



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Université de Nancy I**  
UFR: Sciences et Techniques Biologiques  
GFD: Biologie et Biochimie Structurales,  
Métaboliques, Moléculaires et Nutritionnels

**INRA, Jouy-en-Josas**  
Station de Recherches Laitières

## **THESE**

Présentée par **Blandine Fayard**

pour obtenir le titre de

**Docteur de l'Université de Nancy I en Génétique Moléculaire**

**Caractérisation de 69 bactériophages de  
*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*,  
incluant 10 bactériophages tempérés**

Soutenue le 22 Janvier 1993, devant la commission d'examen composée de :

Président : B. Decaris, Professeur à l'Université de Nancy I  
Rapporteurs : A. Mercenier, Docteur, Chef du Département Bactériologie,  
Transgène SA, Strasbourg  
J. C. Hubert, Professeur à l'Université de Strasbourg  
Examineurs : J. P. Accolas, Directeur de Recherches INRA  
J. F. Chamba, Docteur, Délégué Régional de l'Institut  
Technique du Gruyère  
M. Desmazeaud, Directeur de Recherches INRA  
G. Novel, Professeur à l'Université de Caen





Mme SMITH

Mrs Parker connaît un épicier roumain, nommé Popesco Rosenfeld, qui vient d'arriver de Constantinople. C'est un grand spécialiste en yaourt. Il est diplômé de l'école des fabricants de yaourts d'Andrinople. J'irai demain lui acheter une grande marmite de yaourt roumain folklorique. On n'a pas souvent des choses pareilles ici, dans les environs de Londres.

*M. SMITH, continuant sa lecture, fait claquer sa langue.*

Mme SMITH

Le yaourt est excellent pour l'estomac, les reins, l'appendicite et l'apothéose. C'est ce que m'a dit le docteur Mackenzie-King qui soigne les enfants de nos voisins, les Johns. C'est un bon médecin. On peut avoir confiance en lui. Il ne recommande jamais d'autres médicaments que ceux dont il a fait l'expérience sur lui-même.

**Eugène Ionesco**  
**La cantatrice chauve**

*La réalisation de ce travail a été possible grâce aux financements apportés par l'Institut National de la Recherche Agronomique et l'Institut Technique du Gruyère.*

*Je remercie Madame A. Mercenier et Messieurs J.F. Chamba, B. Decaris, M. Desmazeaud, J.C. Hubert et G. Novel, d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie également Monsieur P. Maitenaz directeur de l'Institut Technique du Gruyère.*

*Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur J.P. Accolas qui m'a accueillie dans son laboratoire et a assuré la direction scientifique de mon travail. Je le remercie pour les connaissances étendues qu'il m'a fait partager sur les bactéries lactiques et leurs phages, pour les judicieux conseils qu'il m'a donnés au cours de mes recherches et pour les encouragements qu'il a su me prodiguer aux moments opportuns.*

*A tous ceux sans qui ce travail n'aurait pu aboutir,*

*Moritz Häfliger, Florence Clier,*

*Bénédicte Cesselin, Frédéric Mercier, Pascal Quénée, Annalisa Rebecchi, Micheline Rousseau, Laurent Séchaud, Laurence Sénéchal, Patrick Tailliez, Raffaella Zennaro, Athéna Zourari,*

*Jean-Yves Accolas, Laurent Benbadis, Jutta Beroard-Cerning, Claire Chabanet, Sylvie Chatenay, Catherine Colmin, Jacqueline Commissaire, Alain Degas, André Dugat, Paule Diebold, Caroline Duplan, Marcel Fourier, Michel Fons, Sylviane Furlan, Joël Gallet, Chantal Gars, Maryse Gruzza, Lydie Hortaut, Dominique Le Bars, Guy Linden, Lise Phagique, Jean-Christophe Piard, Françoise Poullain, Florence Prost, Raoul Raya, Patrick Régent, Yvonne Roussel, Véronique Salamand, Jean-Marc Simonet, Josselyne Tremblay, Yvonne Vassal, Monique Veaux, et*

*aux trois Fayards,*

*un grand merci.*

## **Sommaire et abréviations**

## SOMMAIRE

	Page
<b>ABREVIATIONS</b> -----	4
<b>INTRODUCTION</b> -----	5
<b>1. Etude bibliographique</b> -----	5
1.1. Taxonomie -----	6
1.2. Activités métaboliques importantes pour la technologie -----	8
1.3. Phénomènes de protocoopération entre les bactéries des levains lactiques thermophiles, dans le lait -----	13
1.4. Inhibition due à des composés microbiens -----	14
1.5. Les différents types de levains lactiques thermophiles -----	14
1.6. Génétique -----	15
1.7. Les bactériophages de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> -----	16
1.8. Les mécanismes de la résistance phagique chez <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> -----	19
<b>2. Présentation du sujet</b> -----	21
<b>MATERIEL ET METHODES</b> -----	22
<b>MICROBIOLOGIE</b> -----	22
<b>1. Bactéries et bactériophages</b> -----	22
1.1. Bactéries -----	22
1.2. Bactériophages -----	22
<b>2. Milieux de culture</b> -----	37
2.1. Lait tournesolé -----	37
2.2. Bouillons et milieux gélosés -----	37
<b>3. Purification, conservation et conditions de culture des souches</b> -----	38
3.1. Souches de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> -----	38
3.2. Souches d' <i>E. coli</i> -----	38
<b>4. Recherche et mise en évidence des phages tempérés</b> -----	38
4.1. Souches en apparence non inductibles (cultures non lysées) -----	39
4.2. Souches inductibles (cultures lysées) -----	39
<b>5. Phages isolés comme lytiques dans les laiteries</b> -----	39
<b>6. Purification et numération des phages</b> -----	40
<b>7. Multiplication et conservation des phages</b> -----	41
<b>8. Recherche d'un nombre réduit de souches de propagation</b> -----	41

<b>9. Lysogénisation de la souche CNRZ 312</b>	42
<b>10. Guérison des souches lysogènes CNRZ 1205 et 1690</b>	42
<b>11. Spectres d'hôtes</b>	43
<b>12. Détermination du pourcentage d'adsorption</b>	44
<b>13. Rendement unitaire de lyse</b>	44
<b>14. Cycle de multiplication</b>	45
<b>15. Thermorésistance des phages</b>	45
<b>16. Concentration des phages</b>	46
16.1. Préparation de la souche indicatrice	46
16.2. Essais préliminaires	46
16.3. Production des phages	46
<b>17. Microscopie électronique</b>	47
<b>18. Etude des protéines phagiques</b>	47
<b>19. Propriétés autolytiques des souches</b>	48
<b>BIOLOGIE MOLECULAIRE</b>	49
<b>1. Préparation des ADN</b>	49
1.1. Extraction de l'ADN bactérien	49
1.2. Extraction de l'ADN phagique	49
1.3. Préparation de l'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	49
<b>2. Analyse de l'ADN</b>	50
2.1. Dosage de l'ADN	50
2.2. Hydrolyse de l'ADN par les endonucléases de restriction	50
2.3. Electrophorèse en gel d'agarose	50
2.4. Purification de l'ADN par <i>GeneClean</i>	51
2.5. "Transfert en goutte"	51
2.6. Transfert de l'ADN des gels d'agarose par la méthode de Southern (1975)	51
<b>3. Hybridation ADN-ADN</b>	51
3.1. Marquage de l'ADN au <sup>32</sup> P par déplacement de césure	51
3.2. Marquage de l'ADN simple brin par chimioluminescence	52
3.3. Autoradiographie	53
<b>4. Préparation d'une banque d'ADN phagique dans le vecteur pBS</b>	53
4.1. Préparation du vecteur	53
4.2. Préparation de l'ADN phagique	55
4.3. Préparation de cellules compétentes	55
4.4. Ligation	55
4.5. Transformation	55
<b>5. Examen des molécules d'ADN au microscope électronique</b>	56



<b>RESULTATS</b>	57
<b>1. Caractérisation des souches de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> de la collection CNRZ</b>	57
1.1. Purification des souches	57
1.2. Appartenance des souches CNRZ à l'espèce <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	57
<b>2. Etude des bactériophages</b>	63
2.1. Recherche d'un nombre réduit de souches de propagation	63
2.2. Morphologie	65
2.3. Thermorésistance des phages	67
2.4. Protéines phagiques majeures	69
2.5. Etude des génomes phagiques	72
<b>3. Interactions phages-bactéries</b>	86
3.1. Recherche des souches lysogènes	86
3.2. Localisation des prophages dans le génome bactérien	94
3.3. Etude des propriétés autolytiques des souches lysogènes	98
3.4. Etude de quelques caractéristiques biologiques de 4 phages	100
3.5. Spectres d'hôtes des phages	101
<b>DISCUSSION</b>	131
<b>CONCLUSION</b>	136
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	137
<b>GLOSSAIRE</b>	145
<b>ANNEXE 1</b>	147
<b>ANNEXE 2</b>	148



## ABREVIATIONS

A	Acidification
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BRL	Bethesda Research Laboratories
C	coagulation
CHEF	Contour Clamped Homogeneous Electric Fields
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CsCl	Chlorure de césium
CNRZ	Centre National de Recherches Zootechniques
DO	Densité optique
dpm	Désintégration par minute
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
HMP	Hexoses monophosphate
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
INA	Institut National Agronomique
IS	Indice de similarité
ITG	Institut Technique du Gruyère
kb	Kilobase(s)
kDa	Kilodalton(s)
m	Masse
Mb	Mégabase
MC	Mitomycine C
MOI	Multiplicity of infection (multiplicité d'infection)
NCDO	National Collection of Dairy Organisms (Reading, GB), devenue NCFB
NCFB	National Collection of Food Bacteria
NIRD	National Institute for Research in Dairying (Shinfield, GB). N'existe plus.
PA	Pourcentage d'adsorption
PAGE - SDS	Polyacrylamide gel electrophoresis - SDS
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoénolpyruvate
PTS	Phosphotransférase
R	Réduction
R/M	Restriction / modification
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium dodecylsulfate
SSC	Saline sodium citrate
TAE	Tampon tris acétate EDTA
TBE	Tampon tris borate EDTA
TE	Tampon tris EDTA
TEMED	N, N, N', N', Tétraméthyléthylènediamine
TM	Tampon tris magnésium
Tris	Tris hydroxyméthyl aminométhane
UFP	Unités formant des plages
UV	Ultra-violet
V	Volume

# Introduction

# INTRODUCTION

## 1. Etude bibliographique

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* est une bactérie des levains lactiques thermophiles, où elle se trouve généralement associée à divers lactobacilles (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *L. helveticus*). A ce titre, elle joue un rôle prépondérant dans un certain nombre de fabrications fromagères (en particulier les fromages à pâte cuite) et dans la fabrication du yaourt.

Les fromages à pâte cuite sont traditionnellement fabriqués dans les régions s'étendant de part et d'autre du Jura et des Alpes, en France et dans les pays voisins. Citons, par exemple, en France, le Gruyère de Comté, le Beaufort et l'Emmental de Savoie, en Suisse, l'emmental et le sbrinz, en Italie, le grana (parmesan). Hors de cette zone, qui perpétue encore des modes de production du lait et de fabrication du fromage proches de ceux d'antan, on trouve des fabrications dont le caractère industriel est nettement affirmé (ateliers mécanisés traitant de grands volumes de lait, techniques standardisées pouvant comporter un affinage des fromages sans croûte, sous film). C'est le cas, par exemple, du *Swiss cheese* américain, de l'emmental finnois ou, en France, de l'emmental fabriqué depuis environ 2 décennies en Bretagne et en Normandie. En 1991, la production française de fromages à pâte cuite dépassait 250 000 T et représentait 18% du tonnage total des fromages fabriqués. Les levains lactiques thermophiles sont également utilisés pour fabriquer de nombreux autres types de fromages, plus ou moins égouttés, en particulier en Italie (par exemple, le gorgonzola). En France, on emploie des levains contenant *S. salivarius* subsp. *thermophilus* dans la fabrication industrielle de certains fromages à pâte molle, pour obtenir des produits à caractéristiques particulières, sensiblement différentes de celles des fromages analogues fabriqués avec les lactocoques.

Le yaourt, quant à lui, constitue l'archétype du produit de consommation de masse. Il s'est développé de façon spectaculaire dans de nombreux pays d'Europe et d'Amérique, c'est-à-dire hors de ses régions d'origine, l'Asie Centrale et l'Europe du Sud-Est, où subsistent encore des fabrications artisanales, voire archaïques. En France, par exemple, la production industrielle du yaourt a doublé en 10 ans et elle approchait le million de tonnes en 1991.

## 1.1. Taxonomie

*S. salivarius* subsp. *thermophilus* est un streptocoque dont l'individualisation au rang d'espèce et la position taxonomique ont été imposées dès 1919 par Orla-Jensen. Il s'agit d'un streptocoque que l'on isole presque exclusivement du lait et de certains produits laitiers fermentés. Son phénotype (tableau 1) se caractérise par un petit nombre de sucres fermentés (glucose, lactose, saccharose et, rarement, galactose), par sa thermophilie (il ne se développe pas à une température inférieure à 20°C, mais croît bien à 40–45°C, et est encore souvent capable de pousser à 50°C), sa thermorésistance (65°C, 30 min), et sa sensibilité à la salinité et à divers inhibiteurs. Cet ensemble de caractères le différencie assez aisément des autres streptocoques que l'on trouve dans le lait, les lactocoques et les entérocoques. Il a en particulier longtemps figuré dans le groupe "fourre-tout" dénommé *viridans*, faute de posséder un antigène de groupe décelable par la méthode de Lancefield.

L'avènement des techniques de la taxonomie moléculaire, au cours des 2 dernières décennies, a conduit un certain nombre de taxonomistes à réévaluer la position taxonomique de ce streptocoque thermophile. Il a ainsi été vérifié qu'il ne possédait qu'une homologie ADN-ADN réduite (45 à 50 %) avec les autres streptocoques (Ottogalli, 1979; Jarvis & Jarvis, 1981). En 1984, Farrow & Collins rapprochaient *S. thermophilus* de *S. salivarius*, au vu de l'homologie ADN-ADN, du GC% et des profils des chaînes d'acides gras. La proposition de ces auteurs, qui considéraient *S. salivarius* subsp. *thermophilus* comme une sous-espèce de *S. salivarius*, était officiellement entérinée à cette époque et demeure encore en vigueur actuellement. Toutefois, elle a été vivement combattue par d'autres taxonomistes (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1987) qui admettaient mal de rapprocher des germes que les phénotypes et les niches écologiques (lait pour l'un et cavité buccale pour l'autre) séparaient si bien. Ultérieurement, Schleifer *et al.* (1991) ont montré qu'il n'existait qu'une homologie réduite (29 à 46 %) entre l'ADN de la souche-type de *S. salivarius* subsp. *salivarius* et les ADN de 25 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* et ces auteurs ont proposé de revenir au *statu quo ante*, c'est-à-dire à l'espèce *S. thermophilus*. Une conclusion analogue a été émise par Bentley *et al.* (1991), après avoir comparé les séquences des ARNr 16S des 2 sous-espèces. Ces nouvelles propositions ont de bonnes chances d'aboutir officiellement, dans un avenir proche.

**Tableau 1.** Principaux caractères génotypiques et phénotypiques de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

	Caractère		Observations
G E N O T Y P E	Contenu de l'ADN G+C	Voisin de 40 %	riche en AT, mais il n'y a pas de différence nette avec les autres streptocoques.
	Homologie des acides nucléiques	Il est différent des streptocoques voisins.	En accord avec le bien fondé de l'espèce <i>S. thermophilus</i> . La parenté avec <i>S. salivarius</i> est remise en question.
	Parenté d'enzymes isofonctionnelles (aldolase) de différentes souches	Avec celles de <i>S. lactis</i> : oui.	Pas de différence nette avec les lactocoques.
	Morphologie	Cellules sphériques ou ovoïdes, en paires ou en longues chaînes. Polymorphisme prononcé dans les cultures âgées.	
	Ecologie	Lait et produits laitiers fermentés.	
P H E N O T Y P E	Croissance à 10°C	-	Le caractère thermophile et la thermorésistance le différencient nettement des lactocoques, qui cultivent à 10°C mais pas à 45°C et qui ne sont pas thermorésistants.
	Croissance à 45°C	+	
	Thermorésistance (65°C, 30 min)	+	
	Croissance en présence de NaCl 2%	-	Très sensible au sel, il s'oppose nettement aux streptocoques fécaux, qui cultivent en présence de 6,5 % de sel.
	Groupe sérologique	Absence d'antigène de groupe.	Différence essentielle avec les lactocoques (groupe sérologique N) et les streptocoques fécaux (groupe sérologique D).
	Hydrolyse de l'arginine	(-)	Nombre de <i>S. lactis</i> et la plupart des streptocoques fécaux sont +.
	Uréase (Juillard <i>et al.</i> , 1988)	+	En désaccord avec la description de Farrow & Collins (1984).
Fermentation des sucres#			
* fructose, glucose, lactose, saccharose	+	Petit nombre de sucres fermentés. Préférence marquée pour les disaccharides, lactose et saccharose.	
* arabinose, galactose, maltose, raffinose, xylose	(-)		
* tréhalose, inuline, glycérol, mannitol, sorbitol	-		
Action sur le lait tournesolé	Acidification rapide, Coagulation et réduction lente (ACr).	Cette réaction le différencie des autres streptocoques isolés du lait et des produits laitiers, en particulier des lactocoques (RAC).	

# + Caractère positif chez au moins 90% des souches.

(-) Caractère négatif chez une grande majorité des souches.

- Caractère négatif chez au moins 90% des souches.



## 1.2. Activités métaboliques importantes pour la technologie

En technologie laitière, les levains lactiques thermophiles ont 2 fonctions. La première est d'assurer la transformation du lactose en acide lactique, et donc d'abaisser le pH du lait et du caillé de fromagerie. Ce rôle est déterminant dans le cas du yaourt dont le pH final se situe à une valeur inférieure ou égale à 4, car un pH bas empêche le développement des germes indésirables et des germes pathogènes. Dans le cas des fromages à pâte cuite, l'acidification favorise la synérèse du caillé, sous presse. Après l'égouttage sous presse, si tout s'est bien passé, l'extrait sec est alors suffisamment élevé (61 à 62 %) et le pH suffisamment bas (pH voisin de 5,2) pour que le fromage puisse ensuite subir, avec succès, une longue période d'affinage (Accolas *et al.*, 1980; Mocquot, 1979). Des méthodes d'évaluation de l'activité acidifiante, fondées sur un suivi automatique du pH au cours de la croissance bactérienne (Spinnler & Corrieu, 1989), ont été développées en remplacement des méthodes traditionnelles de mesure de l'acidité titrable du lait. Au niveau industriel, Chamba & Prost (1989) ont évalué les propriétés acidifiantes des souches utilisées dans la fabrication du fromage, en les soumettant à un cycle thermique analogue à celui de la fabrication des fromages à pâte cuite.

La seconde fonction du levain est de contribuer aux qualités organoleptiques du produit obtenu. Dans le cas du yaourt, ce rôle est primordial puisque la consistance, le goût et l'arôme proviennent essentiellement du métabolisme du levain lactique. Dans le cas des fromages, les cellules des bactéries lactiques vont se lyser au cours de l'affinage et libérer des systèmes enzymatiques. Ceux-ci participeront à l'affinage en donnant naissance à des composés sapides ou à des précurseurs d'arôme qui, eux, conduiront aux caractéristiques organoleptiques propres du fromage affiné. Dans le cas du yaourt, l'évaluation de la formation d'arôme repose généralement sur la mesure de la production d'acétaldéhyde, tandis que la texture est déterminée par la mesure de la viscosité dans le lait (Zourari *et al.*, 1991).

Les activités métaboliques de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, qui sont responsables de l'acidification et, dans le cas du yaourt, de la flaveur et de la texture, sont présentées dans les paragraphes suivants.

### 1.2.1. Métabolisme des glucides

#### ► Transport du lactose et du galactose

Le mécanisme de transport du lactose, chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, est différent de celui des lactocoques. Ces derniers possèdent un système spécifique pour transporter le lactose à l'intérieur de la cellule, le système de la phosphotransférase

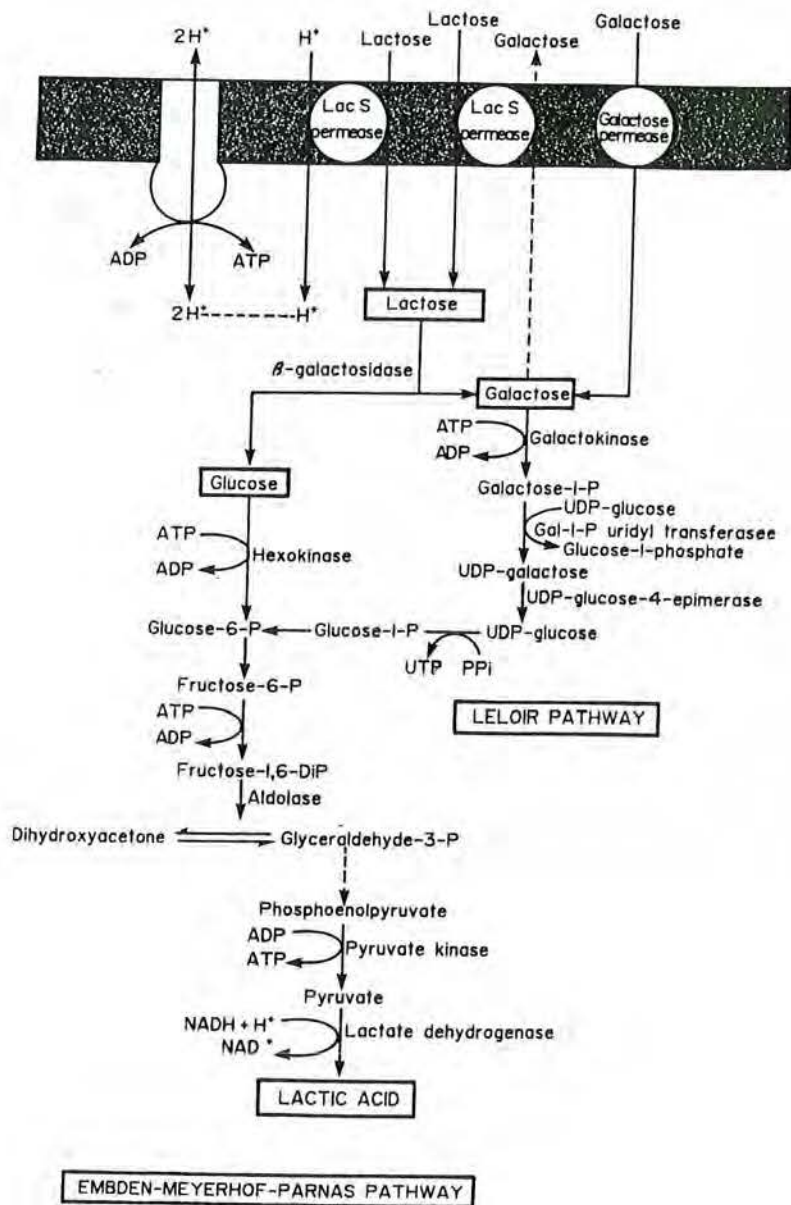


(PTS), dépendante du phosphoénolpyruvate (PEP); le lactose-6-phosphate ainsi formé est hydrolysé par une phospho- $\beta$ -galactosidase en glucose et galactose-6P, qui sont ensuite métabolisés en acide lactique. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ne possède ni système de transport du lactose du type PTS, ni phospho- $\beta$ -galactosidase, mais un système de transport lié à la force protonmotrice (Poolman *et al.*, 1989). La  $\beta$ -galactosidase de cette bactérie a en effet été purifiée et caractérisée (Smart *et al.*, 1985). La présence d'une  $\beta$ -galactosidase suggère que le lactose est transporté dans la cellule sous forme non phosphorylée (Hutkins & Morris, 1987). Le clonage et l'expression du gène codant pour la lactose-perméase de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ont été obtenus chez un mutant déficient d'*Escherichia coli* (Poolman *et al.*, 1989). La comparaison des séquences d'acides aminés a montré que la protéine correspondante et la lactose-perméase d'*E. coli* présentaient de grandes différences. La partie N terminale présente de l'homologie avec le système de transport du mélibiose présent chez *E. coli*, et la partie C terminale, de l'homologie avec 3 systèmes PTS-PEP différents.

Le galactose, qui est rarement fermenté par le streptocoque thermophile (voir ci-dessous), joue un rôle prépondérant dans le transfert du lactose. La présence de grandes quantités de galactose dans le milieu inhibe le transport du lactose. Récemment, Foucaud & Poolman (1992) ont montré que la protéine lacS catalyse aussi bien le transport du lactose et l'excrétion d'un proton que l'échange de composés homologues et hétérologues. Leurs résultats suggèrent que le système catalyse préférentiellement le transport du lactose et l'excrétion du galactose dans les conditions physiologiques. Après épuisement du lactose du milieu, le même système de transport catalyserait alors l'entrée du galactose dans les cellules.

► **Voies métaboliques de l'utilisation du lactose, du glucose et du galactose.**

La figure 1 résume les voies proposées pour le transport du lactose et du galactose et leur utilisation par *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Dans la cellule, la  $\beta$ -galactosidase hydrolyse le lactose en glucose et en galactose. Cette enzyme est une protéine de 105 kDa dont le gène a été localisé sur un fragment chromosomique de 3,85 kb (Herman & McKay, 1986). Le glucose réprime la synthèse de cette enzyme, et lorsqu'il est présent, il est directement utilisé suivant la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).



