde" à l'azote (9) entraînent tous trois la fragmentation du noyau bactérien et sont tous trois également les seuls inducteurs connus capables d'initier le développement du phage (λ) dans les espèces coli lysogènes pour ce phage, on pouvait penser que la fragmentation nucléaire accompagne obligatoirement l'induction du prophage. Nous avons essayé dans ce travail d'élucider cette question en plaçant les bactéries lysogènes irradiées aux rayons ultraviolets en présence de 2 pour cent de NaCl dans le but d'empêcher la fragmentation du noyau. On sait en effet que ce sel introduit à cette forte concentration dans du bouillon de culture provoque la condensation de la vacuole nucléaire des bactéries en croissance normale (19 et 24). On pouvait donc espérer que cette action de condensation s'exerçait également sur des bactéries irradiées et qu'en vérifiant le taux d'induction on pourrait répondre à la question posée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches bactériennes

E. coli K12 S (λ_{26}) lysogène pour le λ_{26} . *E. coli* K12 S non lysogène et sensible au λ_{26} , provenant toutes les deux du laboratoire de Kellenberger.

Milieux

Bouillon de culture: bacto tryptone Difco 5 gm., nutrient broth Difco 3 gm., NaCl 5 gm., H₂O redistillée sur pyrex 1000 ml. Solution saline: Na₂HPO₄, 12H₂O 7 gm., NaCl 5 gm., KH₂PO₄ 3 gm., MgSO₄ 0.2 gm., H₂O distillée 1000 ml., le pH de cette solution est ajusté au pH de 7.2.

Source de rayons ultraviolets et technique d'irradiation

Lampe à vapeurs de mercure à basse pression dont la majeure partie de l'émission est constituée par la radiation de 2537 Å. Les doses reçues à la surface de la suspension sont déterminées à l'aide d'un dosimètre à cellule de sélénium (16). Les bactéries après avoir été cultivées en bouillon aéré à 37° pendant 2 heures $\frac{1}{2}$ (2 à 4.10⁸ cellules par ml.) sont centrifugées, reprises dans le même volume de solution saline et irradiées en boîte de Pétri à raison de 5 ml. à la fois. Les doses utilisées sont de 500 ergs/mm². pour les K12 S et de 340 ergs/mm². pour les K12 S (λ_{26}) ce qui donne dans les deux cas une survie de 50 pour cent et correspond aux conditions les meilleures pour l'obtention des noyaux fragmentés. Après irradiation, les bactéries sont centrifugées et reprises dans le même volume de bouillon préalablement chauffé et aéré. Elles sont cultivées 30 à 40 minutes avant d'être fixées.

Source de rayons x et technique d'irradiation

La source de rayons x est un tube Holweck à anticathode de molybdène qui fonctionne sous une tension de 37 kv. Le rayonnement est filtré par 0,05 mm. d'aluminium. La longueur d'onde moyenne est de 0,9 Å correspondant par conséquent à des photons d'environ keV.

Les bactéries, après avoir été cultivées pendant 2 heures $\frac{1}{2}$ en bouillon aéré à 37° et contenant 2 à 4.10⁸ cellules par ml., sont centrifugées à 4° et reprises dans le tiers du volume primitif de bouillon refroidi à 4°. Cette température sera maintenue durant toute l'irradiation en plaçant la petite boîte de Pétri contenant la suspension dans de la glace fondante. On irradie 3 ml. à la fois afin de ne pas dépasser 2 mm. d'épaisseur. Après irradiation, les bactéries sont centrifugées à 4°, puis reprises dans le même volume que le volume primitif, de bouillon

préalablement chauffé à 37° et aéré. Elles sont incubées pendant 30 à 60 minutes suivant les expériences, avant d'être fixées.

Les contrôles de survie ont été faits selon les techniques classiques d'étalement dans l'agar mou et les contrôles de centres lytiques, selon les procédés de Weigle et Delbrück (23) avec la souche K12 S comme indicateur.

Préparation des bactéries selon la méthode globale

La technique classique consiste à étaler des bactéries sur de la gélose collodionnée et à les fixer en vapeurs d'OsO₄ lorsque tout le liquide a filtré à travers le film (9). Cependant, le temps de filtration assez variable, rend les résultats irréguliers. Afin de pouvoir observer les bactéries à un temps donné, nous avons fixé les cellules directement dans le milieu de culture avec 0,1 pour cent de OsO₄. Après 5 minutes de fixation les bactéries sont étalées sur la gélose collodionnée. Lorsque le liquide a filtré à travers le collodion, le film est recueilli à la surface de l'eau distillée et déposé sur les grilles porte-objet selon la technique classique. Cette modification donne des résultats parfaitement concordants avec l'ancienne méthode mais beaucoup plus réguliers.

Fixation et inclusion

Les détails de fixation et d'inclusion sont décrits dans des travaux précédents (19-20). En résumé, la culture recoit au temps voulu après irradiation 1/10 de son volume de OsO₄ à 1 pour cent dissous en tampon véronal dont le pH est ajusté à 6 et qui contient 1/100 M de CaCl₂. Après centrifugation, le culot est repris dans 1 ml. de même fixateur dans lequel on a ajouté au dernier moment 0,1 ml. de bouillon. On laisse fixer une nuit. On centrifuge et l'on reprend le culot dans une goutte d'agar à 2 pour cent tamponné à pH 6 qui une fois refroidi est coupé en petits cubes que l'on déshydrate à l'acétone et que l'on inclus dans le vestopal. Afin d'augmenter le contraste qui est assez faible dans le vestopal, les bactéries sont en général traitées avant la déshydratation à l'acétate d'uranyle à 0,5 pour cent pendant 2 heures. Les bactéries qui n'ont pas été traitées à l'acétate d'uranyle ont parfois été imprégnées à l'acétate de plomb une fois les coupes montées sur formvar selon la technique de Watson (22).