**Figure 1.** Voies métaboliques proposées pour le transport et l'utilisation du lactose et du galactose chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (d'après Zourari *et al.*, 1992)

P : phosphate, PEP-PTS : système de la phosphotransférase dépendante du phosphoénol-pyruvate.

Un point important à souligner est que la majorité des souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* sont gal- et qu'elles excrètent le galactose dans le milieu (Hutkins & Morris, 1987). Le galactose est métabolisé suivant la voie de Leloir qui implique une galactokinase, une galactose-1-phosphate-uridylyl-transférase et une uridine-5-diphospho-glucose-4-épimérase. Les 2 dernières enzymes sont constitutives et présentes dans toutes les souches, que celles-ci soient gal+ ou gal- (Thomas & Crow, 1983). La différence des 2 phénotypes semble être due à une différence dans l'activité de la galactokinase et/ou dans celle de la galactose-perméase. Les 2 enzymes sont inductibles par le galactose et réprimées par le glucose (Hutkins *et al.*, 1985a & b).

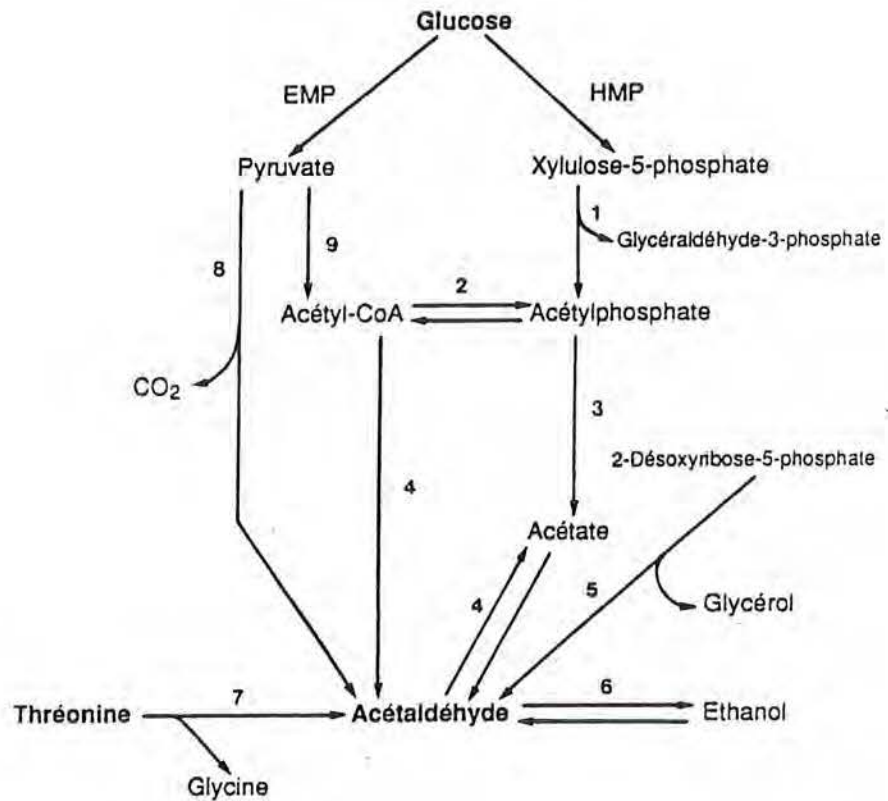
Il est possible de sélectionner des mutants gal+, dans un milieu contenant une quantité limitée de lactose (Thomas & Crow, 1984). L'utilisation de souches gal+ en fabrication fromagère diminue la quantité de galactose résiduelle et évite les problèmes technologiques résultant de la présence de ce sucre (brunissement, fermentation tardive du galactose avec production éventuelle de gaz et développement d'une flore indésirable, génératrice d'un goût et d'une texture défectueux).

### 1.2.2. Voies métaboliques de synthèse de l'acétaldéhyde

*S. salivarius* subsp. *thermophilus* n'utilise, pour la synthèse de l'acétaldéhyde, ni la voie d'EMP, ni la voie des hexoses monophosphates (HMP), mais emprunte la voie de la thréonine-aldolase (Fig. 2). Cette enzyme permet la formation d'acétaldéhyde et de glycine à partir de la thréonine (Marranzini *et al.*, 1989). Deux souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* étudiées par Raya *et al.* (1986) se caractérisaient par une activité désoxyriboaldolasique, qui permet la synthèse d'acétaldéhyde à partir de l'ADN.

### 1.2.3. Production de polysaccharides

Très peu d'études ont porté sur la caractérisation et la production de ces polymères responsables du caractère dit "épaississant", mis à profit dans la fabrication des yaourts brassés (Cerning, 1990). Cerning *et al.* (1988) ont étudié plus particulièrement un polysaccharide, produit par *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, qui est composé de galactose (55%), de glucose (25%), de mannose (15%) et de traces de rhamnose, de xylose et d'arabinose. Le caractère épaississant apporté par les cultures de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* est souvent très instable, mais cette instabilité ne serait pas liée à la perte d'un plasmide (Cerning, 1990) et serait donc d'origine chromosomique.



**Figure 2.** Représentation schématique des voies de synthèse de l'acétaldéhyde (d'après Raya *et al.*, 1986)

- 1 Phosphocétolase
- 2 Phosphotransacétylase
- 3 Acétate-kinase
- 4 Aldéhyde-déshydrogénase
- 5 Désoxyribose-aldolase
- 6 Alcool-déshydrogénase
- 7 Thréonine-aldolase
- 8  $\alpha$ -carboxylase
- 9 Pyruvate-déshydrogénase

EMP : Voie d'Emden-Meyerhof-Parnas  
HMP : Voie des hexoses monophosphates



#### 1.2.4. Activité protéolytique

##### ► Utilisation des protéines

L'activité protéolytique, chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, est généralement très réduite. Une métalloprotéinase a été mise en évidence chez cette espèce (Desmazeaud, 1974) et Meyer *et al.* (1989) ont localisé une faible activité caséinolytique, à la fois cytoplasmique et membranaire. De même, une protéase pariétale est présente chez 3 souches qui se développent rapidement dans le lait (Shahbal *et al.*, 1991 & 1993).

##### ► Utilisation des peptides

Différents types d'amino-peptidases ont été décrits chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. L'une d'elles, la X-prolyl-dipeptidylaminopeptidase a été purifiée et bien caractérisée. Cette enzyme est composée de 2 sous-unités et sa masse moléculaire est de 165 kDa. Son activité maximale se situe à des pH compris entre 6,5 et 8,2 (Meyer & Jordi, 1987).

##### ► Exigences en acides aminés

*S. salivarius* subsp. *thermophilus* est exigeant principalement en acide glutamique, en histidine et en méthionine, ainsi qu'en cystéine, en valine, en leucine, en isoleucine, en tryptophane, en arginine et en tyrosine (Bracquart *et al.*, 1978). Le système de transport des acides aminés branchés a été étudié. Il s'agit d'un transport actif qui nécessite une source d'énergie exogène (Akpemado & Bracquart, 1983).

#### 1.3. Phénomènes de protocoopération entre les bactéries des levains lactiques thermophiles dans le lait

Des phénomènes de protocoopération ont été décrits entre *S. salivarius* subsp. *thermophilus* et les lactobacilles, en particulier avec *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, dans le cas du yaourt. Cela se traduit, en culture mixte, par une stimulation de la croissance des 2 germes et de la production d'acide.

##### ► Stimulation de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

La quantité d'acides aminés et de peptides libres du lait est insuffisante pour promouvoir la croissance maximale de la plupart des souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* qui ne possèdent, nous l'avons mentionné, qu'une activité protéolytique exocellulaire faible. Au contraire, le lactobacille dégrade les caséines du lait, grâce à sa protéase pariétale (El Soda & Desmazeaud, 1982) et fournit ainsi au streptocoque des

acides aminés et des peptides directement assimilables (Radke-Mitchell & Sandine, 1984; Zourari *et al.*, 1992).

#### ► Stimulation des lactobacilles

La croissance des lactobacilles serait stimulée par la production d'acide formique secrété par *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, à partir du pyruvate (Juillard *et al.*, 1987). La production de CO<sub>2</sub>, consécutive au métabolisme de l'urée, est également un facteur stimulant de la croissance des lactobacilles (Driessen *et al.*, 1982).

### 1.4. Inhibition due à des composés microbiens

La synergie entre streptocoques et lactobacilles, évoquée ci-dessus, n'est pas toujours observée ou n'est pas toujours la seule interaction en cause. La production de composés antimicrobiens (bactériocines ou antibiotiques), de même que la compétition vis-à-vis des substrats, peuvent également jouer un rôle primordial dans les cultures mixtes. Smaczny & Krämer (1984a) ont ainsi mis en évidence 2 bactériocines produites par 2 souches isolées du lait cru.

### 1.5. Les différents types de levains lactiques thermophiles

Deux types de levains lactiques thermophiles sont classiquement distingués (Accolas *et al.*, 1980):

**Les levains artisanaux (*mixed strain starters*)**, dits aussi levains naturels, sont des levains mixtes dont la composition est variable et mal connue, car la flore lactique de ces préparations n'est ni sélectionnée, ni normalisée. Elle est fréquemment composée de plusieurs espèces de lactobacilles (*L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* et, de façon moins constante, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *L. acidophilus*) et de streptocoques (*S. salivarius* subsp. *thermophilus* et, parfois, des streptocoques fécaux). Ces levains mixtes sont propagés, de façon traditionnelle, dans les petites fromageries du Jura et des Alpes. Ce sont, généralement, des macérations de caillettes de veau, préalablement séchées à l'air, dans du lactosérum prélevé chaque jour dans la cuve de fromagerie, au terme de la fabrication. Ces macérations constituent à la fois, pour l'artisan fromager, la source d'enzyme coagulante (la présure) extraite des caillettes et le levain résultant du développement de la flore lactique thermophile, pendant la macération à température élevée (40–45°C). Les levains artisanaux sont bien adaptés aux fabrications locales traditionnelles, mais leur



composition est difficile à maîtriser et leur activité acidifiante est souvent soumise, en conséquence, à des variations aléatoires.

**Les levains sélectionnés (*single* ou *multiple strain starters*)** sont composés d'une ou de plusieurs souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* et de lactobacilles (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et subsp. *lactis*, *L. helveticus*). Ces souches sont sélectionnées pour leurs caractères technologiques (activité acidifiante dans le lait, éventuellement résistance aux phages, etc.). Ces levains sont surtout utilisés dans la fabrication industrielle des fromages à pâte cuite et du yaourt. Ils sont souvent employés sous forme de concentrés congelés ou lyophilisés.

## 1.6. Génétique

La génétique de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* a fait l'objet de 2 revues détaillées récentes (Mercenier & Lemoine, 1989; Mercenier, 1990), mais son développement demeure encore limité. Cela provient vraisemblablement des particularités de ce streptocoque, par exemple de la rareté des plasmides et de l'absence concomitante de fonctions d'intérêt technologique codées par des plasmides (par exemple, la fermentation du lactose ou la synthèse des polysaccharides), à la différence des lactocoques. Cela dit, le transfert naturel des gènes par conjugaison plasmidique ou par transduction phagique est possible chez cette espèce. Le transfert artificiel, quant à lui, par transformation de sphéroplastes ou par électroporation, peut également être mis en oeuvre.

La taille du génome de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* a été estimée à 1,7 Mb (Le Bourgeois *et al.*, 1989) et, pour la souche A054, à 1,8 Mb (Roussel *et al.*, 1992). Différents gènes, qui codent pour des enzymes du métabolisme, ont été localisés sur le génome de la souche A054. De même, les gènes *rec A* et 2 *loci*, *var A* et *var B*, qui représentent un polymorphisme génomique intraspécifique, ont été positionnés sur la carte génomique de cette souche.

Poolman *et al.* (1989) ont réalisé une étude détaillée de l'expression et de la localisation des gènes impliqués dans le transfert et le métabolisme du lactose et du galactose. Signalons aussi que le plasmide pA33 de 6,9 kb est le seul qui ait été jusqu'à présent totalement séquencé (Mercenier, 1990). Sa localisation, intra ou extra-chromosomique selon les clones, entraîne une modification concomitante du phénotype (taille des colonies, longueur des chaînettes de cellules, résistance aux aminoglycosides comme la kanamycine, sensibilité aux phages).

### 1.7. Les bactériophages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

La réussite des fabrications fromagères et de la préparation des yaourts dépend du bon déroulement de la fermentation lactique. Tout facteur susceptible de ralentir ou d'arrêter l'acidification est générateur de difficultés au cours de la fabrication, et est fréquemment à l'origine de produits défectueux. C'est le cas des bactériophages (ou phages) des bactéries lactiques qui sont, en pratique, les principaux agents responsables des retards et des arrêts d'acidification. Dans le cas des fabrications fromagères, le lait est encore transformé cru (fabrications traditionnelles) ou ne reçoit qu'un traitement thermique limité, une "thermisation", inférieur à la pasteurisation (fabrications industrielles). De plus, les procédés de fabrication comprennent généralement de nombreuses étapes en atmosphère ouverte, où les risques de contamination phagique par l'air surtout, par le personnel ou par les équipements, sont élevés. Enfin, la taille des fromageries industrielles –certaines transforment chaque jour des volumes de lait atteignant le million de litres– introduit un facteur multiplicateur très favorable au développement phagique (Lawrence & Thomas, 1979). Dans le cas du yaourt, les contaminations phagiques sont moins à craindre dans les ateliers les mieux équipés parce que 1) le traitement thermique du lait détruit les phages présents dans le lait cru, 2) la fabrication et le conditionnement, réalisés dans des chaînes aseptiques, à l'abri de l'air, préviennent les contaminations aériennes et 3) l'augmentation de la viscosité du lait à yaourt, à  $\text{pH} \leq 5,2$  et l'absence d'égouttage, à la différence de la fromagerie, limitent la multiplication et la dispersion des phages dans l'atelier de fabrication. Les contaminations phagiques relèvent alors d'accidents (Stadhouders *et al.*, 1984 & 1988) ou dérivent des souches lysogènes présentes dans le levain. Dans ce cas, les phages tempérés présents peuvent attaquer une autre souche du levain (indicatrice sensible) ou donner naissance à des mutants virulents capables de surinfecter et de lyser la souche parentale (Zourari *et al.*, 1992).

Les premiers accidents de fabrication, qui mettaient en cause des phages spécifiques des bactéries lactiques thermophiles, ont été décrits dans les années 50, alors que les premiers phages des lactocoques étaient connus, eux, depuis les années 30 (Whitehead & Cox, 1935). Les 2 premiers phages spécifiques de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ont été isolés par Pette & Kooy (1952), aux Pays-Bas, à la suite d'un accident de fabrication survenu dans une usine à yaourt. Peu après, d'autres phages spécifiques de l'espèce ont été isolés de lactosérums de fromagerie ou de levains contaminés par des phages (Deane *et al.*, 1953; Kiuru & Tybeck, 1955). Des phages ont à nouveau été impliqués dans des accidents de fermentation affectant le yaourt (Pette, 1957; Ciblis, 1970a & b; Gélin *et al.*, 1970; Reinbold & Reddy, 1973; Verhue,

1978). En outre, Reddy (1974) a montré que des techniques de recherche adéquates permettaient de mettre en évidence des phages spécifiques des bactéries des levains lactiques thermophiles, beaucoup plus fréquemment qu'on ne l'imaginait auparavant. Enfin, diverses observations portant sur la biologie des phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, notamment sur leur exigence en ions calcium, ont également été faites à cette époque (Sozzi, 1972; Sozzi & Maret, 1975; Sozzi *et al.*, 1976).

La caractérisation des phages au niveau moléculaire a été entreprise au cours des années 80. Kivi *et al.* (1987) ont étudié la morphologie, les spectres d'hôtes, les protéines structurales et les propriétés sérologiques de 9 phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* isolés en Finlande. Krusch *et al.* (1987) ont étudié la morphologie et les spectres de 90 phages isolés en Allemagne, en France et en Suisse et, par la suite, Neve *et al.* (1989) ont poursuivi une étude plus complète sur 12 de ces phages, choisis comme les plus représentatifs de leur collection. Ils les ont classés en 3 sous-groupes par l'analyse de leur génome et de leurs protéines de structure. Le sous-groupe I est composé de 2 phages (P6 et P8), qui possèdent les mêmes protéines de structure et des génomes dont les tailles respectives sont de 41,2 et 44,2 kb; une homologie est observée entre les 2 génomes. Le sous-groupe II est composé d'un seul phage, a10/J9, dont l'ADN présente une homologie de 40% avec les ADN des autres phages. Le sous-groupe III contient 9 phages (dont les 3 phages, 55/15, 71St15 et 124/44 que nous avons inclus dans notre étude). La taille de leur génome varie de 33,8 à 36,7 kb et l'une de leurs protéines de structure est d'une taille comparable à celle d'une protéine de structure des autres phages étudiés.

Prévots *et al.* (1989) ont comparé 23 phages virulents de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* isolés en France, sur la base de leur morphologie, de leur spectres d'hôtes, de leurs protéines structurales, des profils de restriction de leurs ADN ainsi que des pourcentages d'homologie. Ils ont ainsi classés ces 23 phages en 2 sous-groupes apparentés au niveau génomique, qui correspondent aux 2 profils protéiques précédemment décrits par Neve *et al.* (1989). On retiendra aussi qu'aucune homologie n'a été observée entre les ADN des phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* étudiés par Prévots *et al.* (1989) et les ADN des phages d'autres espèces de bactéries lactiques, le phage mv1 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Mata *et al.*, 1986) et les phages  $\phi$ T189 et  $\phi$ 936 de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Relano *et al.*, 1987). Peu après, Benbadis *et al.* (1990a) ont caractérisé 7 phages, par l'hybridation ADN-ADN et par l'analyse de leurs protéines structurales, et ils les ont classés en 2 sous-groupes apparentés. En outre, ils ont montré que de l'homologie existe entre l'ADN des 7 phages de leur collection et l'ADN de phages représentatifs des 3 groupes de la collection de Neve *et al.* (1989). Des profils protéiques similaires ont également été retrouvés. Deux phages représentatifs de la collection de Benbadis,  $\phi$ 17 et  $\phi$ 29, ont été



intégrés dans notre étude. La cartographie de 2 autres phages du streptocoque thermophile, appartenant à 2 sous-groupes apparentés, a récemment été réalisée (Larbi *et al.*, 1990). Les auteurs ont montré que la différence entre les 2 génomes est située sur un fragment *HindIII* de 1,5 kb.

Tous les phages étudiés jusqu'à présent forment un ensemble relativement homogène. Un morphotype prédominant a été trouvé, qui appartient à la famille des *Siphoviridae* de Matthews (1982) ou au groupe B de Bradley (1967). Il se caractérise par une tête isométrique (50–60 nm) et une queue non contractile assez longue (200–300 nm). Au plan moléculaire, 2 ou 3 types phagiques sont distingués. Pour chacun d'eux, des profils protéiques identiques ou très proches et une forte homologie génomique sont retrouvés. De l'homologie existe également, mais à un moindre degré, entre les différents types phagiques. Cela suggère à Mercenier (1990) que tous les phages étudiés jusqu'à présent, pourraient dériver d'un ancêtre commun. La diversité des génomes phagiques, observée par les différents auteurs, résulterait de multiples remaniements survenus au cours du temps, dans la population phagique.

#### ◆ La lysogénie

La lysogénie est longtemps demeurée peu étudiée dans le cas de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Des souches lysogènes ont été détectées à plusieurs reprises (Ciblis, 1970; Kurmann, 1979 & 1983; Smaczny, 1983; Smaczny & Krämer, 1984b), mais ces travaux sont restés sans suite. Plus récemment, Neve *et al.* (1990) ont mis en évidence 2 souches lysogènes, en sondant les génomes de 17 souches avec l'ADN phagique d'un phage virulent. Ces 2 souches sont inductibles avec la mitomycine C (MC) et produisent des particules phagiques qui ont pu être propagées sur des souches guéries, dérivées des souches inductibles. Les 2 phages tempérés présentent le même profil de restriction et ont un génome linéaire de 45 kb. De l'homologie est retrouvée avec l'ADN du phage virulent P55 décrit par Neve *et al.* (1989). Enfin, Carminati *et al.* (1992) ont trouvé une souche lysogène inductible avec la MC, parmi les 45 souches qu'ils ont examinées. Le phage tempéré correspondant possède un ADN linéaire double brin de  $40,9 \pm 0,5$  kb, dont la cartographie a été réalisée. Une seule souche a été trouvée sensible.

## **1.8. Les mécanismes de la résistance phagique chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus***

Quatre modes de résistance phagique ont été décrits chez les lactocoques, où ces mécanismes sont les mieux connus (Sanders, 1988). Il s'agit de la déficience d'adsorption, de l'immunité lysogénique, des systèmes de restriction-modification et de l'infection abortive. Certains de ces mécanismes ont également été mis en évidence chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

### **1.8.1. Déficience de l'adsorption**

La première étape de l'infection est l'adsorption des particules virales sur la bactérie et elle nécessite la présence de récepteurs spécifiques dans les enveloppes bactériennes. Deux souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, NST1 et NST9, résistantes au phage  $\phi$ B1.2, ont été examinées pour leur capacité à adsorber ou non ce phage (Larbi *et al.*, 1992). Les résultats obtenus montrent que la souche NST9 adsorbe bien le phage  $\phi$ B1.2, alors que la résistance de la souche NST1 est due, par contre, à l'altération ou à l'absence du récepteur spécifique du phage.

### **1.8.2. Infection abortive**

L'infection abortive est une inhibition de l'infection phagique qui intervient alors que l'adsorption du virus sur la bactérie et les phases précoces de son cycle lytique sont déjà accomplies (Duckworth *et al.*, 1981). Un système de ce type, thermo-sensible, a été décrit chez la souche NST5 de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (Larbi *et al.*, 1992). Le mécanisme est actif sur 2 phages virulents à 42°C, mais inactif à 30°C. La taille et le nombre de plages de lyse sont en effet sensiblement augmentés à cette dernière température. Des résultats préliminaires indiquent qu'il existerait, dans la souche NST5, un mécanisme agissant sur la maturation du phage, similaire à celui que code le plasmide pTR2030, chez *L. lactis* subsp. *lactis* (Sing et Klaenhammer, 1990).

### **1.8.3. Systèmes de restriction/modification (R/M)**

Plusieurs types de systèmes de R/M ont été mis en évidence. Les systèmes de R/M de type II sont les plus simples et sont composés d'enzymes de restriction et de modification indépendantes. L'ADN est restreint au niveau du site reconnu par l'enzyme. Les 2 autres systèmes, ceux de type I et III, sont organisés en complexes multienzymatiques. Le site de coupure de l'ADN est éloigné du site de fixation du

complexe enzymatique. Chez *E. coli*, aucun des gènes codant pour des systèmes R/M de type II n'a été localisé sur le chromosome, alors que la localisation plasmidique a été démontrée dans quelques cas.

Solaiman & Somkuti (1990) ont été les premiers à purifier partiellement et à caractériser une endonucléase de restriction de type II, chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. L'enzyme est un isoschizomère de *HpaII* et reconnaît la séquence 5'CCGG3'. La présence de cette enzyme n'a pas été corrélée avec l'existence d'un système R/M actif sur les phages. Benbadis *et al.* (1990b) ont isolé et purifié, à partir d'une souche de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, une endonucléase de type II appelée SthTI. Il s'agit d'un isoschizomère de *BstNI* qui reconnaît la séquence 5'CC(A/T)GG3'. Les auteurs ont établi une corrélation entre la présence de cette enzyme et l'existence d'un système R/M dans la souche à partir de laquelle l'enzyme a été extraite. Henry *et al.* (1990) ont mis en évidence une activité endonucléasique de type II chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. L'étude de 2 souches a montré que l'activité est présente à tous les stades de la croissance et est corrélée avec la présence d'un système R/M actif sur les phages (Guimont, communication personnelle). L'enzyme serait analogue à *BstNI*. La présence de systèmes R/M a été également mise en évidence chez 2 autres souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (Larbi *et al.*, 1992).

Aucun mécanisme d'antirestriction, analogue à ceux qui sont présents chez les coliphages, n'a encore été mis en évidence chez les phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Mais de tels systèmes sembleraient exister chez certains phages (Larbi *et al.*, 1992).

Grâce aux méthodes développées par différents auteurs (Chassy *et al.*, 1988; Mercenier *et al.*, 1988; Mercenier & Lemoine, 1989), le clonage des gènes codant pour de tels systèmes R/M, chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, est envisageable. Des gènes codant pour d'autres mécanismes, lorsque ceux-ci seront mieux caractérisés, pourront également être introduits, pour augmenter la résistance phagique des souches industrielles composant les levains lactiques thermophiles sélectionnés.