Les coupes ont été faites sur un microtome Servall de Porter et Blum avec des couteaux de verre et observées avec un microscope électronique RCA EMU 3B.

RÉSULTATS

1. Irradiation aux rayons ultraviolets

Préparées selon la méthode globale, les K12 S et les K12 S (λ_{26}) offrent, 40 minutes après irradia-

tion l'aspect déjà décrit par Kellenberger sur K12 S et K12 S (λ): les cellules sont très longues et portent un noyau que semble composé de plusieurs fragments (Fig. 3) (fragmentation). L'allongement de la cellule dépend de la "jeunesse" de la culture: les bactéries que proviennent de cultures qui contenaient 10⁸ à 2.10⁸ cellules/ml. deviennent 4 à 5 fois plus longues, tandis que celles qui appartenaient à des cultures que comp- taient 4 à 5.10⁸ cellules/ml. ne font que doubler de longueur.

Sur les coupes minces, les bactéries présentent un cytoplasme granuleux identique à celui des bactéries non irradiées (Figs. 1 et 2). On distingue très souvent en abondance, aux deux pôles de la cellule, et parfois vers son milieu, des vacuoles arrondies qui semblent vides, et que nous avons déjà signalées chez les bactéries non irradiées (13, 19). Ces "trous" seraient selon Holme des vacuoles de glycogène (5) dont le contenu est peut-être dissous au cours des manipulations ou absorbant très peu les électrons comme tous les polysaccharides, apparaît plus clair que le vestopal lui-même.

Les noyaux fragmentés se présentent sur coupes minces, sous forme de vacuoles généralement assez petites et dont le nombre et le contour est extrêmement variable. Leurs limites sont souvent mal définies, car, suivant l'incidence de la coupe par rapport à leur surface et étant donné l'absence de membrane nucléaire, les grains cytoplasmiques se noient progressivement dans le nucléoplasme. Les noyaux polychromosomiques (culture fixée entre 20 et 30 minutes) offrent une image intermédiaire entre le noyau normal et le noyau fragmenté: les vacuoles sont plus grandes, moins découpées et moins nombreuses. On ne note jamais aucune différence entre les bactéries lysogènes et non lysogènes.

Toutes les vacuoles nucléaires, que ce soient celles des noyaux polychromosomiques ou celles des noyaux fragmentés, sont remplies d'un nucléoplasme identique à celui des bactéries non irradiées. Il est formé de filaments très fins (30 à 60 Å de diamètre) disposés soit en réseau soit en faisceaux plus ou moins marqués. Comme nous l'avons déjà dit, aucune membrane nucléaire ne sépare le nucléoplasme du cytoplasme.

Les coupes en séries des noyaux fragmentés (Figs. 4 a à g, et 5 a à g) qui permettent de suivre

par superposition la forme de la vacuole nucléaire, montrent que toutes les vacuoles sont reliées les unes aux autres. Les noyaux fragmentés ne sont donc pas constitués de plusieurs tronçons; mais ne sont qu'un seul et même noyau très découpé (Fig. 5 *h*). En décalquant les coupes successives sur du film gris clair et en y découpant les vacuoles nucléaires, nous avons obtenu par superposition de ces découpages la Fig. 6 qui schématise les bactéries observées in toto par la méthode globale. On voit que cette image est extrêmement proche de celle obtenue par la méthode globale (Fig. 3). Ceci prouve donc que l'aspect de fragmentation n'est pas dû à de grossiers artefacts de coagulation mais résulte de la superposition des "circonvolutions" du noyau.

Influence des fortes concentrations de NaCl

Les expériences d'induction en présence de fortes concentrations de NaCl ont été faites pour savoir si l'induction du prophage était obligatoirement liée à la fragmentation du noyau. Whitfield et Murray ont montré au microscope optique que la concentration en NaCl du milieu de culture influençait la forme du noyau bactérien (24): les bactéries cultivées en absence de NaCl offrent un noyau assez diffus, tandis que celles cultivées en présence de 2 à 10 pour cent de NaCl présentent un noyau très condensé. Les coupes ultrafines montrent des images similaires tout en apportant quelques détails supplémentaires (19): les noyaux des cellules cultivées en absence de NaCl sont formés d'une seule vacuole très découpée et remplie d'un nucléoplasme normal. Les bactéries cultivées en présence de 2 pour cent de NaCl

ont un noyau condensé en une masse arrondie et condensée également remplie d'un nucléoplasme normal.

Nous avons pensé que l'action de condensation des fortes concentrations de NaCl s'exercerait également sur le noyau de la bactérie irradiée et empêcherait ainsi la fragmentation de celui-ci, ce qui nous permettrait, en contrôlant le taux d'induction, de savoir si l'induction peut avoir lieu sans fragmentation. Cette étude a été faite en employant la méthode globale et la technique des coupes fines. Nous avons utilisé les souches lysogènes et non lysogènes. Dans certaines expériences, les bactéries ont été mises en présence de 2 pour cent de NaCl dès le début de l'expérience, c'est-à-dire pendant la période de croissance, pendant l'irradiation et pendant les 40 minutes d'incubation faisant suite à l'irradiation. Dans d'autres cas, le sel n'a été introduit qu'après irradiation. Les contrôles de survie et du nombre de centres lytiques ont été faits sur boîtes de gélose contenant 2 pour cent de NaCl.