## 2. Présentation du sujet

Au début du présent travail, la part de la lysogénie dans la génèse des infections phagiques affectant *S. salivarius* subsp. *thermophilus* demeurait encore très peu documentée. C'est pour cette raison qu'il nous a paru utile d'examiner le problème de la lysogénie chez cette espèce, en mettant à profit la collection CNRZ de bactéries lactiques de notre laboratoire. Plusieurs questions se posaient alors. Quelle est la fréquence de la lysogénie? Pourquoi les souches lysogènes ne sont-elles pas retrouvées facilement? Existe-t-il des phages tempérés aisément inductibles à partir des souches lysogènes qui les hébergent? Quel est le mode de la lysogénie, chez cette espèce? Quel est le degré de parenté et d'homologie entre les phages tempérés et les phages isolés comme lytiques?

Pour répondre à ces questions, nous avons, dans un premier temps, constitué une collection de souches et une collection de phages tempérés et de phages virulents représentatifs. Nous avons ensuite mis au point les conditions de propagation de ces phages sur les souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Nous avons alors comparé leurs morphologies et leurs profils protéiques. Nous nous sommes également intéressés aux génomes des phages tempérés et à ceux des phages virulents; leur degré d'homologie a été analysé. L'étude a également porté sur les interactions entre les phages et les souches de notre collection. Quel est le degré de sensibilité des souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*? Les souches lysogènes ont-elles un comportement particulier? L'immunité lysogénique représente-t-elle, chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* comme chez d'autres bactéries lactiques, un appoint de la résistance phagique?

## **Matériel et méthodes**

# MATERIEL ET METHODES

## MICROBIOLOGIE

### 1. Bactéries et Bactériophages

#### 1.1. Bactéries

Les souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* utilisées au cours de ce travail sont présentées dans les tableaux 2a et 2b. Les souches d'espèces différentes sont regroupées dans le tableau 3. La souche *E. coli* HB101:pNST21 a été utilisée dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Génétique et Microbiologie de l'Université de Nancy I (fig. 3).

#### 1.2. Bactériophages

Les bactériophages étudiés sont répertoriés dans le tableau 4, pour les phages tempérés et dans le tableau 5, pour les phages isolés comme lytiques dans des ateliers à yaourt ou dans des fromageries, incluant des phages représentatifs de diverses collections.

La souche de propagation de chacun des phages, utilisée en routine, est indiquée, ainsi que la souche qui a permis, initialement, d'isoler le phage correspondant. Le code OR est accolé au nom du phage lorsque celui-ci a été multiplié dans sa souche d'isolement.

Les prophages sont dénommés par le n° CNRZ de la souche lysogène, précédé d'un 0. Dans la présentation des résultats, nous établirons une distinction entre, d'une part, les phages tempérés (où les ADN phagiques) natifs obtenus après induction des prophages des souches lysogènes et, d'autre part, les phages tempérés (où les ADN phagiques) obtenus après propagation de ces phages sur leurs souches indicatrices. De même, on distinguera les phages virulents (ou les ADN phagiques) propagés sur leur souche d'isolement et les phages virulents (ou les ADN phagiques) multipliés sur la souche de propagation utilisée en routine, au cours de l'étude.

**Tableau 2a.** Dénomination et origine des souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, utilisées fréquemment pendant le présent travail

Souche N°CNRZ	Autres dénomina- tions	Origine
7 *	NCDO 2635	Yaourt, France, avant 1958
22 *	NCDO 2636	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1959
25 *		Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1960
26 *		"
27 *	NCDO 2637	Bioghurt, Pays-Bas, 1960
160 *	TJ IL 1558 CIP 67.57 NCDO 1611 NCDO 2564	Levain commercial à yaourt, France, 1954
161 *	NCDO 489 NCIB 8779 DSM 20479	NIRD (Shinfield, Royaume Uni), avant 1954
302 *	1A NCDO 2638 IL 559	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1964
307 *	CS1 NCDO 2639	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1963
308 *	BS2 NCDO 2640	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1963
309 *	2A NCDO 2641	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1964
310 *	4A NCDO 2642	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1964
312 *	BC	Levain, Royaume Uni, J. Tramer. Reçue en 1968
366 *	BY52	Yaourt. Reçue en 1969
368 *	Sts	Levain à yaourt. Reçue du NIZO (Pays-Bas) en 1970
385 *	Bz3	Yaourt sucré Yakult, Japon, 1971



Tableau 2a (suite)

Souche N°CNRZ	Autres dénomina- tions	Origine
386*	S14	Levain commercial à yaourt, France, 1971
387 *	S35	"
388 *	S37	"
389 *	S40	"
390 *	S45	"
391 *	SFi	"
402 *	SYN1	"
403 *	SAY1	"
404 *	SBY1	"
405 *	SCY1	"
406 *	S/SD	"
407 *	SDFx	"
408 *	SY41	"
409 *	STEM	"
439 *	SY126	"
440 *	S10	Levain commercial à yaourt, France, 1972
441 *	R11	"
445 *		Levain commercial à emmental, France, 1973
446 *	INA 175 IL 443	Yaourt, France, 1963
447 *	INA 178 IL 73	Yaourt, France, 1963
455 *	SF	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1973
456 *	SCH	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1972
457 *	SC	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1971

Tableau 2a (suite)

Souche N°CNRZ	Autres dénomina- tions	Origine
461 *	III	Lait fermenté Biogarde, France, 1975
463 *	SMO	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1974
464 *	S3	Levain commercial à yaourt, France, avant 1975
701 *	S.T. VALIO	Levain lactique à emmental, Finlande, début des années 50. Reçue de E. Tybeck en 1974
702 *	Sth	Yaourt au lait de brebis, Grèce, 1973
703 *	Bla	Tarag, lait fermenté de la République Popu- laire de Mongolie. Isolée en 1974
736 *		Yaourt, France, 1978
748 *	SD	Yaourt, France, avant 1978
756 *		Levain commercial à yaourt, France, 1978
757 *		"
758 *	18	Levain commercial à yaourt, Bulgarie, 1978
759 *	14	"
760 *	12	"
761 *		Levain commercial à yaourt, France, 1978
778 *	St12	Levain commercial à yaourt, Bulgarie, 1979
779 *	EP3	Levain commercial à yaourt, France, 1979
780 *		"
781 *	EP12	"
782 *	EP2	"
783 *		"
784 *	SCF1	"
884 *	ST3	Levain commercial à yaourt, France, 1984
885 *	ST5	"

Tableau 2a (suite)

Souche N° CNRZ	Autres dénomina- tions	Origine
886 *	ST8	Levain commercial à yaourt, France, 1984
887 *	ST9	"
888 *	ST28	"
889 *	STPM	"
1005 *	B	Lait pasteurisé, Pays-Bas, 1984
1066 *		Levain commercial à yaourt, France, 1986
1068 *		"
1100 *	K68	Levain commercial à yaourt, France, 1988
1119 *	1DI	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France Reçue en 1987
1120 *	1G5	"
1151 *	1CI	"
1152 *	2CI	"
1153 *	2DI	"
1154 *	1BI	"
1155 *	1BI	"
1156 *	ZS013A11	Yaourt artisanal au lait de brebis, Grèce, 1987
1157 *	ZS113A4	"
1197 *	ZS051B4	"
1198 *	ZS071A8	"
1199 *	ZS081A4	"
1200 *	ZS111A4	"
1201 *	ZS063A6	"
1202 *	ZS083A10	"
1203 *	ZS093A7	"
1204 *	ZS103A11	"



Tableau 2a (suite)

Souche N°CNRZ	Autres dénomina- tions	Origine
1205 *	ZS113A6	Yaourt artisanal au lait de brebis, Grèce, 1987
1206 *	ZS034A1	"
1207 *	ZS044A2	"
1208 *	ZS044A4	"
1209 *	ZS074A2	"
1210 *	ZS074A15	"
1211 *	ZS084A7	"
1212 *	ZS084A11	"
1213 *	ZS084A12	"
1237 *	ZS023A7	"
1358 *	NCDO 573 NCIB 8510 ATCC 19258 DSM 20617 CIP 102303 CNRZ 1446 CNRZ 1529 CNRZ 1530	Souche type, lait pasteurisé, Royaume Uni, vers 1947. Reçue de la NCFB en 1990
1359 *	NCDO 1242	Levain commercial de fromagerie. E. Tybeck, Valio, Finlande, 1958. Reçue de la NCFB en 1990
1400 *	StL	Yaourt, France, 1990
1401 *	StB	"
1443 *	StQ	"
1446 *	ATCC 19258 NCDO 573 NCIB 8510 DSM 20617 CIP 102303 CNRZ 1358 CNRZ 1529 CNRZ 1530	Souche type, lait pasteurisé, Royaume Uni, vers 1947. Reçue de l'ATCC en 1990
1447 *	S81	Dahi, lait fermenté d'Inde. Isolée par Nestec, en 1983. Reçue en 1990



Tableau 2a (suite)

Souche N°CNRZ	Autres dénomina- tions	Origine
1492 *		Yaourt, Indonésie, 1990
1524 *	ATCC 19987	Levain commercial de fromagerie. E. Tybeck, Valio, Finlande, 1958. Reçue de l'ATCC en 1990
<u>1529</u> *	CIP 102303 NCDO 573 ATCC 19258 DSM 20617 NCIB 8510 CNRZ 1358 CNRZ 1446 CNRZ 1530	Souche type, lait pasteurisé, Royaume Uni, vers 1947. Reçue de la CIP en 1990
<u>1530</u> *	DSM 20617 NCDO 573 ATCC 19258 NCIB 8510 CIP 102303 CNRZ 1358 CNRZ 1446 CNRZ 1529	Souche type, lait pasteurisé, Royaume Uni, vers 1947. Reçue de la DSM en 1990
1575	S19	Fromage à pâte molle, Italie, années 60. Reçue de T. Sozzi (Nestlé), en 1974
1589	S265	Levain artisanal à emmental, France, début des années 70. Reçue de T. Sozzi (Nestlé), en 1974
1592	71	Yaourt, Allemagne, 1987. Reçue de H. Neve (Kiel), en 1991
<u>1598</u> *	21A	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1959. Clone réisolé à partir de CNRZ 21, formant des colonies de type A. Voir CNRZ 21, tableau 2b
<u>1599</u>	21B	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1959. Clone réisolé à partir de CNRZ 21, formant des colonies de type B. Voir CNRZ 21, tableau 2b
1600 *	24A	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1960. Clone réisolé à partir de CNRZ 24, formant des colonies de type A'. Voir CNRZ 24, tableau 2b

**Tableau 2a** (fin)

Souche N°CNRZ	Autres dénomina- tions	Origine
<u>1601</u>	24B	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1960. Clone réisolé, à partir de CNRZ 24, formant des colonies de type B'. Voir CNRZ 24, tableau 2b
<u>1690</u>		Souche CNRZ 312 lysogénisée avec le phage tempéré 01209, qui avait été propagé sur la souche-hôte lysogène CNRZ 701
1707		Souche CNRZ 1205 guérie de son prophage, 01205
1715		Souche CNRZ 1690 guérie de son prophage, 01690

\* Souches dont l'ADN a été analysé par la technique dite du "transfert en goutte".

Les souches lysogènes sont soulignées.

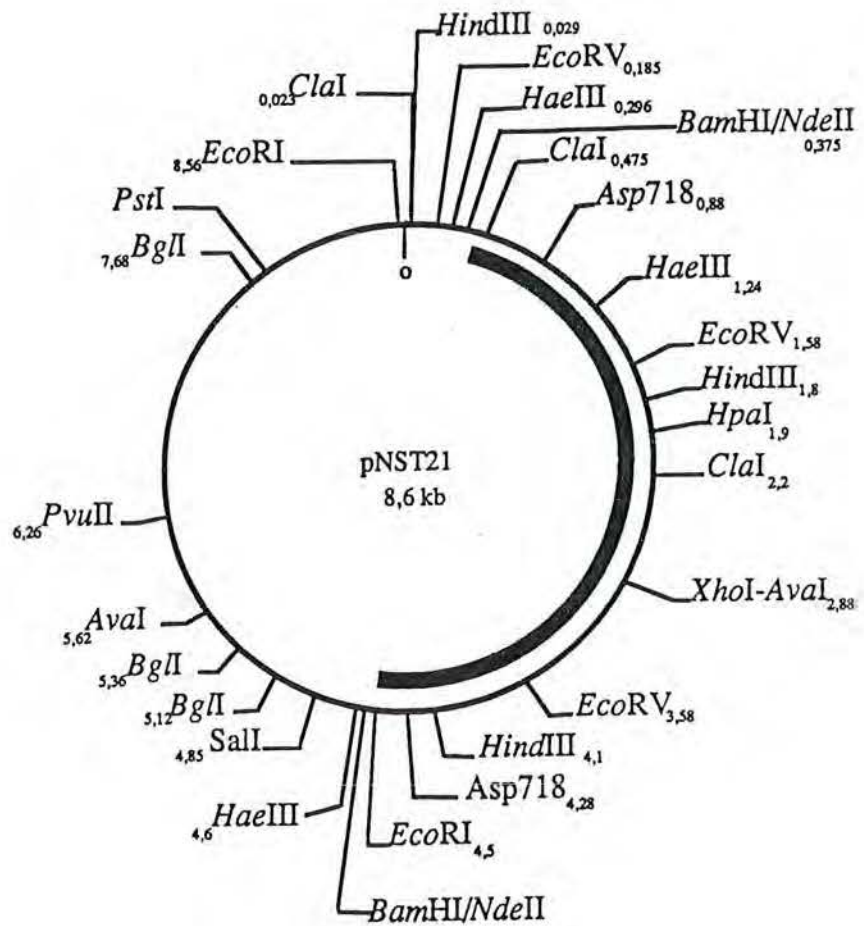
**Tableau 2b.** Dénomination et origine des autres souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, utilisées au cours du présent travail

Souche N°CNRZ	Autres dénomina- tions	Origine
21	CIP 67.56 NCDO 2563	Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1959
24		Levain artisanal à Gruyère de Comté, France 1960
1576	1S19	Fromage à pâte molle, Italie, années 60. Reçue de T. Sozzi (Nestlé) en 1974
1577	S38	"
1578	S53/65	"
1579	S73/65	"
1580	S99	"
1582	S110	"
1583	S133	"
1584	S161	"
1585	S215	"
1586	S221	"
1587	L12	"
1588	24	"
1590	S85	"
1591	55a	Levain commercial, Allemagne, 1986. Reçue de H. Neve (Kiel), en 1991
1593	124	"
1594	Sc 1232	Levain artisanal, Autriche, 1979. Reçue de H. Sebastiani (Rotholz), en 1991
1595	Sc 1304	"
1596	BSN 10 A054	Levain à yaourt, France. Reçue de L. Benbadis (Le Plessis-Robinson), en 1991
1597	BSN 60	"

**Tableau 3.** Liste des souches d'espèces différentes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, utilisées au cours du présent travail

Espèce	Souche	Origine
<i>Enterococcus faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> , souche type	CNRZ 137	NCDO 581
<i>Enterococcus</i> sp. non identifié	CNRZ 1402	
<i>Clostridium perfringens</i> (ADN)	D5139	Sigma
<i>Escherichia coli</i>	HB101:pNST21 TG1	Colmin et al., 1991 CNRZ 1663
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CNRZ 65 CNRZ 328 CNRZ 1096	Jura ATCC 15807 NCDO 1844
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , souche type	CNRZ 105	Souche HP, Nouvelle- Zélande
<i>Micrococcus luteus</i> (ADN)	D5014	Sigma
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> , souche type	CNRZ 1459	NCDO 1779
Souches incertaines et atypiques	CNRZ 411 CNRZ 412	Levains à yaourt, France





**Figure 3.** Carte de restriction du plasmide pNST21. (—): ADN de pBR322; (▬): insert d'ADN spécifique de l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, provenant d'une souche industrielle (d'après Colmin *et al.*, 1991)

**Tableau 4.** Liste des phages tempérés isolés au cours du présent travail

Phage	Souche contenant le prophage inducible avec la MC (N° CNRZ)	Souche de propagation (N° CNRZ)
0701 *	701	1205
01198	1198	<b>1597</b>
01200	1200	<b>1597</b>
01205	1205	<b>1707</b>
01209 *	1209	701
01210 *	1210	701
01358 *	1358	1205
01529	1529	1205
01530	1530	1205
01598 *	1598	1205
01599 *	1599	1205
01601 *	1601	1205, <b>1443</b>
01690 *	1690	<b>312</b>

\* Phages examinés lors de l'établissement des spectres des hôtes bactériens.

Les souches de propagation non lysogènes sont en caractères gras.

**Tableau 5.** Liste des phages isolés comme lytiques, qui ont été étudiés au cours du présent travail

Phage	Souche d'isolement (N° CNRZ)	Souche de propagation de routine (N° CNRZ)	Origine	Collection
b6 *	447	447	Yaourt, France, 1966. Isolé par R. Chevalier	INRA
c20 *	446	1151	Yaourt, France, France, 1964. Isolé par R. Chevalier	"
sc *	457	<u>1205</u>	Lpc (gruyère), France, 1975	"
sch *	456	<u>1205</u>	"	"
sf *	455	<u>1205</u>	Lpc (gruyère), France, 1974	"
st2 *	440	<u>1205</u>	Yaourt, France, 1972	"
21-B10 *	<u>21</u>	<u>1205</u>	Lpc (emmental), France, 1987	"
368-B4 *	368	<u>1205</u>	"	"
368-B8 *	368	<u>1205</u>	"	"
440-B4 *	440	<u>1205</u>	"	"
440-B8 *	440	<u>1205</u>	"	"
447-B4 *	447	447	"	"
447-B11*	447	<u>1205</u>	"	"
701-B2 *	<u>701</u>	<u>1205</u>	"	"
701-B3 *	<u>701</u>	<u>1205</u>	"	"
701-B8 *	<u>701</u>	<u>1205</u>	"	"
701-B12*	<u>701</u>	<u>1205</u>	"	"
1151-B1*	1151	1151	Lpc (emmental), France, 1987	"
1151-B3*	1151	<u>1205</u>	"	"

Tableau 5 (suite)

Phage	Souche d'isolement (N° CNRZ)	Souche de propagation de routine (N° CNRZ)	Origine	Collection
1151-B4*	1151	1151	Lpc (emmental), France, 1987	INRA
1151-B7*	1151	<u>1205</u>	"	"
1151-B10*	1151	1151	"	"
1151-ITG*	1151	1151	Lpc (gruyère), France, 1991	"
1152-B10*	1152	<u>1205</u>	Lpc (emmental), France, 1987	"
1205-BAM*	<u>1205</u>	<u>1205</u>	Lpc (sbrinz), Suisse, 1991	"
BaL12 *	1587	<u>1205</u>	Lpm, Italie, années 60	T. Sozzi (Nestlé)
BaS19 *	1575	1575	"	"
Ba1S19 *	1576	<u>1205</u>	"	"
Ba24 *	1588	1151	"	"
BaS38 *	1577	<u>1205</u>	"	"
BaS73 *	1579	<u>1205</u>	"	"
BaS85 *	1590	<u>1205</u>	"	"
BaS99 *	1580	<u>1205</u>	"	"
BaS102 *	1581	<u>1205</u>	"	"
BaS110 *	1582	<u>1205</u>	"	"
BaS161 *	1584	<u>1205</u>	"	"
BaS215 *	1585	<u>1205</u>	"	"
BaS221 *	1586	<u>1205</u>	"	"
BaS265 *	1589	1589	Levain à emmental, France, début 70	"
P-1232	1594	<u>1205</u>	Lpc (emmental), Autriche, 1986. Reçu en 1991	H. Sebastiani (Rotholz)



Tableau 5 (fin)

Phage	Souche d'isolement (N° CNRZ)	Souche de propagation de routine (N° CNRZ)	Origine	Collection
P-1304	1595	<u>1205</u>	Levain (emmental) Autriche, 1986. Reçu en 1991	H. Sebastiani (Rotholz)
φ1 *	887	887	Lpc, Franche-Comté, 1976	BCH <sup>◄</sup> , France
φ2 *	887	887	Lpc, Franche-Comté, 1977	"
φ3 *	888	<u>1205</u>	Lpm, Lorraine, 1977	"
φ4 *	888	<u>1205</u>	Lpc, Bretagne, 1975	"
φ5 *	888	<u>1205</u>	Lpc, Franche-Comté, 1976	"
φ8 *	884	<u>1205</u>	Lpm, Bretagne, 1973	"
φ9 *	884	<u>1205</u>	Lpm, Lorraine, 1973	"
φ11 *	885	<u>1205</u>	Lpc, Rhône-Alpes, 1974	"
φ17	1596	<u>1205</u>	Yaourt, France. Reçu en 1991	L. Benbadis (BSN)
φ29	1597	1597	"	"
NCDO-01242 *	1359	<u>1205</u>	Finlande, 1958. Reçu de la NCFB en 1990	E. Tybeck (Valio)
tv *	<u>701</u>	<u>1205</u>	Levain à emmental, Finlande, début des années 50. Reçu de E. Tybeck en 1974	"
55/15 *	1591	<u>1205</u>	Yaourt, Allemagne. Reçu en 1991	H. Neve (Kiel)
71/St15*	1592	1592	"	"
124/44 *	1593	447	"	"

Lpc : Lactosérum de fromage à pâte cuite  
Lpm : Lactosérum de fromage à pâte molle

\* Phages examinés lors de l'établissement des spectres d'hôtes bactériens

◄ BCH : collection particulière

Les souches lysogènes sont soulignées

## 2. Milieux de culture

### 2.1. Lait tournesolé

Il est préparé avec du lait écrémé en poudre, exempt d'antibiotique (lait instantané Elle et Vire), à raison de 100 g de lait sec et de 0,75 g de poudre de tournesol (Difco) dans 1000 ml d'eau distillée. Le milieu est stérilisé à 110°C pendant 10 min.

### 2.2. Bouillons et milieux gélosés

#### 2.2.1. Milieu Elliker (Elliker *et al.*, 1956)

Le milieu complexe Elliker de Biokar est employé sous 3 formes : bouillon, gélose dure (12 g de gélose par l) et gélose molle (6 g de gélose par l). Le milieu est tamponné par l'addition de 1,9 % (m/v) de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium. Les différents milieux sont autoclavés à 120°C pendant 15 min. Pour propager les phages, les milieux sont complétés extemporanément avec une solution stérile 1M de  $\text{CaCl}_2$ , afin d'obtenir une concentration finale de  $10^{-2}\text{M}$  (Elliker- $\text{Ca}^{2+}$ ).

#### 2.2.2. Milieu M17 (Terzaghi & Sandine, 1975)

Le milieu complexe M17 de Biokar est utilisé sous forme de bouillon, complété (pour propager les phages) ou non par du  $\text{CaCl}_2$  à une concentration finale de  $10^{-2}\text{M}$ . Le milieu M17, préparé selon l'annexe A, est utilisé pour l'étude de l'autolyse. Les milieux sont stérilisés à 115°C pendant 20 min.

#### 2.2.3. Milieu LB

La souche *E. coli* HB101:pNST21 est cultivée sur le milieu complet LB (Maniatis *et al.*, 1982), en présence d'ampicilline (concentration finale, 50  $\mu\text{g/ml}$ ).

### **3. Purification, conservation et conditions de culture des souches**

#### **3.1. Souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus***

Au début du travail, les souches de la collection CNRZ de Jouy-en-Josas (tableaux 2a et 2b) ont été purifiées par 3 réisolements successifs sur gélose Elliker.

Les souches, une fois réisolées, sontensemencées à 2% dans du lait tournesolé et sont conservées, non incubées, à  $-20^{\circ}\text{C}$ . En fonction des besoins, les souches congelées sont utilisées, après une décongélation rapide à  $42^{\circ}\text{C}$ , pour inoculer à 2% des précultures. Celles-ci sont alors incubées à  $42^{\circ}\text{C}$  pendant 16 h, dans un milieu convenable, et sont utilisées pour inoculer à 1% la culture proprement dite.

#### **3.2. Souche d'*E. coli***

Pour la conservation, on utilise une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance ( $\text{DO}_{600}$ : 0,5), qui est additionnée de glycérol stérile [50% (v/v)] et aussitôt congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Au fur et à mesure des besoins, les cultures congelées sont utilisées pour inoculer à 2% des précultures dans du bouillon LB, qui sont incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 4 h. Ces précultures, en phase stationnaire, sontensemencées à 1% dans du bouillon LB pour obtenir la culture proprement dite. La croissance bactérienne est suivie par lecture de la  $\text{DO}_{600}$  (une unité de DO correspond à  $5 \cdot 10^8$  cellules/ml).

### **4. Recherche et mise en évidence des phages tempérés**

Cent-dix souches de la collection CNRZ sont traitées en phase exponentielle de croissance ( $\text{DO}_{650}$ : 0,12 à 0,15) avec la MC, à raison de  $0,2 \mu\text{g}$  par ml de culture. Après 5 h d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  dans un biophotomètre de Bonet, Maury et Jouan, comme l'ont décrit Cluzel *et al.* (1987), les cultures, lysées ou non, sont filtrées stérilement sur filtre Millipore ( $0,45 \mu\text{m}$ ).

#### **4.1. Souches en apparence non inductibles (cultures non lysées)**

Cent surnageants de cultures non lysées ont été regroupés en 4 mélanges de 25 chacun. Les 110 souches de la collection ont alors été utilisées comme souches-test, pour la mise en évidence d'éventuels prophages induits. Trois ml de chacun des 4 mélanges sont ajoutés à 10 ml de bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup> préalablementensemencés avec 0,1 ml de la culture de la souche étudiée. Une culture témoin est réalisée en parallèle. Les tubes sont incubés à 37°C. Si nécessaire, 3 repiquages à 2% sont effectués, dès que la croissance est détectée visuellement dans les tubes témoins, pour mettre en évidence une lyse tardive. Si une lyse est observée avec l'un des mélanges, chaque surnageant de culture traitée avec la MC, constitutif de ce mélange, est alors éprouvé individuellement sur la souche étudiée, selon le protocole utilisé pour les souches inductibles. Certains surnageants, fortement inhibiteurs, ont été par la suite supprimés des mélanges et éprouvés comme il est indiqué dans le paragraphe suivant.

#### **4.2. Souches inductibles (cultures lysées)**

A 10 ml de bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup>, on ajoute 0,5 ml du lysat induit et filtré, et on ensemence avec 0,1 ml de chacune des 110 souches de la collection. Une culture témoin est faite en parallèle. Les tubes sont incubés à 37°C et sont repiqués 3 fois à 2%, si aucune lyse n'est observée. Dans le cas des surnageants "inhibiteurs", le test est également réalisé avec le surnageant dilué au 1/2 et au 1/4.

Pour tester le caractère lysogène des souches reçues tardivement, au cours du travail, nous avons procédé de la même façon. Après addition de la MC, les cultures sont incubées à 37°C pendant 5 h et, qu'elles soient lysées ou non, sont alors centrifugées et filtrées. Le filtrat est éprouvé, à raison de 0,5 ml par culture, sur un nombre réduit de souches indicatrices, sélectionnées précédemment (CNRZ 447, 701, 887, 1151, 1205, 1575 et 1589).

### **5. Phages isolés comme lytiques dans les laiteries**

La collection de phages isolés comme lytiques est présentée dans le tableau 5. Elle est constituée de la façon suivante:

► 25 phages de la collection de l'INRA, isolés en France. Deux d'entre eux avaient été isolés au cours des années 60 par R. Chevalier (INA, Paris), 4 par J.P. Accolas au cours des années 70 et 17 par Mara L Lanzanova, à la fin des années 80. Ces 17 phages



ont été isolés dans des lactosérums de fromagerie qui avaient été collectés, selon la technique de Reddy (1974), dans 85 fromageries d'emmental, en Bretagne, en Franche-Comté et dans la région Rhône-Alpes. Les lactosérums avaient été regroupés en quinze mélanges, chacun de 5 à 6 lactosérums d'une même région. Ces mélanges ont été centrifugés (centrifugeuse Sorvall, rotor GSA, 8 000 g, 30 min), stérilisés sous vide avec des plaques filtrantes (Seitz EKS) et éprouvés sur 24 souches CNRZ, choisies parmi les plus représentatives, de la même façon que les lysats inductibles (cf. paragraphe 4.2). La dénomination des phages ainsi isolés est constituée du numéro de la souche d'isolement suivi de la lettre B (pour bactériophage) et du numéro d'identification du mélange de lactosérums. Par exemple, le phage 368-B4 a été isolé avec la souche CNRZ 368, à partir du quatrième mélange.

Deux phages, 1151-ITG et 1205-BAM, ont été isolés, au cours de la présente étude, à partir de lactosérum prélevé en fin de fabrication, l'un dans une fromagerie française d'emmental de la région Rhône-Alpes et l'autre, dans une fromagerie suisse de sbrinz. Après filtration, 0,5 ml de sérum étaient ajoutés à 10 ml de bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup> préalablement ensemencé avec 0,1 ml de culture de la souche étudiée. Une culture témoin était réalisée en parallèle. Vingt souches de la collection CNRZ (368, 440, 447, 701, 784, 886, 887, 1151, 1152, 1197, 1200, 1205, 1209, 1237, 1400, 1443, 1597, 1598, 1600, 1601) ont été utilisées comme souches d'épreuve. La mise en évidence des phages était effectuée comme précédemment.

- ▶ 8 phages d'une collection particulière (BCH), isolés en France au cours des années 70.
- ▶ 2 phages de la collection d'Ethel Tybeck (Valio, Helsinki, Finlande), isolés au cours des années 50.
- ▶ 14 phages de la collection de T. Sozzi (Nestlé, Vers-chez-les-Blanc, Suisse), constituée au cours des années 60.
- ▶ 7 phages isolés plus récemment, au cours des années 80: 2 de la collection de L. Benbadis (BSN, Le Plessis-Robinson, France), 3 de la collection de H. Neve (*Bundesanstalt für Milchforschung*, Kiel, Allemagne) et 2 de la collection de H. Sebastiani (*Bundesanstalt für Alpenländische Milchwirtschaft*, Rotholz, Autriche).

## 6. Purification et numération des phages

Les phages détectés sont purifiés par 3 isolements successifs sur gélose Elliker-Ca<sup>2+</sup>, à partir de plages de lyse et sont ensuite multipliés sur bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup>. Les phages qui ne forment pas de plages, dans les conditions utilisées, sont purifiés par 3 multiplications successives dans du bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup>, selon la méthode de la dilution limite.

### ► dénombrement des phages sur gélose

La méthode dite de la "double couche", décrite par Adams (1959), est utilisée pour dénombrer les phages. Des dilutions décimales successives de la suspension initiale de phages sont effectuées en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , puis on prélève 100  $\mu\text{l}$  de la dilution et on y ajoute 100  $\mu\text{l}$  de la culture de bactéries sensibles, en phase exponentielle de croissance.

Après 15 min d'incubation à 37°C, pour favoriser l'adsorption des particules phagiques, le mélange est additionné de 4 ml de gélose molle- $\text{Ca}^{2+}$  et coulé à la surface de la boîte de Petri contenant de la gélose dure Elliker- $\text{Ca}^{2+}$  solidifiée. Dans le cas des souches qui ne produisent pas un tapis suffisamment abondant, la gélose molle est complétée avec du lait, à raison de 1,5 % du mélange. Les boîtes sont incubées pendant une nuit à 42°C, en anaérobiose, dans des jarres BBL avec le système Gaspack  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ . Les résultats sont exprimés en unités formant des plages par ml (UFP/ml).

### ► dénombrement des phages en milieu liquide

Des dilutions décimales du lysat initial sont réalisées et testées dans du bouillon Elliker- $\text{Ca}^{2+}$ , préalablement ensemencé à 1% avec la souche sensible. Le titre est donné par le tube de culture lysée correspondant à la plus forte dilution, après 3 repiquages.

## 7. Multiplication et conservation des phages

Les phages sont cultivés en inoculant leurs souches indicatrices à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1, la MOI étant définie comme le rapport nombre de particules phagiques/nombre de cellules bactériennes.

Les phages sont conservés à 4°C sous forme de lysats filtrés stérilement sur filtre 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore), dans du bouillon Elliker- $\text{Ca}^{2+}$ .

## 8. Recherche d'un nombre réduit de souches de propagation

Opérant avec une collection de 69 phages, c'est-à-dire un nombre relativement élevé, nous avons tenté de réduire au minimum le nombre de souches de propagation. Cela simplifiait le travail de préparation des lysats phagiques et devait aussi faciliter la comparaison des différents phages.

Le lysat de chaque phage, une fois enrichi sur sa souche d'isolement, a alors été éprouvé sur les 6 souches CNRZ test trouvées les plus sensibles aux phages lors d'une première étude (CNRZ 368, 440, 447, 1151, 1152 et 1205), à une multiplicité d'infection forte (MOI=10). Si nécessaire, 3 repiquages en bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup> étaient réalisés, en comparant leur évolution avec celle des repiquages témoins. Lorsqu'une lyse était observée avec plusieurs souches, le phage était purifié sur la souche de propagation qui permettait la multiplication du plus grand nombre de phages. Elle devenait ainsi **la souche de propagation de routine** pour le phage considéré. La purification en bouillon par la méthode des dilutions limites n'a été utilisée que lorsque les phages ne formaient pas de plages sur la souche sensible.

## 9. Lysogénisation de la souche CNRZ 312

Une culture de la souche CNRZ 312 est incubée à 37°C. Lorsqu'elle est en phase exponentielle de croissance (DO<sub>650</sub>: 0,3), elle est infectée avec le phage tempéré 01209 multiplié sur la souche CNRZ 701 (MOI=0,1) et l'incubation est poursuivie. Avant que la lyse ne se produise (elle intervient environ 2 h plus tard), afin d'éviter une production de lysine phagique dommageable pour les cellules, des dilutions de la suspension bactérienne sont étalées sur gélose Elliker-Ca<sup>2+</sup>. Après 2 jours à 37°C en anaérobiose, 100 des colonies formées sont prélevées et stockées à -20°C dans du lait tournesolé. Ces clones sont ensuite testés pour leur résistance au phage 01209 (propagé dans CNRZ 701), en employant une forte MOI (= 10), et pour leur inductibilité avec la MC. Les essais sont réalisés dans du bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup>. Les clones résistants et inductibles sont ensuite purifiés par 3 réisolements successifs sur gélose Elliker, la résistance au phage et l'inductibilité étant vérifiées à chaque étape. La souche CNRZ 1690, c'est-à-dire un clone dérivé de la souche CNRZ 312 qui héberge le phage 01209 (propagé auparavant sur la souche CNRZ 701), a ainsi été isolé et purifié. Le caractère lysogène a été vérifié par hybridation de l'ADN bactérien de ce clone dérivé, avec l'ADN du phage lysogénisateur.

## 10. Guérison des souches lysogènes CNRZ 1205 et 1690

Une culture de la souche à guérir est induite (DO<sub>650</sub>: 0,15) avec 0,2 µg de MC par ml. L'incubation est poursuivie à 37°C et 90, 105 et 120 min après l'addition de MC, une aliquote de la culture est prélevée. Cette aliquote est immédiatement diluée, pour éviter

que les clones guéris ne soient lysés par les phages produits, et 0,1 ml de la dilution  $10^{-2}$  est étalé sur gélose Elliker. Les boîtes de Petri sont incubées à 37°C, en anaérobiose, pendant 2 j. Deux cents colonies sont prélevées et stockées à -20°C, dans du lait tournesolé. Ces clones sont mis en présence du lysat d'induction de la souche à guérir, dans du bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup>. Les clones sensibles sont purifiés par trois réisolements sur gélose Elliker. Au troisième repiquage, la sensibilité du clone est à nouveau vérifiée. L'absence d'ADN du prophage dans l'ADN bactérien des clones purifiés est confirmée par l'absence d'hybridation avec l'ADN du phage natif, utilisé comme sonde.

## 11. Spectres d'hôtes

La sensibilité phagique des 116 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* a été éprouvée avec 59 des phages étudiés. Les autres phages ayant été reçu tardivement nous n'avons pas pu les inclure dans cette étude. Le test a été réalisé dans du bouillon Elliker-Ca<sup>2+</sup>, à 37°C, car il s'est révélé plus sensible que le test en gélose où l'obtention de zones ou de plages de lyse est souvent difficile, de même que la formation de tapis bactériens suffisamment abondants pour certaines des souches utilisées de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Afin d'alléger les manipulations, 10 mélanges de 6 phages ont préalablement été réalisés. Lorsqu'une souche est trouvée sensible à un mélange, chaque lysat phagique constitutif du mélange est alors testé sur la souche étudiée.

Les lysats étudiés contenaient entre  $10^8$  et  $10^9$  UFP/ml. La MOI au moment de l'infection était comprise entre 0,1 et 1. Si nécessaire, 3 repiquages étaient systématiquement réalisés pour mettre en évidence une lyse tardive. Pour 5 des phages, 2 souches de propagation différentes ont été utilisées pour établir les spectres d'hôtes bactériens correspondants (leur souche d'isolement et leur souche de propagation de routine). Les résultats ont ensuite été soumis à une analyse comparative, afin d'établir les parentés entre les phages et les souches et de procéder à des regroupements éventuels. Les données sont d'abord rassemblées dans une matrice (phages/souches) où elles sont notées 1 lorsqu'un phage est actif sur une souche et 0 lorsqu'un phage est inactif. Les indices de similarité (IS), d'une part pour les phages pris 2 à 2 et, d'autre part, pour les souches prises 2 à 2, sont calculés selon la méthode de Sokal et Michener (1958):

$$IS = (1,1) / (1,1) + (1,0) + (0,1)$$



La "distance" est calculée par traitement informatique selon la formule suivante:

$$\text{distance} = 1 - [IS] = 1 - (1,1) / (1,1) + (1,0) + (0,1)$$

Ce paramètre permet d'établir des groupes de parenté, d'une part entre les phages et, d'autre part, entre les souches. Deux matrices des distances, l'une pour les phages et l'autre pour les souches, ont ainsi été construites. Une représentation graphique de ces matrices a été faite sous forme de dendrogramme. La méthode de regroupement dite du saut maximum ou du lien complet, a été choisie comme étant la plus représentative des relations entre phages et bactéries.

## 12. Détermination du pourcentage d'adsorption

Nous nous sommes placés dans des conditions habituellement utilisées pour mesurer l'adsorption, c'est-à-dire avec une forte concentration bactérienne et une faible MOI, de façon à ce que 1) la probabilité de rencontre entre particules phagiques et cellules bactériennes soit proche de 1, et 2) toutes les particules phagiques puissent s'adsorber.

Trente ml d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ( $DO_{650}$ : 0,3) sont centrifugés pendant 10 min à 4 000 g (centrifugeuse Sorvall, rotor GSA, 5000 rpm). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 3 ml de milieu Elliker- $Ca^{2+}$  préchauffé à 37°C. Les phages sont alors ajoutés, à une MOI de 0,003. Après mélange, 100  $\mu$ l sont prélevés et ajoutés, avec 100  $\mu$ l de culture des bactéries indicatrices, à la gélose molle; celle-ci est aussitôt coulée sur une plaque de gélose dure Elliker- $Ca^{2+}$ . Après 5, 10, 15, 20, 25 et 40 min d'incubation à 37°C, 100  $\mu$ l du mélange sont prélevés, dilués dans 900  $\mu$ l de milieu et centrifugés à 12 000 rpm (centrifugeuse Sigma 201 M), pendant 3 min. Le surnageant est alors titré pour déterminer le nombre de phages résiduels, non adsorbés. Cela permet de déterminer le pourcentage d'adsorption  $PA = [(N_{t0} - N_t) / N_{t0}] \times 100$ , où  $N_{t0}$  est le nombre de phages ajoutés et  $N_t$  le nombre de phages non adsorbés au temps t.

### **13. Rendement unitaire de lyse**

Un ml de mélange phages–bactéries est préparé avec une MOI voisine de 0,01 et incubé 10 min à 37°C. La MOI utilisée doit être faible afin que la probabilité qu'une chaînette de streptocoques soit infectée par plusieurs particules phagiques soit la plus faible possible. La suspension est centrifugée 2 min à 12 000 rpm (centrifugeuse Sigma 201 M) pour séparer les phages non adsorbés. Le surnageant est titré. Le culot de bactéries est lavé avec du milieu Elliker préchauffé puis resuspendu dans 1,5 ml de milieu Elliker préchauffé, pour éviter que les phages libérés lorsque la lyse cellulaire débute, puissent s'adsorber de nouveau sur des cellules non infectées et y entreprendre un deuxième cycle de multiplication.

Après des essais préliminaires, les tubes des dilutions les plus adéquates de la suspension sont réalisés et incubés à 37°C. Toutes les 10 min, pendant 60 min, 100 µl de chaque dilution sont prélevés et dénombrés.

Les résultats sont exprimés en UFP par centre infectieux. Le nombre de centres infectieux est donné par le nombre de plages de lyse formées dans les premières minutes d'infection, le nombre d'UFP demeurant alors constant (phase d'éclipse). Le rendement cellulaire de lyse est déterminé par le rapport phages produits/nombre initial de centres infectieux.

### **14. Cycle de multiplication**

A 5 ml d'une culture de bactéries indicatrices en phase exponentielle de croissance ( $DO_{650}$ : 0,5), sont ajoutés 5 ml d'une suspension de bactériophages ( $10^8$  UFP/ml) et 10 ml de milieu Elliker–Ca<sup>2+</sup> préchauffé à 37°C. L'expérience est réalisée avec une MOI élevée, de façon que la croissance bactérienne ne masque pas la chute de la DO lors de la lyse et que toutes les bactéries soient lysées, au cours d'un cycle unique de multiplication phagique. L'évolution de la culture bactérienne est suivie toutes les 5 min par lecture de la  $DO_{650}$ , jusqu'à la lyse totale de la culture.

### **15. Thermorésistance des phages**

Un ml de suspension de phages ( $10^8$  UFP/ml) est incubé à 50, 60, 70, 80 et 90°C pendant 5 min. Les phages qui sont encore capables de former des plages de lyse sont ensuite dénombrés, pour chaque température étudiée.

## 16. Concentration des phages

### 16.1. Préparation de la souche indicatrice

La souche sensible est incubée à 42°C, dans du bouillon Elliker, jusqu'à une DO<sub>650</sub> de 0,5. La culture est alors centrifugée à 8 000 g (centrifugeuse Sorvall, rotor GSA, 7000 rpm), pendant 10 min à 4°C. Le culot bactérien est remis en suspension dans du bouillon Elliker–Ca<sup>2+</sup> correspondant à la moitié du volume de la culture initiale.

### 16.2. Essais préliminaires

Les essais préliminaires servent à déterminer le rapport optimal phages/bactéries, pour obtenir un titre maximal en phages. On met en contact 0,5 ml de la suspension de la souche sensible avec 0,5 ml de lysat de phage dilué au 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, pendant 15 min à 42°C. On ajoute 20 ml de bouillon Elliker–Ca<sup>2+</sup> dans chaque tube et l'incubation est poursuivie jusqu'à l'obtention éventuelle d'une lyse complète des cultures. Le rapport optimal est la dilution la plus forte du phage qui conduit encore à la lyse complète de la culture.

### 16.3. Production des phages

Le rapport optimal bactéries/phages, défini lors de l'essai préliminaire, est utilisé. Le même mode opératoire est suivi, avec un volume de culture de 500 ml. L'incubation est réalisée à 42°C, pendant 5 h environ. Pour la production des phages tempérés induits, 500 ml de culture bactérienne sont induits, comme il a été décrit dans le paragraphe 4. Dans les 2 cas, le protocole suivant est appliqué:

- élimination des débris bactériens par centrifugation à 2 000 g pendant 30 min à 4°C (centrifugeuse Mistral MSE 6L, 2 500 rpm).

- précipitation des phages du surnageant, selon la méthode de Yamamoto *et al.* (1970), par addition de NaCl (0,5 M final) et de polyéthylèneglycol (PEG 8 000, 10 % [m/v] final). La suspension est laissée pendant une nuit à 4°C puis centrifugée pendant 45 min à 2 000 g (centrifugeuse Mistral MSE 6L, 2 500 rpm), à 4°C.

- le culot, composé des particules phagiques et du PEG, est mis en suspension dans 30 ml de TM (tris 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,4) et laissé pendant 1 nuit à 4°C.

- élimination du PEG par centrifugation à 6 000 g pendant 20 min, à 20°C (centrifugeuse Sorvall, rotor SS–34, 7 000 rpm) et reprise du surnageant.

- ultracentrifugation du surnageant, contenant les phages, à 100 000 g (ultracentrifugeuse Beckman L8-55, rotor 70.Ti, 30 000 rpm) pendant 1 h à 20°C .

- le culot est additionné de 3 ml de tampon TM, pour la préparation du gradient de chlorure de césium (CsCl), ou de 1 ml de TM, pour l'extraction de l'ADN phagique. La suspension est laissée 1 nuit à 4°C, pour faciliter la remise en suspension des particules phagiques.

- purification des phages sur un gradient de CsCl préformé, qui est composé de 3 solutions de densité 1,7; 1,5 et 1,3 en tampon TM. Ces 3 solutions sont rangées par ordre de densité décroissante, de bas en haut, dans un tube Beckman *ultraclear quick seal* de 13,5 ml. Le tube est complété avec du tampon TM , scellé et centrifugé 1 h à 100 000 g à 20°C (centrifugeuse Beckman L8-55, rotor 70.1 Ti, 35 000 rpm).

La bande bleutée, formée par les particules phagiques dans la zone du gradient de densité voisine de 1,5, est prélevée et dialysée contre du tampon TMN (tris 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4), pendant une nuit à 4°C. La suspension est filtrée (filtre Millipore 0,45 µm) et conservée à 4°C, ou congelée à -20°C pour l'étude des protéines phagiques.

## 17. Microscopie électronique

Les observations sont faites à partir des suspensions phagiques préparées sur gradient de CsCl et diluées dans du tampon TM ou, parfois, à partir des lysats d'induction, dans le cas des phages tempérés. Les grilles de cuivre (marque Ladd modèle H1-301, 300 mesches à mailles carrées, diamètre 3mm) sont préalablement dégraissées par 3 lavages au chloroforme et 3 lavages à l'éther. Elles sont ensuite recouvertes d'un film de collodion et d'une couche de carbone. Elles sont déposées dans une goutte de suspension de phages et égouttées contre du papier filtre. Elles sont ensuite trempées dans une goutte de colorant [acétate d'uranyle à 2% (m/v)], rinçées dans de l'eau distillée (pH 4,5) et égouttées à nouveau. Les grilles sont observées avec un microscope électronique Zeiss EM 10 , sous une tension de 80 kV, à des grossissements de 40 000 à 80 000.

## 18. Etude des protéines phagiques

La technique utilisée est celle de Laemmli (1970), qui permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Le gel de polyacrylamide



[acrylamide/bisacrylamide=30/0,8 (m/m)] est formé d'un gel de concentration à 5% et d'un gel de résolution à 12%, contenant du sodium dodécylsulfate (SDS) à 1% (m/v). Il a une épaisseur de 1,5 mm.

Les suspensions phagiques, concentrées sur gradient de CsCl et dialysées, sont mises dans du tampon de dissociation [SDS 2,3% (m/v), glycérol 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoéthanol 5% (v/v), tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; bleu de bromophénol 0,01% (m/v)] et chauffées à 100°C pendant 5 min. L'électrophorèse est réalisée à 8 mA pendant 16h, dans du tampon tris-glycine [tris 20 mM, glycine 190 mM, SDS 1% (m/v), pH 8,6]. Toutes les électrophorèses ont été faites en conditions dénaturantes. Le gel, une fois démoulé, est fixé à l'acide acétique [2% (v/v)] pendant 1 h, coloré au bleu de Coomassie R250 [0,1% (m/v), éthanol 50% (v/v), acide acétique 7% (v/v)], puis décoloré avec une solution d'éthanol [15% (v/v)] et d'acide acétique [7% (v/v)].

## 19. Propriétés autolytiques des souches

Le caractère autolytique des souches est recherché selon le protocole décrit par Zourari (1991). Après décongélation rapide d'une suspension de la souche étudiée conservée à -20°C, du bouillon M17, préparé à partir des ingrédients (Cf. annexe 1), est inoculé à 5% avec la souche, puis incubé à 42°C pendant une nuit. Cette préculture est utilisée pour ensemercer à 1% du bouillon M17 constituant la culture proprement dite. L'incubation est réalisée à 42°C. La croissance et la lyse sont suivies par mesure de la DO<sub>650</sub> (spectrophotomètre Shimadzu UV 120-02). L'activité lytique est recherché selon le protocole décrit par Zourari (1991).

## **BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **1. Préparation des ADN**

#### **1.1. Extraction de l'ADN bactérien**

L'extraction de l'ADN chromosomique a été effectuée selon la méthode de Marmur (1961) modifiée par Colmin (1991).

Pour l'électrophorèse en champ pulsé, l'ADN a été préparé selon la méthode décrite par Roussel (Université de Nancy I, communication personnelle).

#### **1.2. Extraction de l'ADN phagique**

L'ADN phagique est extrait selon la méthode décrite par Maniatis *et al.* (1982). A 1 ml de lysat, dont le titre est compris entre  $10^9$  et  $10^{10}$  UFP/ml, sont ajoutés:

- de la désoxyribonucléase I et de la ribonucléase A (Gibco-BRL), à une concentration finale de  $2 \mu\text{g/ml}$ . On laisse agir à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 30 min.
- de la pronase (Sigma), à une concentration finale de  $500 \mu\text{g/ml}$ , en présence d'EDTA [5 mM, pH 8] et de SDS [0,1% (m/v)]. On laisse agir à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 30 min.

Après extraction des protéines avec du phénol-chloroforme (v/v), de l'acétate de sodium est ajouté à une concentration finale de 0,3 M. L'ADN est précipité avec de l'isopropanol (v/v), à  $-20^\circ\text{C}$ , pendant au moins 2 h et récupéré par centrifugation à 12000 rpm (centrifugeuse Sigma 201 M) pendant 10 min, à  $4^\circ\text{C}$ . Le culot est lavé à l'éthanol [70% (m/v)], puis séché. Il est ensuite resuspendu dans  $200 \mu\text{l}$  de TE (tris 10mM, EDTA 2 mM, pH 7,5).

#### **1.3. Préparation de l'ADN plasmidique d'*E. coli***

La technique de lyse alcaline des bactéries, décrite par Maniatis *et al.* (1982), a été utilisée pour les mini-préparations et les maxi-préparations d'ADN plasmidique d'*E. coli*. La forme ccc (*covalent closed circular*) du plasmide est isolée par centrifugation dans un gradient isopycnique de CsCl, en présence d'une concentration saturante de bromure d'éthidium (BET). Le BET est extrait avec du butanol 1 saturé en eau. L'ADN est précipité avec de l'isopropanol (v/v), à  $-20^\circ\text{C}$ , pendant au moins 2 h.