RÉSULTATS

Préparées par la méthode globale, les bactéries qui ont été mises en présence de 2 pour cent de NaCl seulement après irradiation présentent des noyaux fragmentés pareils à ceux des cellules incubées en milieu normal. Celles qui ont été mises en présence de 2 pour cent de NaCl déjà avant irradiation, portent des noyaux qui n'atteignent pas un stade de fragmentation très poussé et les cellules s'allongent peu. On observe quelques rares noyaux condensés (Fig. 8).

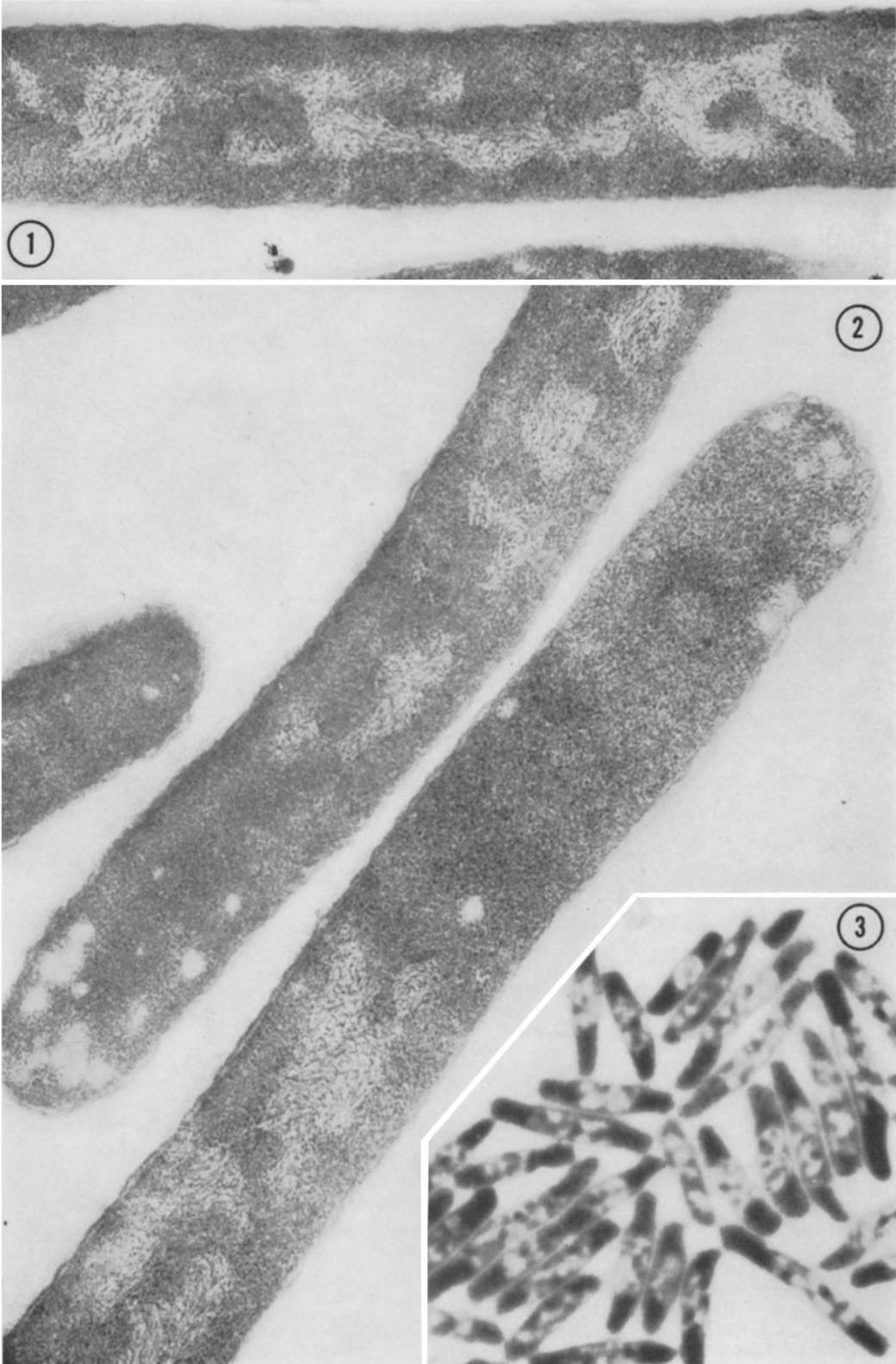
Sur coupes minces, l'action de condensation est

FIGURES 1 et 2

Coupes minces de *E. coli* K12 S (λ_{26}) irradiées aux UV et cultivées pendant 40 minutes après irradiation. Les cellules sont longues et leur noyau apparaît sous forme de vacuoles de forme et de grandeur très variable, remplies d'un nucléoplasme brillant identique à celui des bactéries non irradiées. Le cytoplasme est homogène et granuleux, il contient souvent un assez grand nombre de vacuoles de glycogène.
Grossissement 69.000.