## 2. Analyse de l'ADN

### 2.1. Dosage de l'ADN

Deux méthodes sont utilisées:

- en gel d'agarose: l'ADN est dosé en gel d'agarose après coloration au BET ( $0,5\mu\text{g/ml}$ ), par comparaison de l'intensité avec un ADN de concentration connue.
- par lecture de la densité optique: une unité de  $\text{DO}_{260}$  correspond à la DO d'une solution d'ADN double brin à  $50\mu\text{g/ml}$ .

### 2.2. Hydrolyse de l'ADN par les endonucléases de restriction

Les conditions d'hydrolyse utilisées sont celles qui sont décrites par le fournisseur (Gibco-BRL). L'hydrolyse est arrêtée par addition du tampon de charge [saccharose 40% (m/v), bleu de bromophénol 0,25% (m/v)].

### 2.3. Electrophorèse en gel d'agarose

Le pourcentage d'agarose dans le gel est choisi en fonction de la taille des fragments à séparer et il varie, en conséquence, de 0,5 à 1%. La vitesse de migration est inversement proportionnelle au logarithme décimal de leur poids moléculaire. L'électrophorèse est effectuée dans un appareil à gel horizontal:

- soit dans du tampon TAE : tris-acétate 40mM; EDTA 2mM, pH 8, à un voltage de 1 V/cm pendant 16 h.
- soit dans du tampon TBE 1X : tris-borate 0,089 M; acide borique 0,089 M; EDTA 20mM, pH 8, à 5 V/cm pendant 5 h.

L'électrophorèse en champ pulsé a été effectuée en collaboration avec le Laboratoire de Génétique et Microbiologie de l'Université de Nancy I. Elle permet la séparation de fragments de haut poids moléculaire. La technique dite "CHEF" (*contour-clamped homogeneous electric fields*), décrite par Chu *et al.* (1986) a été utilisée, en employant l'appareil CHEF-DR II (Bio-Rad). L'électrophorèse du gel d'agarose à 1% (m/v) est réalisée dans du tampon TBE 1X, à 200 V/cm (temps de pulsation 1 à 5 sec) pendant 15 h.

La visualisation des bandes d'ADN se fait sous lumière UV, à 312 nm, après coloration du gel dans un bain contenant  $0,5\mu\text{g/ml}$  de BET.

## 2.4. Purification de l'ADN par "GeneClean"

Le kit "*GeneClean*" (Bio 101) permet de purifier rapidement de l'ADN en solution ou en gel d'agarose. La purification se fait en 3 étapes: adsorption de l'ADN sur des microparticules de silice, élimination des impuretés par 3 lavages successifs avec un tampon de rinçage et élution de l'ADN dans de l'eau distillée stérile.

## 2.5. "Transfert en goutte"

Des "transferts en goutte" sont réalisés à l'aide de l'appareil *Bio-Dot* (Bio-Rad) de filtration sous vide. Des volumes de suspension d'ADN, correspondant à 15 µg d'ADN bactérien, sont traités par une solution de dénaturation (NaOH 0,4 M; EDTA 10 mM), puis sont chauffés 5 min à 100°C. L'ADN dénaturé est déposé, après refroidissement rapide, sur une membrane de type *Zetaprobe* (Bio-Rad).

Les ADN sont fixés à la membrane dans une solution de NaOH 0,4 M. La membrane est rinçée dans du SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrate trisodique 0,03 M; pH 7), pour éliminer l'excès de soude et est stockée à 4°C.

## 2.6. Transfert de l'ADN des gels d'agarose par la méthode de Southern (1975)

Après électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose, les solutions de dépurination (HCl 0,25 M), de dénaturation (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) et de neutralisation (tris-HCl 0,5 M; NaCl 1,5 M; pH 7,5) sont successivement déposées sur le gel. Elles permettent le transfert de l'ADN simple brin sur la membrane de nylon type N+ (Amersham). Le transfert est effectué dans du SSC 20X. L'ADN est fixé sur la membrane dans une solution de NaOH (0,4 M), pendant 5 min. La membrane est rinçée dans du SSC 2X, séchée et conservée à 4°C.

# 3. Hybridation ADN-ADN

## 3.1. Marquage de l'ADN au <sup>32</sup>P par déplacement de césure

L'ADN est marqué par déplacement de césure (*nick translation*) avec le kit Gibco-BRL, en utilisant le nucléotide marqué [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP selon les instructions fournies. Le principe de la réaction repose sur l'action simultanée de la DNAase I et de la polymérase I d'*E. coli*, au niveau d'un ADN double brin (Rigby *et al.*, 1977). La DNAase I forme des entailles simple brin et la polymérase I hydrolyse les extrémités 5'



dans le sens 5'→3' et synthétise un nouveau brin en incorporant les désoxynucléotides triphosphates du milieu, dont seul le dATP est radioactif. L'activité spécifique des sondes ainsi préparées est, en moyenne, de  $1.10^8$  dpm/ng.

### 3.1.1. Hybridation

La membrane est préhybridée, pendant 3 h à 65°C, en présence de la solution suivante (Maniatis *et al.*, 1982), à raison de 5 ml/cm<sup>2</sup> de membrane:

- SSC 6X, SDS	0,5%
- Solution de Denhardt*	5X
- ADN de sperme de hareng (fragmenté mécaniquement et dénaturé)	100 mg/ml

\* Composition de la solution de Denhardt :

- Ficoll	0,02%
- Polyvinylpyrrolidone	0,02%
- Albumine sérique bovine	0,02%

L'hybridation a lieu pendant 1 nuit, à 65°C. La sonde est dénaturée par chauffage à 100°C pendant 5 min et elle est ajoutée à raison de 0,5 ng par ml de solution de préhybridation.

### 3.1.2. Lavages après hybridation

Après hybridation, les membranes sont lavées dans des conditions de forte stringence:

- deux fois 15 min à température ambiante, dans une solution de SSC 2X, SDS 0,1%.
- deux fois 15 min à 65°C, dans une solution de SSC 1X, SDS 0,1%.
- une fois 10 min à 65°C, dans une solution de SSC 0,1 X, SDS 0,1%.

## 3.2. Marquage de l'ADN simple brin par chimioluminescence

Pour des raisons de facilité, les sondes sont marquées par le système de marquage ECL (*Enhanced chemiluminescence*, Amersham). La peroxydase équine, complexée avec un polymère chargé positivement, est fixée de façon covalente à l'ADN simple brin qui sert de sonde.

### 3.2.1. Hybridation

L'hybridation ADN-ADN est réalisée à 42°C, selon les instructions du fournisseur.

### 3.2.2. Lavages après hybridation et détection

Les rinçages sont effectués en conditions stringentes. Les membranes sont lavées 2 fois 30 min à 42°C dans une solution d'urée 6 M, SSC 0,1X, puis 2 fois 5 min à température ambiante, avec du SSC 2X.

La sonde d'ADN simple brin, à laquelle est fixée la peroxydase, est visualisée à l'aide du kit de détection, en suivant les instructions du fournisseur. La peroxydase catalyse une réaction d'oxydation, celle du luminol. Cette réaction entraîne une émission de lumière, qui impressionne un film photographique. La sensibilité de la méthode permet de détecter 1 pg d'ADN.

### 3.3. Autoradiographie

Les membranes sont placées au contact d'un film Kodak (X-OMAT) ou Fuji (RX), dans une cassette d'autoradiographie.

Pour les hybridations radioactives, la cassette est stockée à -20°C. Un écran intensificateur est utilisé. Les films sont révélés après des temps variables d'exposition.

## 4. Préparation d'une banque d'ADN phagique dans le vecteur pBS

Le plasmide *Bluescript* SK (pBS) est un vecteur dérivé du pUC19 (fig. 4). La souche d'*E. coli* utilisée pour la transformation est la souche TG1. La souche est  $\beta$ galactosidase+ par  $\alpha$ -complémentation avec le plasmide pBS. Elle est déficiente en système R/M.

### 4.1. Préparation du vecteur

Le vecteur est linéarisé au site unique de clonage *Bam*H1. L'enzyme est éliminée par des extractions phénol-chloroforme et chloroforme. Le vecteur est dosé en minigel d'agarose et conservé à -20°C.

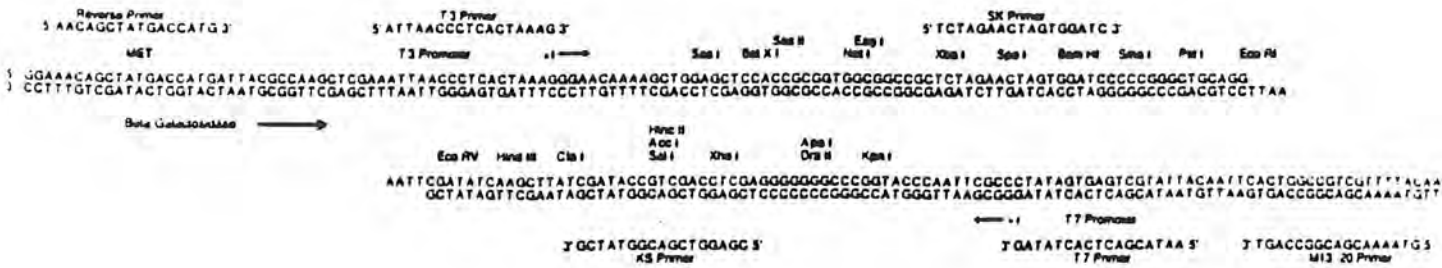
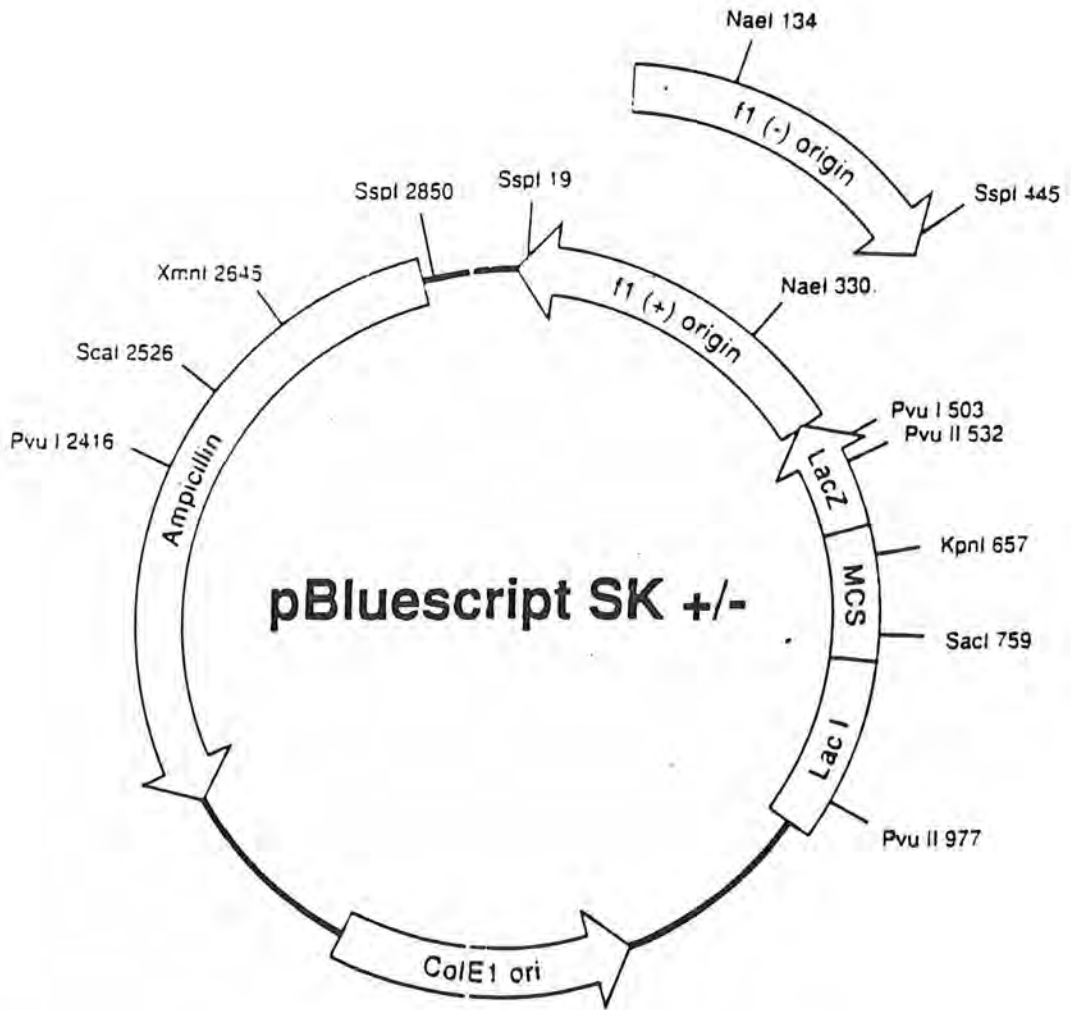


Figure 4. Carte de restriction du plasmide *Bluescript* (pBS)

## 4.2. Préparation de l'ADN phagique

Une digestion partielle de l'ADN total par *Sau3AI* est effectuée et vérifiée en minigel d'agarose. L'enzyme est inactivée à 65°C pendant 5 min. L'ADN total, digéré partiellement, ou une bande d'agarose prélevée après électrophorèse (contenant des fragments de 2 à 4 kb), est purifiée par *GeneClean*. L'ADN est dosé en minigel d'agarose.

## 4.3. Préparation de cellules compétentes

Les cellules sont rendues compétentes en utilisant la méthode de Maniatis *et al.* (1982). Le taux de cellules compétentes est déterminé par transformation avec le plasmide natif.

## 4.4. Ligation

Pour le clonage des fragments d'ADN phagique, le rapport insert/vecteur est égal à 4. La réaction de ligation est catalysée par l'ADN ligase du coliphage T4, qui forme des liaisons phosphodiester entre les extrémités 5'-phosphate et 3'-phosphate. L'enzyme est utilisée avec son milieu réactionnel, selon les instructions du fournisseur (Gibco-BRL). La concentration totale d'ADN (insert et vecteur) est de 50 µg par ml de mélange de ligation. La réaction a lieu à température ambiante, pendant toute la nuit.

## 4.5. Transformation

La transformation est réalisée selon le protocole décrit pour *E. coli* (Maniatis *et al.*, 1982). Les recombinants sont sélectionnés sur milieu LB-IXA :

-IPTG (Isopropyl-β-galactopyranoside)	0,4 µg/ml
-X-Gal (5bromo-4chloro-3indolyl-β-galactopyranoside)	40 µg/ml

L'IPTG est un inducteur du gène de la β-galactosidase. Le X-Gal est un analogue du lactose qui, une fois hydrolysé par l'enzyme, libère un chromophore bleu. Le site de clonage *BamH1* se trouve en amont du promoteur du gène Lac Z. Les clones recombinants n'expriment donc pas l'activité β-galactosidase et les colonies correspondantes sont de couleur blanche.



## 5. Examen des molécules d'ADN au microscope électronique

Les molécules d'ADN sont visualisées selon la méthode décrite par Kleinschmidt (1968). Une lame en verre sert à déposer à la surface de l'hyperphase [tris-HCl 0,02 M; EDTA 0,002 M; pH 8,5; formamide 17% (v/v)], 100  $\mu$ l d'hyperphase [tris-HCl 0,2 M; EDTA 0,02 M; pH 8,5; formamide 50% (v/v); cytochrome C type 6 (Sigma) 0,032 mg/ml]. L'hyperphase contient 100 mg/ml de l'ADN double brin à étudier. Les 2 phases sont laissées en contact pendant 1 min, pour que les molécules se fixent (par affinité de charges) aux molécules de cytochrome C et, de ce fait, se déroulent.

Les grilles (marque Ladd modèle H1-301, 300 mesches), préalablement dégraissées et recouvertes d'un film de collodion, sont alors déposées à la surface de l'hyperphase pendant 10 sec. Elles sont ensuite colorées 30 sec à l'acétate d'uranyle [0,02 % (v/v) dans l'éthanol] et séchées à l'isopropanol 10 sec.

Pour renforcer le contraste des acides nucléiques étalés, les grilles sont ensuite ombrées au platine-carbone. Elles sont observées avec un microscope Zeiss EM 10, sous une tension de 60 kV et à un grossissement de 12 500.

L'ADN double brin de la forme répliquative du phage  $\phi$ X174 (5386 paires de bases; Sanger *et al.*, 1978) est utilisé comme marqueur interne de taille.

## Résultats

## RESULTATS

### 1. Caractérisation des souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* de la collection CNRZ

#### 1.1. Purification des souches CNRZ

Les souches lyophilisées de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* de la collection CNRZ ont été purifiées par 3 réisolements successifs, sur de la gélose Elliker. Les clones réisolés, repiqués dans du lait tournesolé et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , sans incubation préalable, ont servi de cultures de départ au cours de la présente étude.

La croissance dans le lait tournesolé permet de distinguer l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus* des lactocoques et des lactobacilles thermophiles. La croissance de toutes les souches de la collection CNRZ est bien caractérisée par la séquence ACR (Acidification, Coagulation, réduction lente et souvent incomplète), alors que les lactocoques présentent la séquence RAC et les lactobacilles thermophiles, la séquence ACR.

Deux types de colonies (la différence portait sur la taille des colonies) ont été obtenus lors des isolements des souches CNRZ 21 et 24. Des clones correspondant à chacun des 2 types ont donc été purifiés séparément et stockés dans du lait tournesolé. Les numéros CNRZ suivants leur ont été attribués: 1598 et 1599, issus de la souche CNRZ 21; 1600 et 1601, issus de la souche CNRZ 24.

#### 1.2. Appartenance des souches CNRZ à l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

Pour s'assurer, dès le commencement du travail, que les souches CNRZ appartenaient bien toutes à la sous-espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, une sonde spécifique d'espèce, le plasmide pNST21 (fig. 3), mise au point par Colmin *et al.* (1991) a été utilisée. Il s'agit du vecteur de clonage pBR322, dans lequel est inséré un fragment de 4,2 kb qui est spécifique de l'espèce *S. salivarius*. Ce fragment a été cloné au hasard, à partir du génome d'une souche industrielle.

### 1.2.1. Hybridation de la sonde pNST21 sur des "transferts en goutte"

Des "transferts en goutte" des ADN des souches repérées par une astérisque dans les tableaux 2a et 2b ont été effectués sur une membrane de nylon *Zetaprobe* (Bio-Rad). Nous avons opéré de même avec les ADN des souches du tableau 3 (à l'exception de l'ADN des souches d'*E. coli*). Les hybridations des "transferts en goutte" ont été réalisées dans le Laboratoire de Génétique et Microbiologie de l'Université de Nancy I.

Les ADN natifs, extraits des souches, sont transférés directement sur la membrane, sans digestion préalable par une enzyme de restriction. Cette méthode de transfert est rapide et permet de traiter en parallèle un grand nombre de souches. Un résultat positif se traduit par une tache noire d'hybridation, plus ou moins intense, lorsqu'il existe de l'homologie entre l'ADN sonde et l'ADN cible.

Les ADN de 107 souches CNRZ de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, disponibles au début du travail, ont été répartis sur 2 membranes. Les ADN de certaines souches sont présents sur les 2 membranes. Certains ont également été déposés en plusieurs endroits sur une même membrane, afin de servir de témoin à la fois pour les conditions de transfert et pour les conditions d'hybridation. Le résultat de ces hybridations est présenté sur les figures 5.I et 5.II.

Sur les 107 ADN déposés, 101 présentent de l'homologie avec le plasmide pNST21 et 6 en sont dépourvues. Ce sont les ADN des souches CNRZ 411, 412, 781, 1206, 1210 et 1402.

L'intensité des taches d'hybridation visibles sur les figures 5.I et 5.II varie selon les souches. La différence d'intensité observée peut dépendre des quantités d'ADN déposées sur la membrane. Aucun contrôle visuel n'est possible dans les "transferts en goutte", à la différence des gels de profils de restriction. La seconde interprétation possible est que cette différence d'intensité reflète la taille des fragments homologues au fragment de 4,2 kb présent dans le génome des souches. Cependant, 12 des souches examinées avaient déjà été testées et analysées par le Laboratoire de Génétique et Microbiologie de Nancy I, qui les avaient classées en fonction de leur profil d'hybridation avec la sonde pNST21 (Colmin *et al.*, 1991). L'examen de l'intensité des taches obtenues pour les 12 souches étudiées, permet de rejeter la seconde interprétation. Par exemple, les souches CNRZ 302 et 307, classées dans le même groupe, en fonction de leur profil d'hybridation, présentent des taches d'intensité différente. Cette observation sera confirmée lors de l'analyse des résultats d'hybridation des profils de restriction *EcoRV* des ADN des souches.



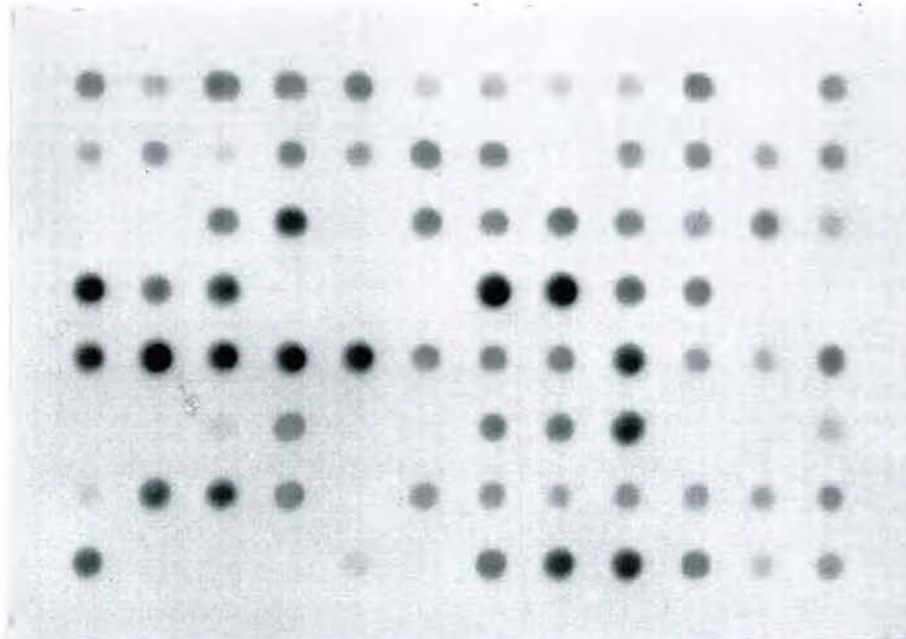
**Figure 5.I.** Vérification des souches CNRZ cataloguées comme *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

A : Répartition des ADN des souches sur la membrane 1 de "transfert en goutte"

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CNRZ 1446	CNRZ 1358	CNRZ 1446	CNRZ 7	CNRZ 1598	CNRZ 22	CNRZ 1600	CNRZ 25	CNRZ 26	CNRZ 27	S.f CNRZ 137	CNRZ 160
B	CNRZ 1358	CNRZ 161	CNRZ 302	CNRZ 307	CNRZ 308	CNRZ 309	CNRZ 310	L.h CNRZ 65	CNRZ 312	CNRZ 366	CNRZ 368	CNRZ 385
C	L.h 328	S.s CNRZ1459	CNRZ 386	CNRZ 387	C.p	CNRZ 388	CNRZ 389	CNRZ 390	CNRZ 391	CNRZ 1358	CNRZ 402	CNRZ 403
D	CNRZ 404	CNRZ 405	CNRZ 406	L.h CNRZ1096	M.l	S.f CNRZ 137	CNRZ 407	CNRZ 408	CNRZ 409	CNRZ 410	S.ni CNRZ 411	S.ni CNRZ 412
E	CNRZ 439	CNRZ 440	CNRZ 441	CNRZ 445	CNRZ 446	CNRZ 447	CNRZ 455	CNRZ 456	CNRZ 457	CNRZ 461	CNRZ 463	CNRZ 464
F	C.p	M.l	S.s CNRZ1459	CNRZ 1446	L.h CNRZ 65	S.f CNRZ 137	CNRZ 701	CNRZ 702	CNRZ 703	S.c CNRZ 105	S.f CNRZ 137	CNRZ 1358
G	CNRZ 1358	CNRZ 736	CNRZ 748	CNRZ 756	L.h CNRZ 65	CNRZ 757	CNRZ 758	CNRZ 759	CNRZ 760	CNRZ 761	CNRZ 778	CNRZ 779
H	CNRZ 780	CNRZ 781	L.h CNRZ 328	C.p	S.s CNRZ1459	M.l	CNRZ 782	CNRZ 783	CNRZ 784	CNRZ 884	CNRZ 885	CNRZ 886

C.p : *Clostridium perfringens*, L.h : *Lactobacillus helveticus*, M.l : *Micrococcus luteus*, S.c : *Streptococcus cremoris*, S.f : *Streptococcus faecalis*, S.ni : *Streptococcus* non identifié, S.s : *S. salivarius* subsp. *salivarius*

B : Autoradiographie obtenue après hybridation de la sonde pNST21 avec les ADN des souches