FIGURE 3

E. coli K12 S irradiées aux UV, cultivées encore 40 minutes après irradiation et préparées par la méthode globale. Les nucléoïdes qui apparaissent en clair sur le cytoplasme foncé sont fragmentés et la plupart des cellules sont longues.
Grossissement 6.000.



plus visible: les noyaux des bactéries cultivées en présence de 2 pour cent de NaCl soit seulement après irradiation soit déjà avant irradiation se présentent sous forme de vacuoles généralement moins nombreuses et moins découpées que dans les cas normaux (Fig. 7). On trouve parfois des noyaux condensés en une seule masse (Fig. 9). La survie des bactéries au lieu d'être de 50 tombe à 25 pour cent tant pour le K12 S (λ_{26}) que pour le K12 S. D'autre part, pour la souche lysogène, le nombre de centres lytiques passe également de 50 à 25 pour cent. Il y a donc 50 pour cent des bactéries qui ne donnent ni colonies ni centres producteurs de phages. L'étalement sur boîtes de gélose à concentration saline normale ne rétablit ni la survie normale ni le nombre de centres lytiques correspondant.

Bien que ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer que la fragmentation soit liée à l'induction, ils nous montrent cependant qu'à une fragmentation plus faible correspond une production plus faible de centres lytiques.

Irradiation aux rayons x

Les doses de 800 à 3000 r provoquent des transformations identiques à celles des ultraviolets, c'est-à-dire que les bactéries préparées par la méthode globale présentent pour la plupart 40

minutes après irradiation, des noyaux fragmentés et un allongement très marqué. Sur coupes minces, rien ne les distingue non plus des cellules irradiées aux ultraviolets (Fig. 10): le nombre des vacuoles augmente au fur et à mesure de l'accentuation de la fragmentation; elles sont remplies d'un nucléoplasme constitué de filaments très fins disposés soit en réseaux soit en faisceaux. Le cytoplasme également conserve son aspect normal. Les vacuoles de glycogène sont rares.

Au fur et à mesure de l'augmentation de la dose de rayons x on voit par la méthode globale le nombre des noyaux fragmentés diminuer et celui des noyaux vésiculaires augmenter. Les noyaux fragmentés semblent se ramasser au milieu de la cellule, formant ainsi tous les stades intermédiaires entre les noyaux fragmentés typiques et les noyaux vésiculaires typiques (Fig. 11). A partir de 5.10^5 r, presque toutes les bactéries ont un noyau vésiculaire et les stades intermédiaires sont rares (Fig. 12). Les noyaux passent directement de l'état normal à l'état vésiculaire. Nos observations sont donc en accord avec celles faites précédemment (10).

Les coupes donnent des résultats parfaitement concordants: les bactéries irradiées avec des doses allant de 5.10^3 à 5.10^4 r montrent qu'à côté des noyaux fragmentés typiques apparaissent des noyaux concentrés en une seule vacuole

FIGURE 4 a à g

Coupes en série de K12 S (λ_{26}) irradiées aux UV présentant un noyau fragmenté.

FIGURE 5 a à g

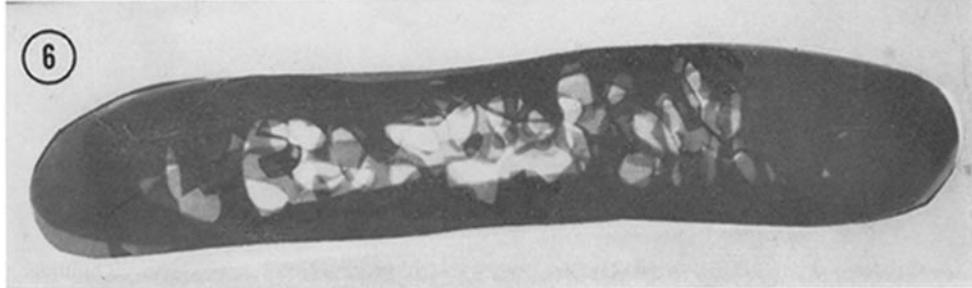
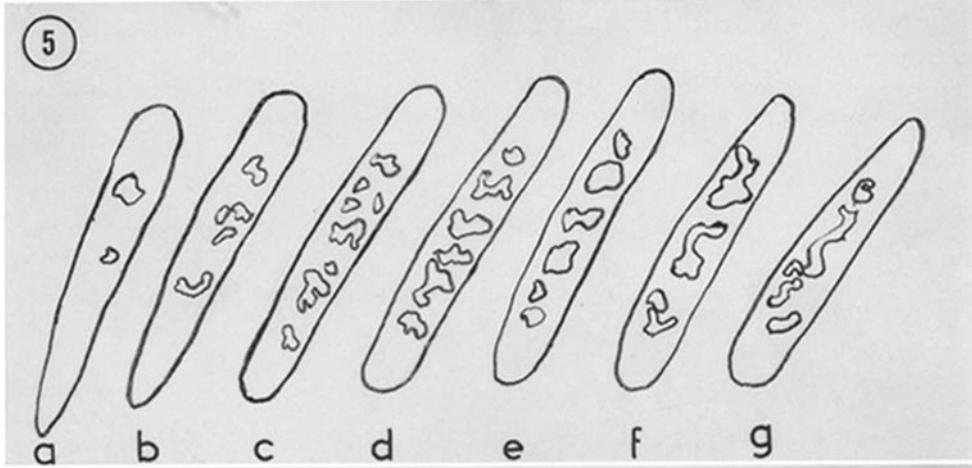
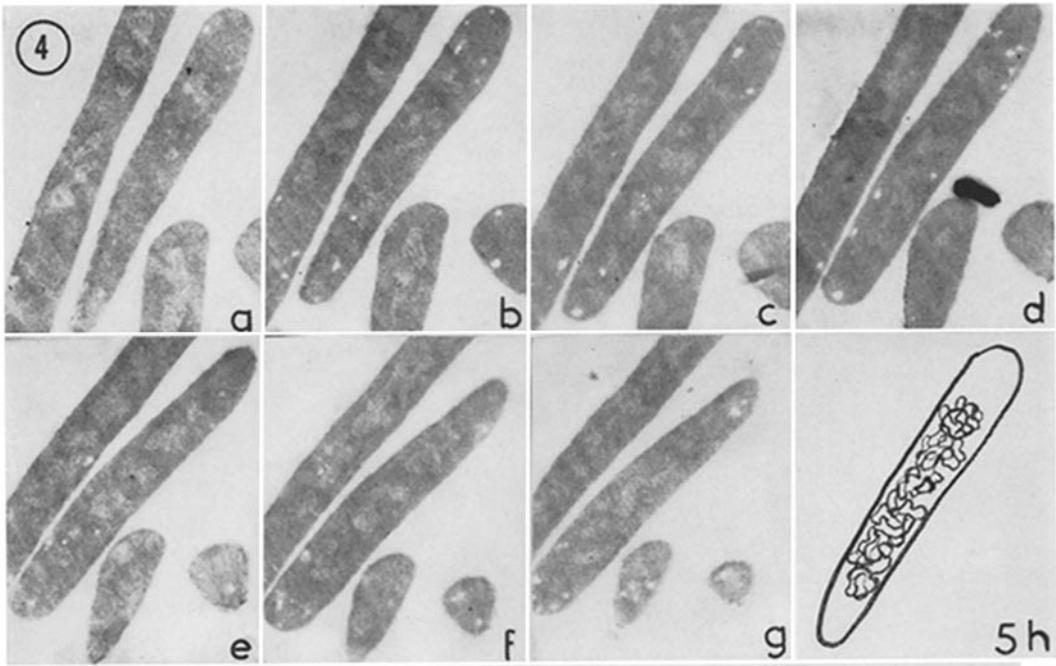
Dessins de 7 coupes en série de *E. coli* K12 S (λ_{26}) irradiées aux UV avec leurs vacuoles nucléaires. Si l'on suit les différentes vacuoles nucléaires d'une coupe à l'autre, on voit qu'elles sont toutes reliées les unes aux autres.

FIGURE 5 h

Superposition des 6 dessins des coupes sériées. On voit que le noyau fragmenté apparaît comme une masse volumineuse très découpée.

FIGURE 6

Superposition des 6 coupes en série décalquées sur film gris clair et dont les vacuoles nucléaires ont été découpées laissant ainsi un trou correspondant à leur forme. Cette superposition de découpages reproduit schématiquement une bactérie préparée selon la méthode globale dans laquelle le noyau apparaît en clair dans un cytoplasme foncé. On voit que cette image est très voisine de celle de la Fig. 1 bien que ces 6 coupes ne correspondent qu'à la moitié de l'épaisseur de la cellule.



relativement peu découpée dans son pourtour, mais semée de nombreux îlots cytoplasmiques (Fig. 13). Au fur et à mesure de l'augmentation de la dose de rayons x, les îlots cytoplasmiques diminuent (Fig. 14) et à partir de 5.10^5 r toutes les bactéries portent des noyaux parfaitement vésiculaires (Fig. 15). Cette évolution n'altère en rien la structure fine du nucléoplasme. Le cytoplasme conserve également son aspect normal.

Bien que les K12 S et les K12 S (λ_{26}) n'offrent

aucune différence morphologique, la sensibilité plus grande aux rayons x de la souche lysogène se manifeste par l'apparition plus rapide des noyaux vésiculaires en fonction de la dose de rayons x que pour la souche non lysogène (Tableau I).

L'action d'un radio-protecteur, tel que la glycérine (17) employée à 10 pour cent sue de *E. coli* K12 S (λ_{26}) recevant 5.10^4 r dose qui fait passer la survie de 10^{-4} à environ 10^{-2} n'apporte aucun changement ni dans la morphologie ni dans la