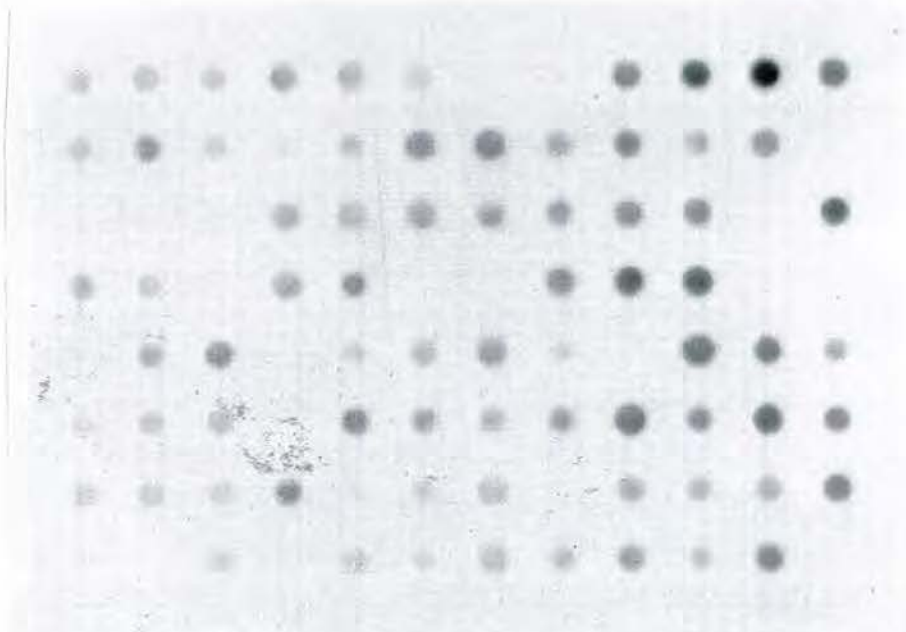
**Figure 5.II.** Vérification des souches CNRZ cataloguées comme *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

A : Répartition des ADN des souches sur la membrane 2 de "transfert en goutte"

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CNRZ 887	CNRZ 888	CNRZ 889	CNRZ 1005	CNRZ 1358	CNRZ 1446	S.c CNRZ 105	S.f CNRZ 137	CNRZ 1066	CNRZ 1068	CNRZ 1100	CNRZ 1119
B	CNRZ 1120	CNRZ 1151	CNRZ 1152	CNRZ 1153	CNRZ 1154	CNRZ 1155	CNRZ 1156	CNRZ 1157	CNRZ 1197	CNRZ 1198	CNRZ 1199	L.h CNRZ 65
C	C.p	S.s CNRZ1459	M.l	CNRZ 1358	CNRZ 1200	CNRZ 1201	CNRZ 1202	CNRZ 1203	CNRZ 1204	CNRZ 1205	CNRZ 1206	CNRZ 1207
D	CNRZ 1208	CNRZ 1209	CNRZ 1210	CNRZ 1211	CNRZ 1212	e.d	S.f CNRZ 137	CNRZ 1213	CNRZ 1237	CNRZ 1242	C.p	M.l
E	L.h CNRZ1096	CNRZ 1400	CNRZ 1401	S.ni CNRZ1402	CNRZ 1443	CNRZ 1446	CNRZ 1358	CNRZ 1358	C.p	CNRZ 1358	CNRZ 7	CNRZ 302
F	CNRZ 312	CNRZ 368	CNRZ 403	S.ni CNRZ 412	CNRZ 440	CNRZ 455	CNRZ 463	CNRZ 701	CNRZ 756	CNRZ 759	CNRZ 760	CNRZ 885
G	CNRZ 886	CNRZ 1005	CNRZ 1119	CNRZ 1151	CNRZ 1153	CNRZ 1154	CNRZ 1156	L.h CNRZ 65	CNRZ 1197	CNRZ 1199	CNRZ 1200	CNRZ 1201
H	CNRZ 1206	e.d	CNRZ 1446	S.f CNRZ 137	CNRZ 1209	CNRZ 1212	CNRZ 1237	CNRZ 1400	CNRZ 1401	CNRZ 1443	CNRZ 1358	M.l

C.p : *Clostridium perfringens*, e. d : eau distillée, L.h : *Lactobacillus helveticus*, M.l : *Micrococcus luteus*, S.c : *Streptococcus cremoris*, S.f : *Streptococcus faecalis*, S.ni : *Streptococcus* non identifié, S.s : *S. salivarius* subsp. *salivarius*

B : Autoradiographie obtenue après hybridation de la sonde pNST21 avec les ADN des souches



► **Souches de la collection CNRZ ne présentant pas d'homologie avec pNST21**

Trois hypothèses peuvent être envisagées dans le cas des 6 souches qui ne présentent pas d'homologie avec pNST21:

- l'identification de ces souches à l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus* est erronée.
- la totalité du fragment de 4,2 kb est absente du génome de ces souches.
- la quantité d'ADN déposée sur la membrane est insuffisante, pour ces souches.

L'étude des 6 souches a été poursuivie. Leur ADN, extrait de nouveau, a été hybridé avec la sonde pNST21. Ces hybridations ont été réalisées sur des profils *EcoRV*. Un signal est apparu fortement positif avec les ADN de 3 souches, CNRZ 781, 1206 et 1210. L'absence d'hybridation, constatée lors des premières expériences, était un artefact résultant probablement du dépôt d'une quantité insuffisante d'ADN. Ces 3 souches appartiennent donc bien à l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Pour les 3 dernières souches (CNRZ 411, 412 et 1402), aucune hybridation n'a été trouvée. Parallèlement, nous avons étudié les caractères biochimiques de ces 3 souches (tableau 6), la souche CNRZ 1206 servant de souche témoin, pour l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Les profils biochimiques des souches CNRZ 411 et 412 ne sont pas caractéristiques de l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Ces profils ne nous permettent pas, toutefois, d'identifier les 2 souches de façon plus précise à une autre espèce de streptocoques. Il pourrait s'agir de souches atypiques ne possédant pas le fragment de 4,2 kb. La souche CNRZ 1402 n'appartient pas non plus à l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus* et son profil biochimique est celui d'un entérocoque.

◆ **Conclusion**

Les résultats confirment l'appartenance de 104 des 107 souches CNRZ examinées à l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Deux souches, CNRZ 411 et 412, apparaissent incertaines et la souche CNRZ 1402 est un entérocoque. Les 17 souches reçues ultérieurement comme *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, ont été examinées de la même façon et leur appartenance à cette espèce a été confirmée.







## 2. Etude des bactériophages

### 2.1. Recherche d'un nombre réduit de souches de propagation

Afin de disposer d'une collection de phages aussi diversifiée et représentative que possible, des phages de diverses provenances ont été inclus dans l'étude. Soixante-sept phages, se répartissant de la façon suivante, ont ainsi été réunis:

– **11 phages tempérés** (voir tableau 4; cf. partie 3. consacrée aux interactions phages–bactéries, paragraphe 3.1.):

- \* 10 des 12 phages tempérés caractérisés. Dans le cas de la souche type, seul le phage 01358 a été conservé. Les 2 phages apparentés, 01529 et 01530, ont été écartés.
- \* le phage tempéré 01690, obtenu à la suite de la lysogénisation de la souche CNRZ 312 par le phage 01209 propagé sur la souche lysogène CNRZ 701.

– **56 phages isolés comme lytiques** (voir tableau 5):

- \* 25 phages de la collection INRA, France.
- \* 8 phages de la collection BCH, France.
- \* 2 phages de la collection d'E. Tybeck, Finlande.
- \* 14 phages de la collection de T. Sozzi, Italie.
- \* 2 phages de la collection de L. Benbadis, France.
- \* 3 phages de la collection de H. Neve, Allemagne.
- \* 2 phages de la collection de H. Sebastiani, Autriche.

Pour multiplier ces phages, 40 souches de propagation étaient initialement nécessaires. Pour faciliter le travail, notamment pour l'étude comparative des génomes phagiques, et pour simplifier le mode de production des phages, un nombre réduit de souches de propagation a été recherché. Cinq souches CNRZ (CNRZ 368, 440, 447, 701, 1151 et 1152), qui avaient été trouvées sensibles à de nombreux phages lors d'une première étude et la souche CNRZ 1205, qui était capable de multiplier la plupart des phages tempérés, ont été retenues comme souches de propagation potentielles (le caractère lysogène de la souche CNRZ 1205 n'a été établi qu'ultérieurement). Il a ainsi été montré (tableau 7) que la souche CNRZ 1205, la plus sensible, permettait de propager 48 des phages figurant dans les tableaux 4 et 5 (70%), la souche CNRZ 1151, 6 phages (9%) et les souches CNRZ 447 et CNRZ 701, 5 phages chacune (7,5%). Neuf phages ne pouvaient être multipliés que sur leur souche d'isolement et le phage tempéré 01205 n'a pu être multiplié que sur la souche CNRZ 1707, un clone non lysogène, dérivé de la souche CNRZ 1205.

**Tableau 7.** Souches de propagation utilisées pour la production de routine des 69 phages

► **La souche CNRZ 1205 a été utilisée pour propager 48 phages**

-> 7 phages tempérés

0701, 01358, 01529, 01530, 01598, 01599 et 01601.

-> 41 phages virulents

sc, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B2, 701-B3, 701-B8, 701-B12, 1151-B3, 1151-B7, 1152-B10, 1205-BAM, BaL12, Ba1S19, BaS38, BaS73, BaS85, BaS99, BaS102, BaS110, BaS161, BaS221, BaS215,  $\phi$ 3,  $\phi$ 4,  $\phi$ 5,  $\phi$ 8,  $\phi$ 9,  $\phi$ 11,  $\phi$ 17, P-1232, P-1304, NCDO-01242, tv et 55/15.

► **Autres souches de propagation utilisées**

-> Phages tempérés

CNRZ 312      01690

CNRZ 701      01209 et 01210

CNRZ 1597    01198 et 01200

CNRZ 1707    01205

-> Phages virulents

CNRZ 447      b6, 447-B4 et 124/44

CNRZ 887       $\phi$ 1 et  $\phi$ 2

CNRZ 1151    c20, Ba24, 1151-B1, 1151-B4, 1151-B10 et 1151-ITG

CNRZ 1575    BaS19

CNRZ 1589    BaS265

CNRZ 1592    71/St15

CNRZ 1597     $\phi$ 29

Lors de la production des phages sur les souches lysogènes CNRZ 701 et 1205, nous avons vérifié par des tests croisés de sensibilité phagique que les phages obtenus étaient différents des prophages 0701 et 01205. Ces observations ont ensuite été confirmées par l'analyse des profils de restriction des ADN des phages.

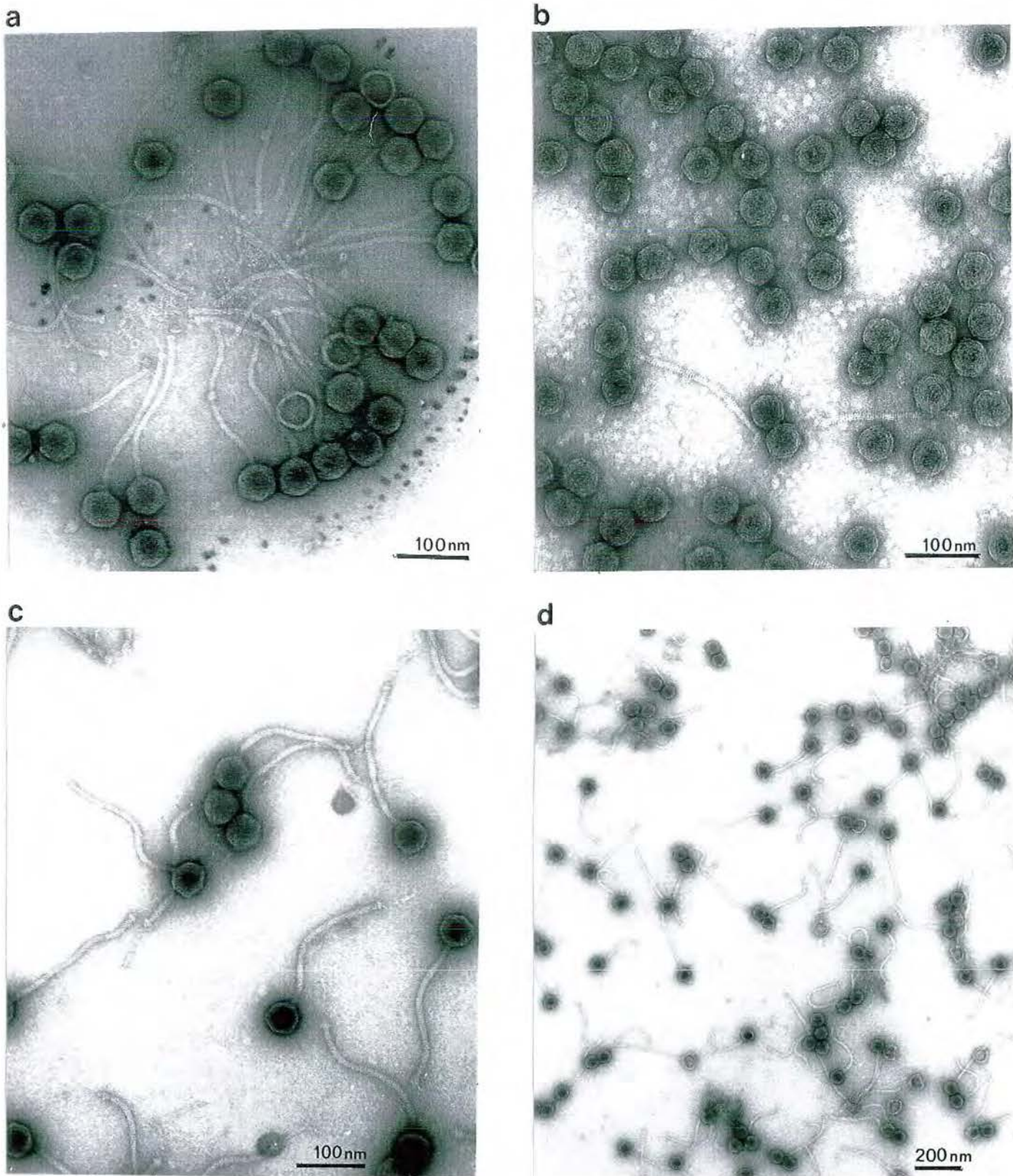
Dans la présentation des résultats, les phages seront désignés par leur dénomination, suivie par le numéro de la souche de propagation utilisée. Par exemple, le phage  $\phi 4$ , propagé sur la souche CNRZ 1205, est noté comme étant  $\phi 4$ .CNRZ 1205. Par contre, pour simplifier l'écriture, le même phage  $\phi 4$ , lorsqu'il est propagé sur sa souche d'isolement, CNRZ 888, est simplement noté comme  $\phi 4$ .OR.

## 2.2. Morphologie

La figure 6 présente, à titre d'exemple, les micrographies d'un phage tempéré et celles de 2 phages isolés comme lytiques. Tous les phages étudiés possèdent une morphologie très comparable. Ils appartiennent au groupe B de la classification de Bradley (1967) ou à la famille des *Siphoviridae* de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (Matthews, 1982). Ils possèdent une tête à contour hexagonal, vraisemblablement icosaédrique, et une queue longue, striée, flexible et non contractile, qui se termine fréquemment par une petite plaque basale pourvue d'une fibre de taille variable. Le diamètre des têtes (distance entre 2 sommets opposés de la capsid) varie de 40 à 65 nm ( $\pm 4$  nm, 4 à 8 mesures ayant été effectuées pour chaque phage). La queue a une longueur de 220 à 250 nm ( $\pm 6$  nm).

De sérieuses difficultés ont été rencontrées, lors de la préparation sur gradient de 61 phages et les rendements ont souvent été très faibles. Dans certains cas, par exemple pour le phage 0701.CNRZ 1205, la purification sur le gradient de CsCl fait apparaître 2 bandes de densité différente. L'observation de ces bandes au microscope électronique montre que la bande supérieure, bleutée et fine, contient des particules phagiques entières (cf. fig. 6a, 6c et 6d), alors que la bande inférieure, souvent plus épaisse et plus diffuse, blanchâtre, est constituée majoritairement de capsides phagiques pleines et ne contient que de rares particules entières (fig. 6b). Dans 40 % des cas, seule la bande inférieure a été obtenue. Nous n'avons jamais observé, sur le gradient, de bande contenant uniquement des queues. Ceci est valable à la fois pour les phages tempérés et pour les phages isolés comme lytiques.





**Figure 6.** Micrographies des phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

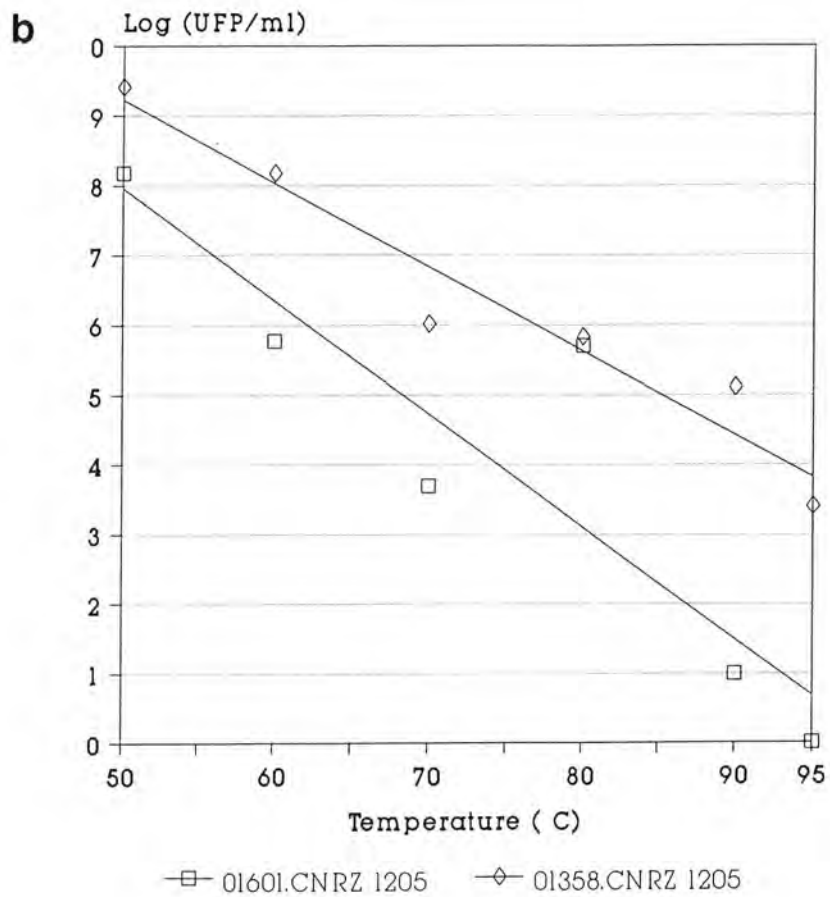
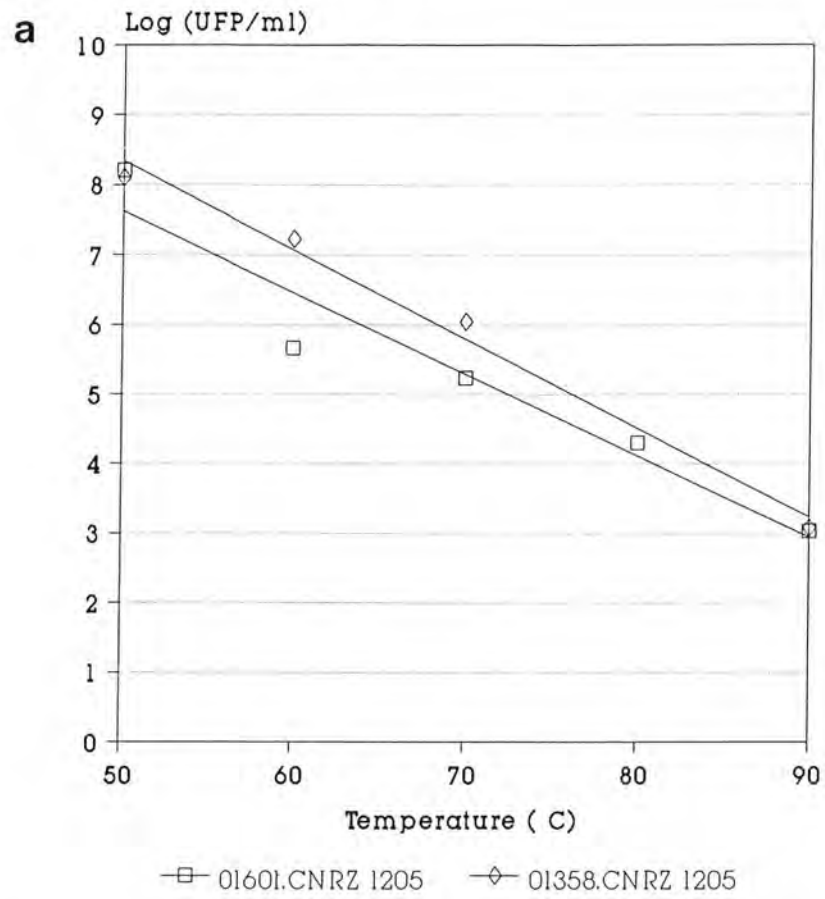
- a Phage tempéré 0701.CNRZ 1205. Particules entières dans la bande supérieure, obtenue après centrifugation dans le gradient de CsCl. De petites plaques basales et de courtes fibres terminales sont présentes.
- b Phage tempéré 0701.CNRZ 1205. Dans la bande inférieure du gradient de CsCl, quelques rares particules entières sont observées parmi des têtes pleines isolées.
- c Phage virulent 368-B8.CNRZ 1205. Particules entières; de petites plaques basales et de courtes fibres terminales sont visibles.
- d Phage virulent  $\phi$ 9.CNRZ 1205. Particules entières; de petites plaques basales et de courtes fibres terminales sont visibles.



Pour vérifier que les capsides isolées provenaient bien de particules entières, tous les lysats ont été examinés au microscope électronique, après filtration et ultracentrifugation, sans passage sur un gradient de CsCl. Des particules entières, semblables à celles des autres phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, sont alors observées. Des modifications du mode opératoire, visant à augmenter les rendements de production et à mieux préserver l'intégrité des phages ont alors été essayées, par exemple, la dissolution progressive du PEG ou son ajout sous forme liquide, la mise en suspension des phages dans des solutions de tampon TM modifiées (tris 10mM, MgSO<sub>4</sub> 0,1M; tris 10mM, MgSO<sub>4</sub> 0,5M; TM, NaCl 0,5M), la préparation du gradient en déposant les phages soit dans la solution de densité 1,7, soit dans la solution de densité 1,3, ou encore le tampon de dialyse après le gradient de CsCl (tris 10mM, MgSO<sub>4</sub> 0,1M, NaCl 0,5M; tris 10mM, MgSO<sub>4</sub> 0,5 M, NaCl 0,5M). Ces modifications n'ont malheureusement pas permis d'améliorer significativement et de manière reproductible la préparation de la plupart des suspensions phagiques purifiées.

### **2.3. Thermorésistance des phages**

Les résultats sont présentés sur la figure 7. Dans le milieu Elliker, le log du nombre de phages décroît de façon linéaire, en fonction de la température. On notera que des phages sont encore actifs après 5 min de traitement à 90°C. Dans le lait, les résultats obtenus ont une allure analogue, mais on observe une dispersion notable des points expérimentaux et une pente plus forte des droites.



**Figure 7.** Sensibilité de 2 phages tempérés à la température dans du bouillon Elliker (a) et dans le lait (b)

## 2.4. Protéines phagiques majeures

En raison des problèmes rencontrés lors de la purification des phages sur un gradient de CsCl, les protéines majeures de 46 phages seulement ont été caractérisées par électrophorèse sur gel d'acrylamide, en conditions dénaturantes, et les concentrations protéiques des échantillons déposés n'ont pas été bien standardisées.

Deux profils protéiques ont été mis en évidence, qui correspondent aux 2 profils décrits par Benbadis *et al.* (1990), pour des phages virulents:

- **un premier groupe de 29 phages** (tableau 8), 4 tempérés et 16 virulents, possèdent 2 protéines majeures de 32 et 27 kDa. Ce profil protéique est similaire à celui du phage  $\phi$ 29 de Benbadis *et al.* (1990), utilisé comme témoin (fig. 8a et b). La protéine de 32 kDa est la protéine céphalique majeure, puisqu'elle est retrouvée en quantité dans les dépôts qui contiennent principalement des capsides de phages (fig. 8a, ligne 2 et fig. 8b, ligne 5 et 6). Dans le cas du phage tempéré 01209, un profil protéique identique est obtenu, qu'il soit produit sur la souche non lysogène CNRZ 312 ou sur la souche lysogène CNRZ 701 (fig. 8a, ligne 4 et 5).

- **les 17 phages du deuxième groupe** (tableau 8), 3 tempérés et 14 virulents, se caractérisent par 3 protéines majeures de 43, 25 et 15 kDa, comme le phage  $\phi$ 17 de Benbadis *et al.* (1990) utilisé comme témoin. Pour les phages tempérés 01598, 01599 et 01601, seule la protéine de 43 kDa, constitutive de la capside phagique, est mise en évidence (fig. 9a). Dans le cas des 14 phages virulents, les 3 bandes protéiques majeures sont bien présentes (fig. 9b).

**Tableau 8. Protéines structurales majeures des phages#**

**Vingt-neuf phages présentent 2 protéines majeures (32 et 27 kDa)**

4 phages tempérés : 0701, 01209, 01210 et 01358

25 phages virulents :  $\phi$ 29, c20\*, sc, sch\*, 1151-B1, 1151-B3, 1151-B4, 1151-B10, 1151-ITG\*, 1205-BAM\*, BaL12\*, BaS19\*, Ba24\*, BaS73\*, BaS102\*, BaS110, BaS265,  $\phi$ 3\*,  $\phi$ 4\*,  $\phi$ 5\*,  $\phi$ 8, tv\*, 55/15\*, 71/st15 et 124/44\*.

**Dix-sept phages présentent 3 protéines majeures (43, 25 et 15 kDa)**

3 phages tempérés : 01598\*, 01599\* et 01601\*

14 phages virulents :  $\phi$ 17, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 447-B4, 701-B2, 701-B8\*, 701-B12, BaS99\*, BaS161\*, BaS221\*,  $\phi$ 1,  $\phi$ 2 et  $\phi$ 9

**Vingt-trois phages n'ont pas été étudié**

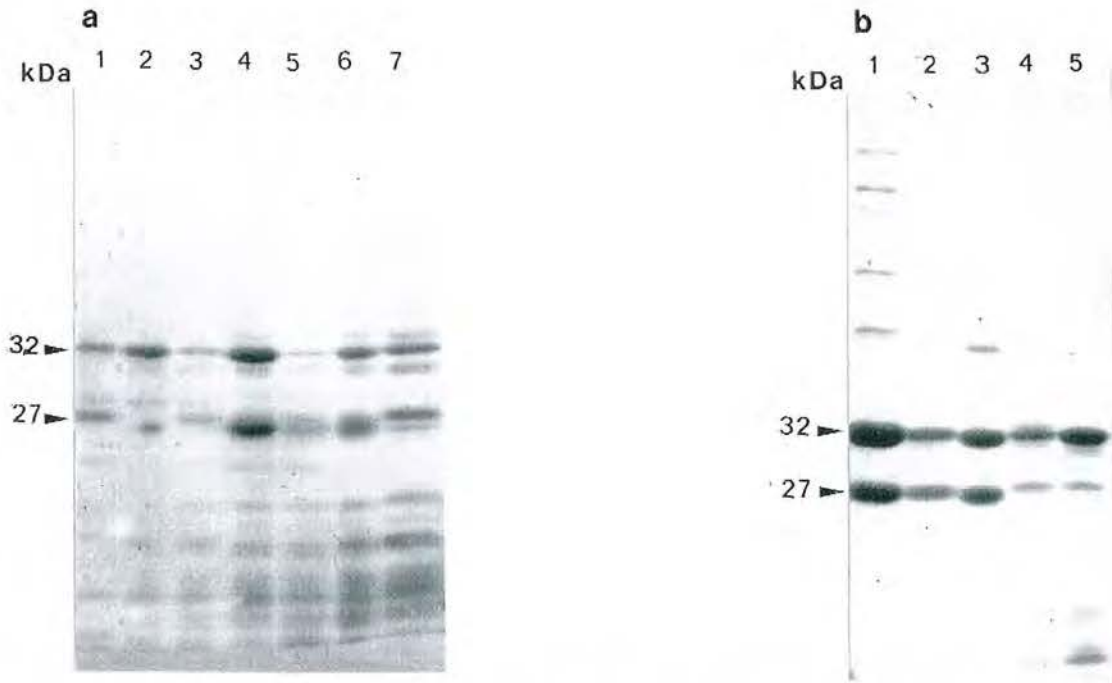
6 phages tempérés : 01198, 01200, 01205, 01529, 01530, 01690

17 phages virulents : b6, sf, st2, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B3, 1151-B7, 1152-B10, Ba1S19, BaS38, BaS85, BaS215,  $\phi$ 11, NCDO-01242, P-1232 et P-1304

# Les préparations de phages qui, à l'examen au microscope électronique, contenaient surtout des capsides sont suivies d'une astérisque.

Les profils électrophorétiques des phages soulignés sont présentés dans les figures 7 et 8.





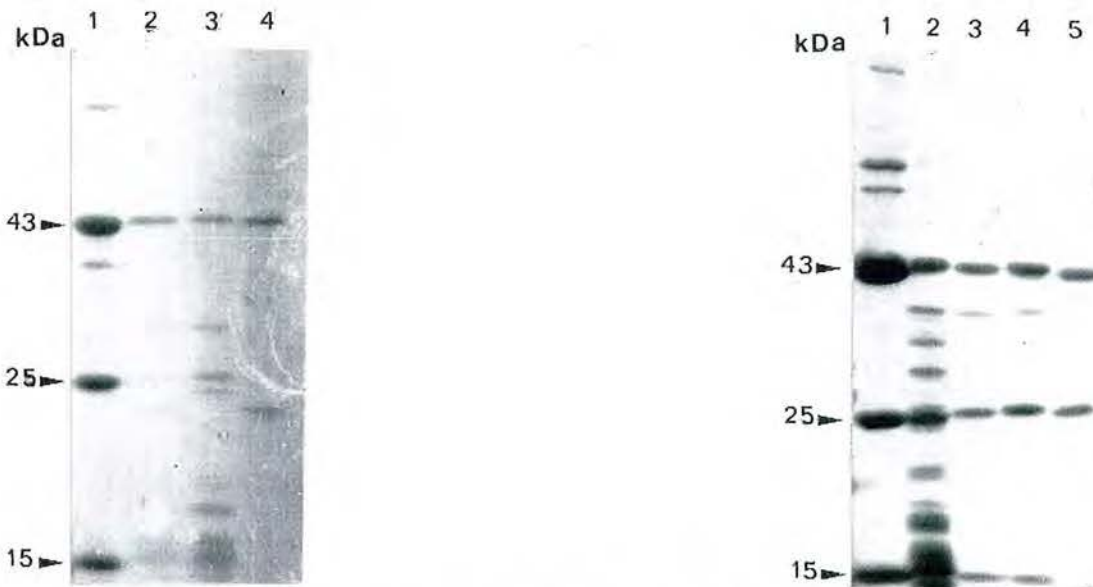
**Figure 8.** Protéines structurales majeures de 10 des 29 phages du premier groupe de profils protéiques

**a Phages tempérés**

- 1 Phage  $\phi$ 29, isolé comme lytique (témoin)
- 2 0701 (têtes)
- 3 0701 (particules entières)
- 4 01209.CNRZ 312
- 5 01209.CNRZ 701
- 6 01210
- 7 01358

**b Phages isolés comme lytiques**

- 1  $\phi$ 29 (témoin)
- 2 BaS265
- 3  $\phi$ 8
- 4 c20 (têtes)
- 5 55/15 (têtes)



**Figure 9.** Protéines structurales majeures de 7 des 17 phages du second groupe de profils protéiques

**a Phages tempérés**

- 1 Phage  $\phi$ 17, isolé comme lytique (témoin)
- 2 01598
- 3 01599
- 4 01601

**b Phages isolés comme lytiques**

- 1  $\phi$ 17 (témoin)
- 2  $\phi$ 1
- 3  $\phi$ 9
- 4 21-B10
- 5 368-B4

Lorsque ce n'est pas spécifié, les phages ont été produits sur leur souche de propagation de routine.

## 2.5. Etude des génomes phagiques

### 2.5.1. Examen au microscope électronique

L'ADN du phage tempéré natif 01205 et celui du phage virulent  $\phi$ 4.CNRZ 888 ont été examinés au microscope électronique (fig. 10a et 10b). Ce sont des ADN bicaténaires linéaires dont la taille est de  $41,5 \pm 5,6$  kb pour le phage tempéré 01205 et de  $35,9 \pm 0,9$  kb pour le phage  $\phi$ 4. Pour un même phage, il existe une bonne corrélation entre les mesures réalisées au microscope électronique et les sommes des tailles des fragments de restriction, après digestion par des endonucléases de restriction (tailles mesurées sur au moins 2 digestions, avec *Hind*III et *Eco*RV).

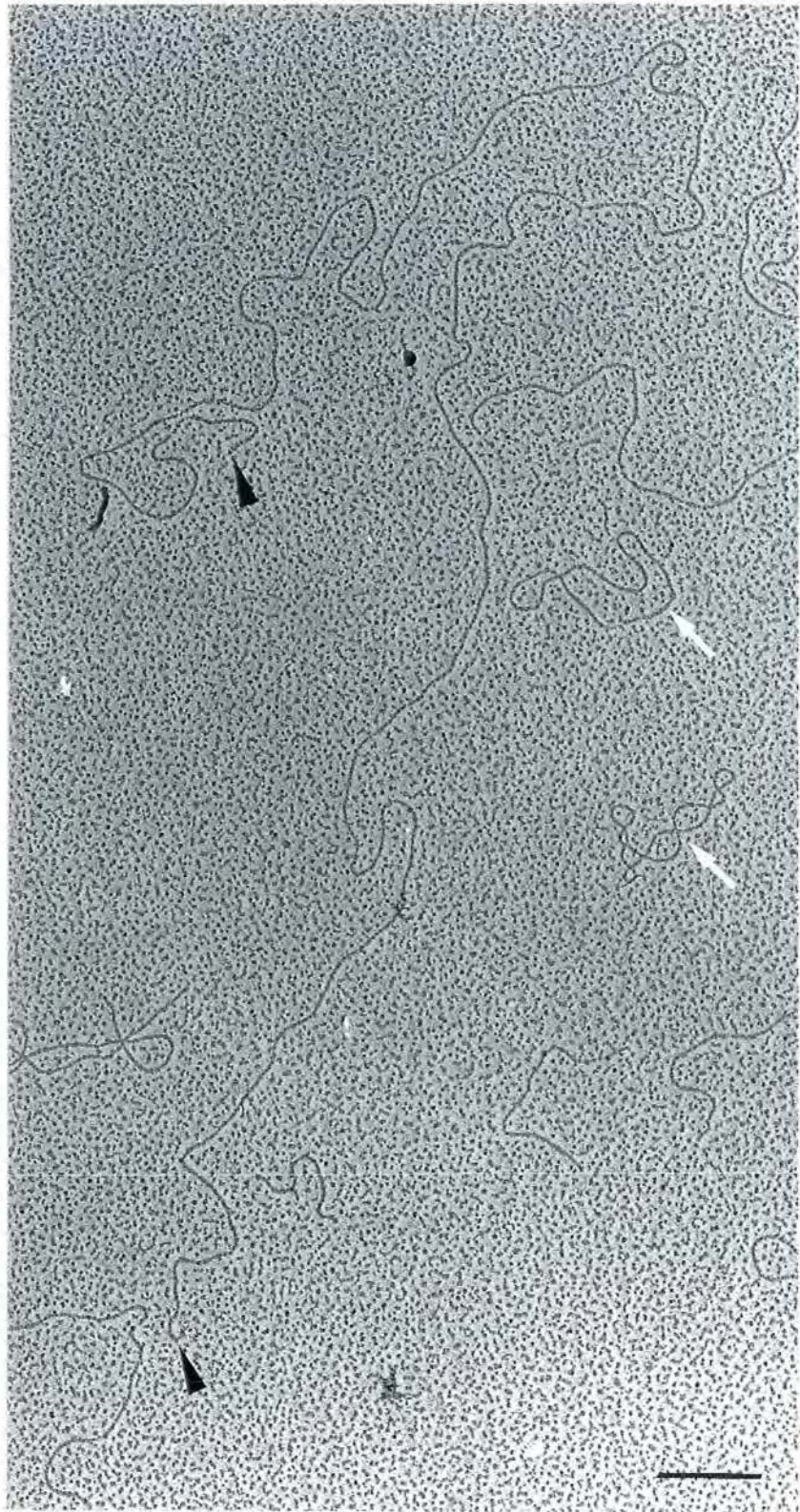
### 2.5.2. Profils de restriction de 67 génomes phagiques

Dans un premier temps, nous avons déterminé, sur un petit nombre de génomes phagiques, quelle était l'enzyme de restriction qui nous permettrait de comparer, au mieux, les ADN phagiques. En effet, certaines enzymes, comme *Bam*H1, *Eco*RI, *Stu*I, *Pst*I et *Pvu*I coupent très peu ou pas du tout les ADN phagiques. L'enzyme de restriction *Hind*III, jugée la mieux adaptée, a été choisie pour comparer les ADN de 64 phages multipliés sur leur souche de propagation de routine. Les phages tempérés 01198, 01200 et 01205 n'ont pas été inclus dans cette comparaison, leurs souches de propagation respectives ayant été obtenues trop tardivement. Toutefois, les profils de restriction des ADN natifs de ces 3 phages tempérés figurent dans une étude consacrée aux phages tempérés (le manuscrit correspondant, soumis pour publication, est en annexe 2 du présent mémoire).

**Pour les 47 phages propagés sur la souche CNRZ 1205**, 26 profils différents ont été obtenus (fig. 11). De nombreux phages possèdent des profils de restriction identiques ou similaires (tableau 9), notamment 14 d'entre eux qui présentent un profil identique, représenté par celui du phage tempéré 0701.CNRZ 1205 (fig. 11a, ligne 3). Cinq autres phages possèdent un profil très apparenté:

- le phage BaS85, auquel il manque un fragment de 2,6 kb.
- les phages BaL12 et BaS102 (GP2), dont le fragment de 2,6 kb est remplacé par un fragment de 2,7 kb.
- Les phages 447-B11 et  $\phi$ 11, qui possèdent des fragments supplémentaires de faible poids moléculaire.

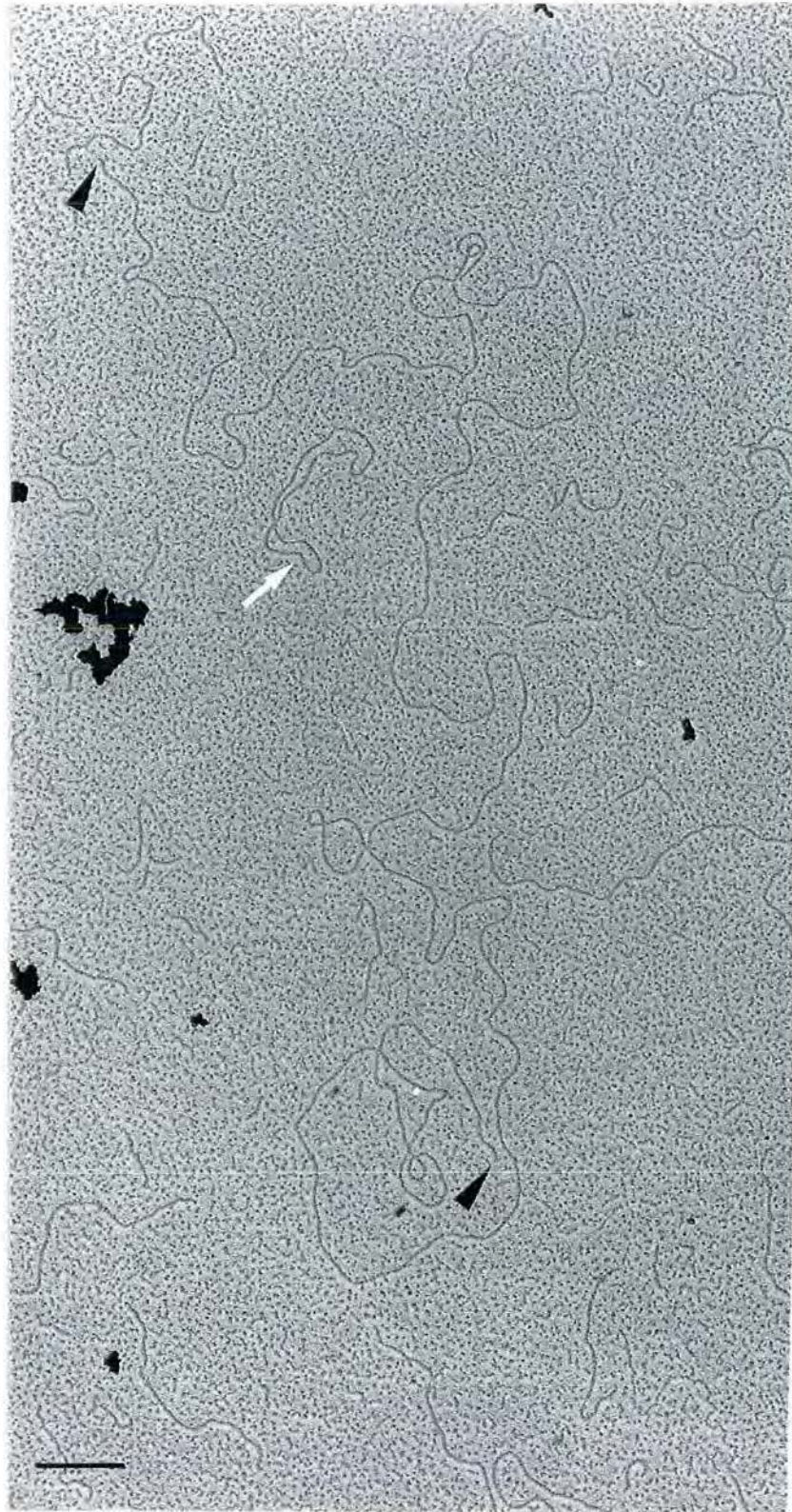




**Figure 10a.** Micrographie de la molécule d'ADN double brin du phage virulent  $\phi 4$

Les 2 extrémités de la molécule sont repérées par une flèche noire. Deux petites molécules d'ADN circulaire (flèches blanches) représentent la forme répliquative double brin du phage  $\phi X174$ , utilisé comme marqueur interne de taille. Le trait représente 1 kb.

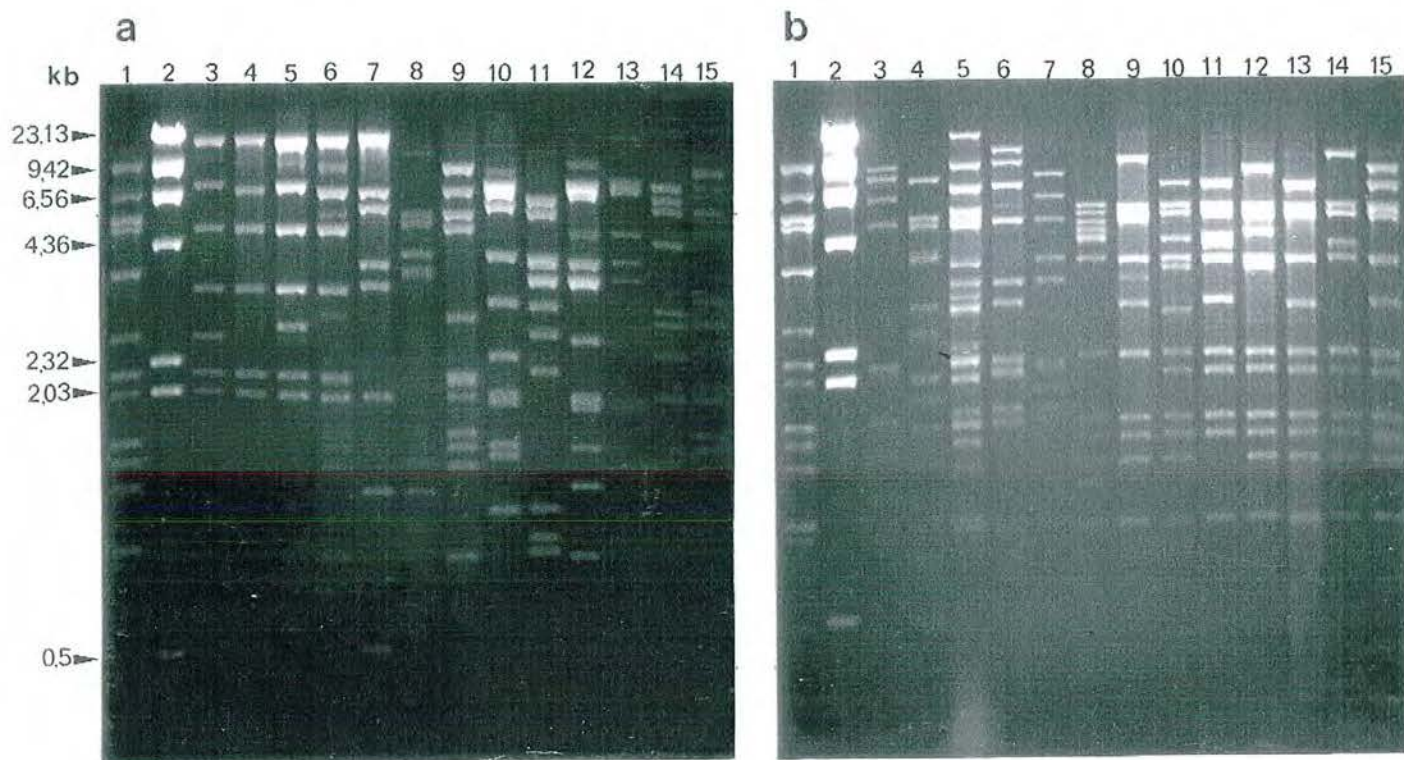




**Figure 10b.** Micrographie de la molécule d'ADN double brin du phage tempéré 01205

Les 2 extrémités de la molécule sont repérées par une flèche noire. La petite molécule d'ADN circulaire (flèche blanche) représente la forme répliquative double brin du phage  $\phi$ X174, utilisé comme marqueur interne de taille. Le trait représente 1 kb.





**Figure 11.** Les 26 profils de restriction *Hind*III caractéristiques, obtenus pour les 47 phages propagés sur la souche CNRZ 1205

<b>a*</b>	<b>b</b>
1 01205 natif	1 01205 natif
2 ADN du phage $\lambda$ digéré par <i>Hind</i> III	2 ADN du phage $\lambda$ digéré par <i>Hind</i> III
3 0701 (grp I, 14)	3 sf
4 BaS85	4 $\phi$ 8
5 BaS102 (grp II, 2)	5 368-B4
6 $\phi$ 11 (grp III, 2)	6 368-B8
7 01358 (grp IV, 2)	7 $\phi$ 17
8 01598 (grp V, 3)	8 1152-B10
9 st2 (grp VI, 3)	9 $\phi$ 9
10 $\phi$ 3 (grp VII, 2)	10 701-B3
11 Ba1S19	11 701-B8
12 BaS38	12 701-B12
13 BaS73	13 1151-B3
14 71/St15	14 P-1232
15 01599	15 BaS161

\* Le groupe et le nombre de phages présentant un profil identique sont indiqués entre parenthèses (tableau 9).

Les ADN ont été chauffés 10 min à 70°C. L'électrophorèse en gel d'agarose (0,8%) a été réalisée, dans du tampon TBE, à 2V/cm pendant 6 h.

**Tableau 9.** Classification des phages propagés sur la souche CNRZ 1205, en fonction de leur profil de restriction *Hind*III

Groupes des phages présentant un profil de restriction identique Gel a							Phages présentant des profils de restriction différents
I (14)	II(2)	III(2)	IV (2)	V (3)	VI (3)	VII (2)	
<u>0701</u>	BaL12	447-B11	<u>01358</u>	<u>01598</u>	<u>st2</u>	BaS99	Gel a : BaS85, BaS19, BaS38, BaS73, 71/St15, 01599
sc	<u>BaS102</u>	<u>φ11</u>	701-B2	01601	21-B10	<u>φ3</u>	
sch				1151-B7	NCDO-01242		Gel b : sf, φ8, 368-B4, 368-B8, φ17, 1152-B10, φ9, 701-B3, 701-B8, 701-B12, 1151-B3, P-1232, BaS161
440-B4							
440-B8							
1205-BAM							
BaS110							
BaS215							
BaS221							
φ4							
φ5							
tv							
55/15							
P-1304							

Phage : phage type du groupe, présenté sur le gel.

Les 26 profils sont différents du profil de l'ADN du phage tempéré natif 01205 (fig. 11a et b, ligne 1), ce qui exclut une simple induction de ce phage tempéré, en réponse à la pénétration du phage infectant dans les cellules. Certains fragments sont présents dans tous les profils, en particulier les fragments de 3,4; 2,2 et 2 kb. Le fragment de 2,2 kb et celui de 8 kb disparaissent si l'ADN du phage tempéré 0701 n'est pas chauffé à 70°C pendant 10 min (fig. 12) et ils sont alors remplacés par une nouvelle bande de 10,2 kb, ce qui indique la présence d'extrémités cohésives simple brin. Celles-ci s'associent en effet de façon non covalente et se dissocient sous l'effet d'une température élevée. L'utilisation de l'ADN-ligase du coliphage T4, qui lie de façon covalente les extrémités cohésives, a permis de confirmer cette hypothèse. En effet l'ADN du phage 0701, une fois traité avec l'ADN-ligase du phage T4, hydrolysé avec *HindIII* et chauffé pendant 10 min à 70°C, a le même profil que l'ADN du phage non traité avec la ligase, hydrolysé et non chauffé. Des extrémités cohésives n'ont pas été mises en évidence dans le génome de 3 phages tempérés, 01598, 01599 et 01601 et dans le génome de 12 phages virulents, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 701-B3, 701-B8, 701-B12, BaS161,  $\phi$ 8,  $\phi$ 11, NCDO-01242 et P-1232 et, cela, pour 2 endonucléases, *HindIII* et *EcoRV*. Certains génomes de phages tempérés sont homologues ou très proches de ceux de phages isolés comme lytiques, par exemple 01358 avec 701-B2 et 01601 avec 1151-B7. Des essais de lysogénisation avec le phage 1151-B7 n'ont toutefois pas abouti.