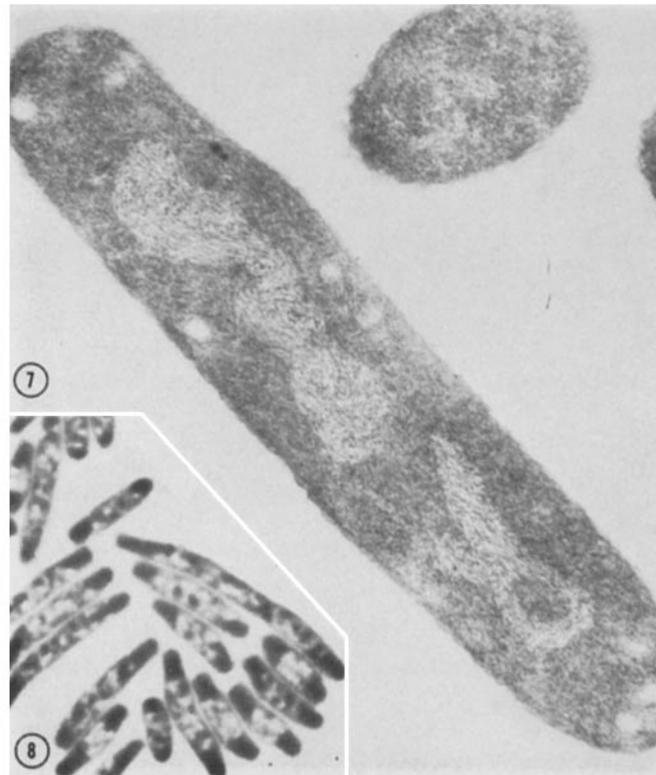


FIGURE 7

Coupe de *E. coli* K12 S (λ_{26}) irradiée aux UV et cultivée pendant 40 minutes en présence de 2 pour cent de NaCl. Les vacuoles nucléaires sont plus grosses, plus massives, et moins nombreuses que dans le noyau fragmenté habituel. Le nucléoplasme a un aspect normal et l'on distingue particulièrement bien les fibrilles en faisceaux. Le cytoplasme est normal et contient quelques vacuoles de glycogène. Grossissement 44.000.

FIGURE 8

E. coli K12 S irradiées aux UV et cultivées pendant 40 minutes en présence de 2 pour cent de NaCl et préparées selon la méthode globale. Les cellules sont en général assez longues, la plupart des noyaux sont fragmentés à part un petit nombre dont la fragmentation est moins poussée et qui sont concentrés au centre de la bactérie. Cette image n'est donc pas très différente de celle qu'offre une culture de bactéries irradiées et cultivées en condition saline normale. Grossissement 4.000.

proportion entre noyaux fragmentés et noyaux vésiculaires.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Cette étude des noyaux de bactéries irradiées aux rayons ultraviolets et aux rayons x en employant la technique des coupes ultrafines nous apporte deux résultats:

Tout d'abord, nous constatons que le nucléoplasme conserve son aspect normal au cours des diverses transformations que le noyau subit après irradiation.

Deuxièmement, les coupes en série montrent

que les noyaux d'aspect fragmentés répondent en réalité à des noyaux uniques mais très bourgeonnants. Donc, ni les rayons ultraviolets, ni les rayons x ne scindent le noyau bactérien en plusieurs tronçons et les désignations de noyaux polychromosomiques et noyaux fragmentés ne correspondent pas à la réalité.

On pourrait être tenté de penser que l'évolution du noyau normal en noyau "fragmenté" est due aux lésions nucléaires et qu'elle reflète par exemple l'arrêt de la synthèse de l'ADN (1, 3, 6, 8, 15). Le fait que les bactéries traitées à la moutarde à l'azote subissent les mêmes transformations morphologiques et subissent également



FIGURE 9

Coupe de *E. coli* K12 S cultivée déjà avant irradiation en présence de 2 pour cent de NaCl. Type de noyau condensé que l'on observe de temps en temps. Grossissement 44.600.

une inhibition de la synthèse de l'ADN confirmerait cette hypothèse. Il semble, cependant, que le problème ne soit pas si simple, car les bactéries qui croissent en absence de NaCl avec un temps de génération normal et qui par conséquent ont une synthèse d'ADN normale, offrent une image très proche des noyaux fragmentés. D'autre part, les bactéries traitées par des doses subléthales de chloramphénicol et qui sont par conséquent toutes survivantes ont un noyau vésiculaire absolument identique à celui des bactéries ayant reçu des fortes doses de rayons x et qui sont toutes condamnées. Il est donc probable que la forme du noyau dépend plus de certaines conditions métaboliques que des lésions nucléaires propres. L'absence de membrane nucléaire met le noyau en contact intime avec le cytoplasme et lui donne une très grande souplesse; elle permet des échanges très rapides entre les deux constituants de la cellule et explique peut-être les transformations morphologiques que le noyau subit si facilement. Il ne semble pas cependant que la perméabilité cellulaire envers le NaCl soit changée par irradiation comme le pensaient Whitfield et Murray (24) puisque les noyaux irradiés réagissent de la même façon aux fortes concentrations de NaCl que les noyaux non irradiés.

Les études entreprises ces dernières années sur le noyau bactérien (13) permettent de penser qu'il n'est pas à proprement parler un noyau mais un seul chromosome. Ce que nous avons appelé nucléoplasme fibrillaire représenterait la structure fine d'un chromosome fortement hydraté comparable au "chromosome" de l'état interphasique des cellules plus évoluées. Cette hypothèse est basée sur les observations de structures similaires faites sur les chromosomes en interphase et en prophase méiotiques ainsi que sur des chromosomes de protozoaires (référence, voir 11). En se référant au modèle de Taylor (21) et aux observations de Meselson et Stahl (18) ainsi qu'en se basant sur la division, la grandeur et le

nombre des molécules d'ADN chez les bactéries, Kellenberger a proposé un modèle du chromosome bactérien (11). L'ADN, neutralisé par des polyamines ou des polypeptides très simples formerait les fibrilles chromatiques qui seraient liées les unes aux autres par des "linkers" de nature protéique. Ces fibrilles, groupées parallèlement, formeraient un "cylindre" plus ou moins régulier, dont les deux extrémités seraient constituées par les linkers. Ce cylindre serait assez souple pour former une hélice grossière de 2 à 3 tours plus ou moins serrés suivant l'état de la cellule. Ce modèle a l'avantage d'être en accord avec les données de la génétique bactérienne et en particulier de l'existence possible d'une liaison circulaire (7).

On peut supposer que les images de fragmentation sont le résultat d'une spiralisation relativement forte mais très lâche tandis que les noyaux vésiculaires correspondent à l'état le plus serré. La présence de faisceaux de fibres disposées parallèlement au grand axe des vacuoles dans les noyaux fragmentés et qui correspondrait à celui du chromosome (Figs. 1 et 8) étaye cette hypothèse. L'image de la vacuole nucléaire que l'on obtient en la suivant d'une coupe à l'autre dans une série de coupes est également compatible avec cette supposition, mais la trop grande complexité de sa forme ne permet pas de le prouver. Il est d'ailleurs probable que les noyaux fragmentés sont constitués par les deux chromosomes de la cellule puisque avant irradiation toutes les bactéries avaient deux ou même quatre chromosomes (suivant leur état de division). Ces deux chromosomes sont probablement intriqués, formant un édifice très difficile à démêler.

En résumé nous voyons donc que les irradiations x et UV entraînent des transformations dans la disposition du chromosome à l'intérieur de la bactérie mais qu'elles n'induisent aucun changement dans la structure fine du nucléoplasme. Les lésions qu'elles produisent ne sont donc pas visibles à ce niveau. On constate égale-

FIGURE 10

Coupe de *E. coli* K12 S ayant reçu 800 r et cultivées encore pendant 40 minutes après irradiation. La vacuole nucléaire est assez découpée et n'offre pas de différence avec celle des noyaux fragmentés observés après irradiation aux UV. Le nucléoplasme et le cytoplasme sont identiques à ceux des bactéries non irradiées. Grossissement 75.000.

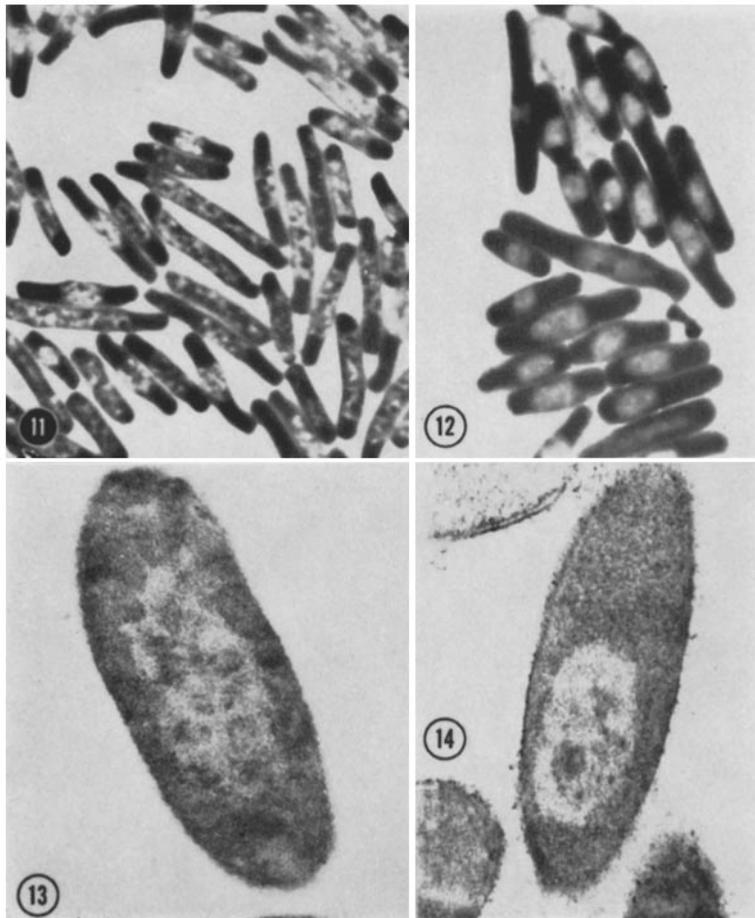


TABLEAU I

Dose	<i>E. coli</i> K12 S			<i>E. coli</i> K12 S(λ_{98})		
	Survie	Noyaux fragmentés	Noyaux vésiculaires	Survie	Noyaux fragmentés	Noyaux vésiculaires
	<i>pour cent</i>	<i>pour cent</i>	<i>pour cent</i>	<i>pour cent</i>	<i>pour cent</i>	<i>pour cent</i>
10 ⁴ r	30	66	34	20	45	55
10 ⁵ r	10 ⁻³	56	44	10 ⁻⁴	30	70

Ce tableau donne les proportions en pour cents de noyaux fragmentés et de noyaux vésiculaires de *E. coli* K12 S et K12 S (λ_{98}) en fonction de la dose de rayons x. Les comptages ont été établis sur des bactéries préparées par la méthode globale. Les chiffres indiqués par souche et par dose proviennent de l'examen de 60 à 170 cellules.

Le nombre de noyaux vésiculaires augmente donc au fur et à mesure de l'augmentation des morts. Mais si toutes les cellules portant un noyau vésiculaire sont vouées à la mort, une partie des cellules à noyau fragmenté sont également condamnées puisque les pourcentages des survies sont bien inférieurs à ceux des noyaux fragmentés.



ment que le nucléoplasme du noyau fragmenté de la bactérie lysogène ne présente aucune différence avec celui de la bactérie non lysogène. Donc pour la souche lysogène dont le noyau fragmenté de 40 minutes représente déjà le pool végétatif du phage, l'ADN phagique se présente sous la même forme que le nucléoplasme du noyau normal. Ces observations rejoignent celles faites dans le cas d'infection de *E. coli* K12 S par le phage virulent λ_v (J. Séchaud, communication personnelle) et dans celui d'infection de *E. coli* B par le phage virulent T₂ (14).

Nous tenons à remercier tout d'abord le Docteur Françoise Haguénau, sous-Directeur du Laboratoire de Médecine Expérimentale du Collège de France qui a accepté que nous étudions ce sujet assez étranger à la ligne de recherches du laboratoire et qui a tout fait pour nous faciliter cette étude.

Nous remercions Monsieur le Professeur Kellenberger, Directeur du Laboratoire de Biophysique de Genève, pour l'intérêt qu'il n'a cessé de nous montrer au cours de cette étude et pour ses nombreuses nombreuses critiques et suggestions qui nous ont

été d'une aide précieuse au cours de ce travail et de sa rédaction.

Notre reconnaissance va également à Monsieur le Professeur Latarjet qui a mis aimablement à notre disposition les sources de rayons ultraviolets et de rayons ainsi qu'à Monsieur Marcovitch pour ses conseils avisés et l'amabilité avec laquelle il nous a permis d'utiliser tout le matériel nécessaire aux contrôles bactériologiques.

RÉFÉRENCES

1. BARNER, H. D., et COHEN, S. S. *J. Bacteriol.*, 1956, **71**, 149.
2. HAROLD, F. M., et ZIPORIN, Z. Z., *Biochim. et Biophysica Acta*, 1958, **28**, 482.
3. HAROLD, F. M., et ZIPORIN, Z. Z., *Biochim. et Biophysica Acta*, 1958, **29**, 439.
4. HARTMAN, P. E., PAYNE, J. I., et MUDD, R. S., 1955, **70**, 531.
5. HOLME, T., *J. Ultrastruct. Research*, 1959, **3**, 70.
6. IVERSON, R. M., et GIESE, A. C., *Biochim. et Biophysica Acta*, 1957, **25**, 62.

FIGURE 11

E. coli K12 S (λ_{26}) ayant reçu 8.000 r, cultivées 40 minutes après irradiation, et préparées par la méthode globale. La moitié des bactéries offre des noyaux fragmentés tandis que l'autre moitié présente des noyaux condensés au centre de la cellule mais dont la fragmentation est encore visible. Une cellule montre un noyau vésiculaire typique.

Grossissement 4.300.

FIGURE 12

E. coli K12 S (λ_{26}) ayant reçu 3.10⁵ r, cultivées 40 minutes après irradiation, et préparées par la méthode globale. Toutes les cellules présentent des noyaux parfaitement vésiculaires.

Grossissement 6.000.

FIGURE 13

Coupe de *E. coli* K12 S (λ_{26}) ayant reçu 2.10⁴ r, cultivées 40 minutes après irradiation. La cellule montre un noyau ramassé en son centre, très proche du noyau vésiculaire mais dont le nucléoplasme est encore parsemé de nombreux îlots cytoplasmiques.

Grossissement 35.000.

FIGURE 14

Coupe de *E. coli* ayant reçu 10⁵ r et cultivée pendant 40 minutes après irradiation. L. noyau est vésiculaire mais contient encore quelques îlots cytoplasmiques.

Grossissement 34.500.



FIGURE 15

Coupe de *E. coli* K12 S (λ_{26}) ayant reçu 5.10^5 r et cultivée pendant 40 minutes après irradiation. Le noyau a la forme vésiculaire typique, le nucléoplasme est homogène, constitué de fins filaments. Il n'offre aucune différence avec le nucléoplasme d'une bactérie non irradiée. Le cytoplasme également ne présente aucune anomalie. Grossissement 50.000.

7. JACOB, F., et WOLLMANN, E. *Compt rend. Acad. sc.*, 1957, **245**, 1840.
8. KANAZIR, D., et ERRERA, M., *Biochim. et Biophysica Acta*, 1954, **14**, 62.
9. KELLENBERGER, E. in Symposium Bacterial Cytology, Rome, Fondazione Emanuele Paterno, 1953.
10. KELLENBERGER, E., *Experientia*, 1955, **11**, 305.
11. KELLENBERGER, E., in Symposium of Microbiology, London, 1960, à paraître.
12. KELLENBERGER, E., et RYTER, A., *Schweiz. Z. allg. Path. u. Bakt.*, 1955, **18**, 1122.
13. KELLENBERGER, E., RYTER, A. et SECHAUD, J., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1958, **4**, 671.
14. KELLENBERGER, E., SECHAUD, J., et RYTER, A., *Virology*, 1959, **8**, 478.
15. KELNER, A., *J. Bact.*, 1953, **65**, 252.
16. LATARJET, R., MORENNE, P., et BERGER, R., *Ann. Inst. Past.*, 1953, **85**, 174.
17. MARGOVITCH, H. Les peroxydes organiques en radiobiologie, Paris, Masson et Cie, Editeurs, 1957.
18. MESELSON, M., et STAHL, F. W., *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1958, **44**, 671.
19. RYTER, A., et KELLENBERGER, E., *Z. Naturforsch.*, 1958, **13**, 597.
20. RYTER, A., et KELLENBERGER, E., *J. Ultrastruct. Research*, 1958, **2**, 200.
21. TAYLOR, J. H., *Sc. Am.*, 1958, **198**, 37.
22. WATSON, M. L., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1958, **4**, 727.
23. WEIGLE, J., et DELBRUCK, M., *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
24. WHITFIELD, J. F., et MURRAY, R. G. E., *Canad. J. Microbiol.*, 1956, **2**, 245.