**Pour les 17 phages propagés sur une autre souche**, 12 profils de restriction *HindIII* différents ont été trouvés (fig. 13). Les phages 01210 et 01690.CNRZ 312 (qui dérive de 01209) présentent un profil identique à celui de 01209 (fig. 13, ligne 5). Il en va de même, d'une part pour le profil du phage  $\phi$ 2 avec celui du phage  $\phi$ 1 (fig. 13, ligne 6) et, d'autre part, pour les profils des phages 1151-B1 et 1151-B4 qui sont identiques à celui du phage 1151-B10 (fig. 13, ligne 9). Les 17 phages possèdent des extrémités cohésives.

#### ◆ Conclusion

Les génomes des 67 phages sont constitués par de l'ADN dont la taille varie de 35 à 50 kb. Quarante-trois phages possèdent des extrémités cohésives, ce qui suggère que le chromosome phagique de ces 43 phages passe par une forme intermédiaire circularisée au cours de son cycle lytique. La stabilité des extrémités cohésives est plus forte que celle qui a été déterminée pour le phage  $\lambda$ , puisque 5 min de chauffage à 65°C ne provoquent qu'une dissociation partielle de celles-ci. La longueur supérieure de la séquence correspondante ou un contenu supérieur en bases G+C sont probablement responsables de cette forte stabilité.



La présence de quelques fragments de restriction d'intensité plus faible et de petite taille (fig. 10 et 12) suggère que le mécanisme dit de "la tête pleine" décrit pour le phage tempéré BK5-T de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Lakshmidevi *et al.*, 1990) pourrait être également utilisé par de nombreux phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Quant aux bandes de grande taille et d'intensité faible, elles pourraient résulter de digestions partielles ou de la présence d'impuretés protéiques dans les préparations d'ADN, qui perturbent l'action des enzymes de restriction.

Les phages propagés sur CNRZ 1205 possèdent des profils de restriction très proches, voire identiques (fig. 10) et certains fragments ont une taille identique à ceux du phage tempéré natif 01205. En outre, ces phages présentent des spectres d'hôtes apparentés. Pour examiner plus avant cette convergence des profils de restriction, lorsque les phages sont propagés sur la souche CNRZ 1205, les phages du groupe 1 (tableau 9) ont été tout d'abord produits sur leur souche d'isolement (fig. 13). Tous les phages possèdent alors des profils de restriction *Hind*III différents de celui de 0701.CNRZ 1205 et différents entre eux. Ils ont été purifiés sur la souche CNRZ 1205 à différentes époques, en fonction de leur entrée dans la collection, et cela va à l'encontre d'une contamination systématique et reproductible des lysats phagiques. En outre, aucun phage ne présentait, à l'isolement, un profil homologue à celui de 0701.CNRZ 1205, à l'exception du phage  $\phi$ 5.CNRZ 888, qui a un profil relativement apparenté. On retiendra aussi que les phages, une fois qu'ils sont propagés sur la souche CNRZ 1205, conservent un profil identique à celui du phage 0701.CNRZ 1205, après avoir été à nouveau propagés sur leur souche d'isolement. Dans un deuxième temps, le phage tempéré natif, 01601, et le phage  $\phi$ 4, isolé comme lytique (qui appartient au groupe 1 du tableau 9), ont été utilisés comme modèles, afin d'analyser plus précisément les interactions qui existent entre le phage tempéré 01205, hébergé par la souche de propagation, et le phage infectant.

### **2.5.3. Interactions entre le phage tempéré natif 01601 et le phage tempéré natif 01205**

Après propagation sur la souche CNRZ 1205, l'ADN du phage tempéré 01601 présente un profil de restriction différent de celui de l'ADN du phage tempéré natif correspondant. Partant d'un nouveau lysat d'induction de CNRZ 1601, un autre clone du phage 01601 a alors été purifié et enrichi sur CNRZ 1205. L'ADN du nouveau clone phagique a été extrait et analysé en électrophorèse d'agarose, comme précédemment.

Le profil de restriction *Hind*III obtenu est identique à celui du premier clone étudié. Nous avons ensuite essayé d'extraire directement l'ADN de la totalité de la récolte phagique obtenue en propageant le phage 01601 induit sur la souche CNRZ 1205.



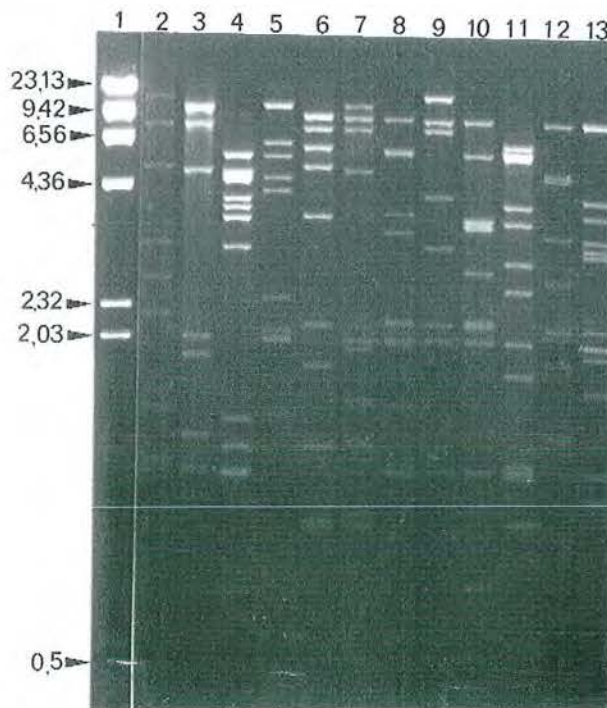


**Figure 12.** Mise en évidence des extrémités cohésives du phage tempéré 0701 (\*).

1 0701.CNRZ 1205 non chauffé

2 0701.CNRZ 1205 chauffé

Les ADN ont été chauffés 10 min à 70°C. L'électrophorèse en gel d'agarose (0,8%) a été réalisée dans du tampon TBE, à 2V/cm pendant 6 h.

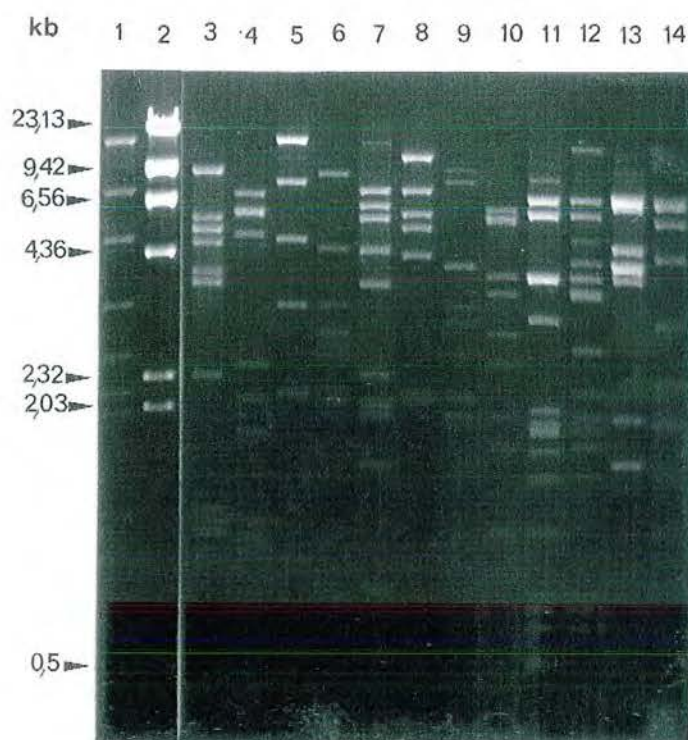


**Figure 13.** Les 13 profils de restriction *Hind*III caractéristiques, obtenus pour les 17 phages propagés sur d'autres souches que la souche CNRZ 1205

- 1 ADN du phage  $\lambda$  digéré par *Hind*III
- 2 b6.CNRZ 447
- 3 124/44.CNRZ 447
- 4 447-B4.CNRZ 447
- 5 01209.CNRZ 701
- 6  $\phi$ 1.CNRZ 887
- 7 c20.CNRZ 1151
- 8 Ba24.CNRZ 1151

- 9 1151-B10.CNRZ 1151
- 10 1151-ITG.CNRZ 1151
- 11 BaS19.CNRZ 1575
- 12 BaS265.CNRZ 1589
- 13  $\phi$ 29.CNRZ 1597

Les ADN ont été chauffés 10 min à 70°C. L'électrophorèse en gel d'agarose (0,8%) a été réalisée dans du tampon TBE, à 2V/cm pendant 6 h.



**Figure 14.** Profils de restriction *Hind*III des phages du groupe I (tableau 9) propagés sur leur souche d'isolement

- |   |   |    |                    |
|---|---|----|--------------------|
| 1 | 0701.CNRZ 1205                                    | 8  | sch.CNRZ 456       |
| 2 | ADN du phage $\lambda$ digéré par <i>Hind</i> III | 9  | 440-B4.CNRZ 440    |
| 3 | 0701 natif  | 10 | BaS110.CNRZ 1582   |
| 4 | $\phi$ 4.CNRZ 888                                 | 11 | BaS215.CNRZ 1585   |
| 5 | $\phi$ 5.CNRZ 888                                 | 12 | BaS85.CNRZ 1590    |
| 6 | 55/15.CNRZ 1591                                   | 13 | $\phi$ 11.CNRZ 885 |
| 7 | sc.CNRZ 447                                       | 14 | BaS102.CNRZ 1581   |

Les ADN ont été chauffés 10 min à 70°C. L'électrophorèse en gel d'agarose (0,8%) a été réalisée dans du tampon TBE, à 2V/cm pendant 6 h.



Nous n'avons pas pu obtenir, même en utilisant des MOI élevées, une production de phages suffisante pour extraire de l'ADN phagique. Une bonne récolte phagique requiert en effet un second passage sur la souche CNRZ 1205.

Le lysat d'induction de CNRZ 1601 a été également testé sur la souche CNRZ 1707, qui dérive de CNRZ 1205. Cette souche guérie est malheureusement résistante au phage tempéré induit 01601, comme d'ailleurs à tous les autres phages induits, à l'exception de 01205. Le phage 01601 natif a alors été purifié sur une autre souche non lysogène, CNRZ 1443 (voir tableau 4 et se reporter à la publication jointe en annexe), et le profil de restriction *HindIII* de l'ADN du phage 01601.CNRZ 1443 a alors été trouvé identique à celui de l'ADN du phage tempéré natif 01601.

#### ◆ Conclusion

L'ADN du phage tempéré natif 01601 apparaît différent de celui de ce même phage, après multiplication sur la souche lysogène CNRZ 1205. Nous avons mis en évidence un remaniement préférentiel, sans pouvoir préciser s'il est le seul à se produire ou si, au contraire, d'autres remaniements génomiques se produisent moins fréquemment. Propagé sur une souche non lysogène, l'ADN du phage tempéré natif n'est pas modifié. Il convenait alors de voir de plus près les remaniements que semble subir un phage infectant au contact du prophage résident de la souche CNRZ 1205.

#### 2.5.4. Interactions génomiques entre l'ADN du prophage 01205 et l'ADN du phage infectant $\phi$ 4.CNRZ 888

Rappelons que l'étude des génomes phagiques a montré que les profils de restriction *HindIII* des ADN extraits d'un certain nombre de phages, après que ceux-ci avaient été propagés sur la souche indicatrice lysogène CNRZ 1205, étaient identiques ou très proches, alors que les profils des ADN natifs correspondants étaient tous nettement différents (cf. paragraphe 2.4.2). Ces phages ont été rassemblés dans le groupe I (tableau 9).

Une hypothèse est que les phages du groupe I subissent des réarrangements génomiques au contact du prophage 01205. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé les profils *HindIII* des ADN de quelques phages représentatifs de ce groupe ( $\phi$ 4,  $\phi$ 5, 440-B4 et BaS85.OR), obtenus après que ces phages avaient été propagés sur la souche CNRZ 1205. Nous avons sondé ces génomes d'une part avec l'ADN natif du prophage 01205 et, d'autre part, avec l'ADN natif du phage infectant, propagé sur sa souche d'isolement (c'est-à-dire les ADN respectifs de  $\phi$ 4.OR,  $\phi$ 5.OR, 440-B4.OR et BaS85). Ajoutons ici qu'aucune des souches examinées ne contient

d'ADN plasmidique et qu'il n'existe pas d'homologie, détectable par hybridation, entre les ADN phagiques et les ADN bactériens, ce qui exclut toute interaction à ce niveau.

Comme le montre la figure 15, à titre d'exemple, pour un profil *Hind*III du phage  $\phi$ 4.CNRZ 1205, certains des fragments du profil (F6 et F8) hybrident uniquement avec la sonde 01205, alors que d'autres fragments (F1, F4, F5 et F7) ne sont révélés qu'avec la sonde  $\phi$ 4.OR et que le fragment F3 hybride avec les 2 sondes. Il en va de même pour 2 autres phages examinés,  $\phi$ 5.OR et 440-B4.OR. Cela indique que, dans les 3 cas, le phage produit dans la souche CNRZ 1205 contient de l'ADN provenant du phage infectant et de l'ADN provenant du prophage 01205. Le phage produit serait issu d'un réarrangement génomique.

Dans le cas du phage BaS85.CNRZ 1205, la réponse des hybridations est moins claire. Si les mêmes fragments sont à nouveau révélés par la sonde 01205, tous les fragments du profil hybrident, cette fois, avec la sonde BaS85.OR. Cela montre que de l'homologie existe entre les phages 01205 et BaS85.OR, mais la preuve d'un réarrangement génomique n'est pas établie.

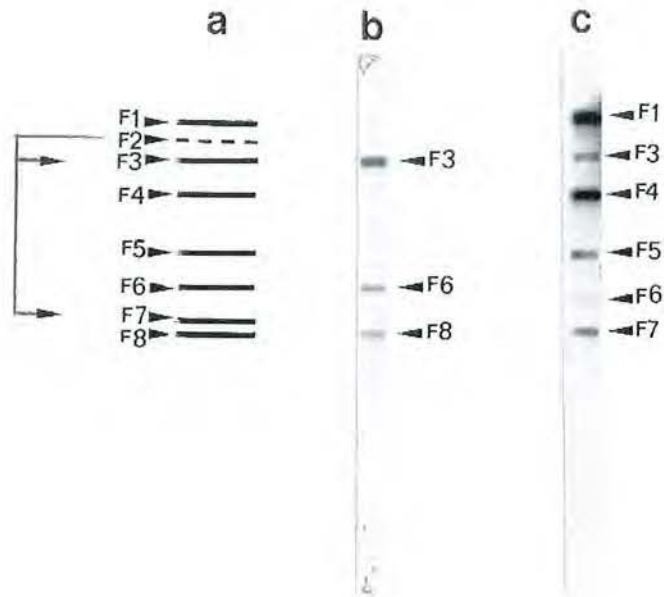
L'analyse de ces réarrangements génomiques n'a pas été poursuivie, faute de temps. Elle mériterait d'être continuée, pour savoir si les échanges de matériel génomique, entre phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, sont bien de nature modulaire comme l'a montré Botstein (1980), dans le cas des coliphages.

#### **2.5.5. Recherche de l'homologie entre les différents phages. Hybridation ADN-ADN**

Nous avons analysé le degré d'homologie qui existe entre 1) les phages tempérés et les phages virulents, 2) les phages produits sur des souches lysogènes et ceux qui sont produits sur des souches non lysogènes et 3) les phages qui proviennent de différentes collections. Pour ce faire, des hybridations ont été réalisées. La comparaison des profils de restriction *Hind*III a été réalisée après transfert, sur des membranes d'hybridation, des gels d'agarose présentés sur les figures 11 et 13.

Les ADN génomiques totaux du phage tempéré natif 01205 et du phage virulent 1151-B10.CNRZ 1151 ont été utilisés comme sondes. Une hybridation croisée existe entre ces 2 ADN (fig. 16). Il existe de la parenté entre le génome des phages tempérés et celui des phages virulents. L'ADN du phage tempéré natif 01205 présente le même degré d'homologie avec des phages virulents produits sur CNRZ 1205 et avec des phages virulents produits sur différentes souches indicatrices non lysogènes (fig. 15.I).





**Figure 15.** Interactions génomiques entre l'ADN du phage tempéré natif 01205 et le phage infectant  $\phi$ 4.CNRZ 888

**a** Profil du phage  $\phi$ 4.CNRZ 1205, digéré par *Hind*III. Les fragments constitutifs des extrémités cohésives sont fléchés.

**Hybridation du profil présenté en a avec, comme sonde:**

**b** ADN du phage tempéré natif 01205.

**c** ADN du phage  $\phi$ 4.CNRZ 888

L'ADN du phage 1151-B10.CNRZ 1151 hybride également avec les ADN des phages tempérés et ceux des phages virulents produits sur CNRZ 1205, ou avec les ADN des phages virulents propagés sur des souches indicatrices différentes (fig. 15.II).

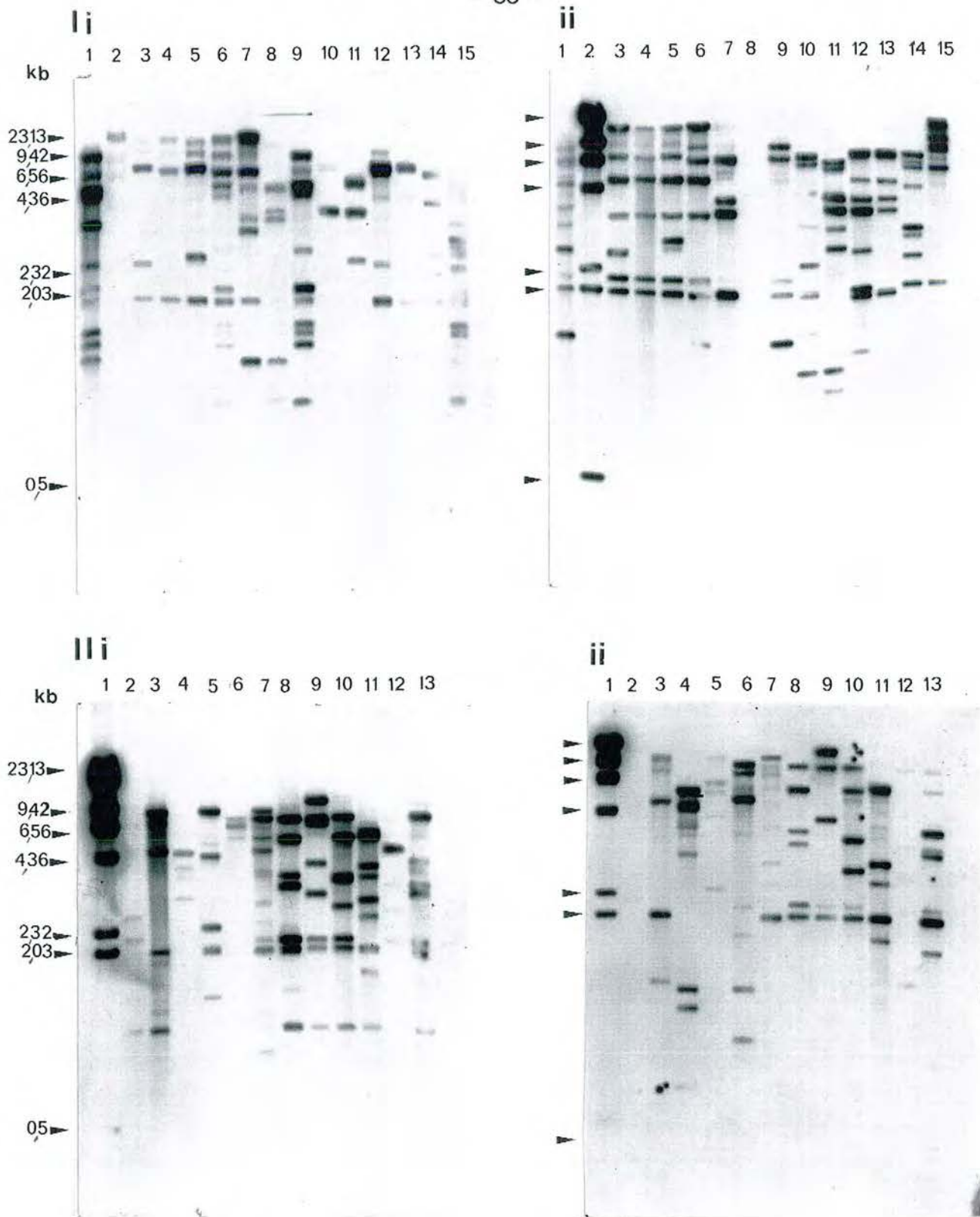
Le degré d'hybridation est sensiblement le même avec l'une ou l'autre des 2 sondes, mais ce sont souvent des fragments différents du même génome phagique qui sont révélés par chacune des 2 sondes. L'origine du phage ne semble pas jouer un rôle déterminant, puisque les gels des figures 11 et 13 présentent des ADN de phages provenant des collections de Benbadis, Neve, Sebastiani et Sozzi.

#### ◆ Conclusion

Il existe une grande diversité au niveau des profils de restriction des génomes phagiques, mais de l'homologie existe entre tous ces ADN. En particulier, les phages tempérés sont apparentés aux phages virulents.

#### 2.5.6. Hybridation des profils de restriction *EcoRV* de 24 génomes phagiques avec la sonde pNST21

Aucune hybridation n'a été détectée entre les ADN phagiques et la sonde pNST21.



**Figure 16.** Mise en évidence de l'homologie existant entre les différents ADN phagiques

- I) ADN phagiques présentés dans la figure 11a.
- II) ADN phagiques présentés dans la figure 13

**Sondes utilisées :**

- i) ADN du phage tempéré natif 01205 et ADN du phage  $\lambda$
- ii) ADN du phage 1151-B10.CNRZ 1151 et ADN du phage  $\lambda$

Voir légendes des figures 11a et 13

### 3. Interactions phages–bactéries

#### 3.1. Recherche des souches lysogènes

##### 3.1.1. Induction avec la mitomycine C

Douze souches (tableau 10) de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, parmi les 107 premières souches traitées avec la MC, ont présenté une courbe en cloche caractéristique d'une induction. Les autres souches du tableau 2a, testées ultérieurement, n'ont pas présenté de courbe d'induction typique. Dans un premier temps, des souches indicatrices n'ont été trouvées que pour 9 phages tempérés, 0701, 01209, 01210, 01358, 01598, 01599 et 01601. La présence de phages, dans les lysats d'induction des 3 dernières souches inductibles (CNRZ 1198, 1200 et 1205), a d'abord été confirmée par la microscopie électronique. Ensuite, ces phages se sont révélés actifs, lorsque d'autres souches ont été disponibles, au cours de l'étude (tableau 4). Les souches indicatrices correspondantes ayant été obtenues tardivement, les 3 derniers phages (01198, 01200, 01205) n'ont pas été inclus dans tous les essais consacrés, dans le présent travail, à la caractérisation des phages. Parmi les 7 premiers phages tempérés étudiés, 4 n'attaquent qu'une seule souche (tableau 10). Ces souches sont elles-mêmes lysogènes. Les 3 autres phages (01598, 01599 et 01601) sont actifs respectivement sur 4, 5 et 6 souches, lysogènes ou non. Ils sont tous exigeants en ions  $Ca^{2+}$ .

Certains lysats d'induction, signalés dans le tableau 10, se sont révélés très inhibiteurs sur d'autres souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. La recherche de composés inhibiteurs, selon le protocole décrit par Piard *et al.* (1990), n'a toutefois pas permis de mettre en évidence des substances de type bactériocine.

##### 3.1.2. Hybridation du phage 01358 avec des "transferts en goutte" des ADN des 107 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

Les "transferts en goutte" des ADN des souches présentés dans la figure 5 ont été hybridés avec l'ADN du phage tempéré 01358, propagé sur la souche CNRZ 1205 (fig. 17.I et 17.II).



**Tableau 10.** Inductibilité de 107 souches CNRZ de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* avec la mitomycine C

Douze souches inductibles

Souche (N° CNRZ)	Phage hébergé	Souches indicatrices (N° CNRZ)
701	0701	<u>1205</u>
1198	01198	1597*
1200	01200	1597*
1205	01205	1707*
1209	01209	<u>701</u>
1210	01210	<u>701</u>
1358	01358	<u>1205</u>
1529	01529	<u>1205</u>
1530	01530	<u>1205</u>
1598	01598	<u>1200</u> , <u>1205</u> , 1400, 1600
1599	01599	<u>1200</u> , <u>1205</u> , 1400, 1443, 1600
1601	01601	<u>1200</u> , <u>1205</u> , 1237, 1400, 1443, 1600

Quatre-vingt-dix-sept souches non inductibles

7, 22, 25, 26, 27, 160, 161, 302, 307, 308, 309, 310, 312, 366, 368, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 402, 403(i), 404(i), 405, 406, 407, 408, 409, 410, 439, 440, 441, 445, 446, 447, 455, 456, 461, 463, 464, 702, 703, 736, 748, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 778, 779, 780(i), 781, 782, 783, 784, 884, 885, 886(i), 887, 888, 889(i), 1005, 1066, 1068, 1100, 1119, 1120, 1151, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1157, 1197, 1199(i), 1201, 1202, 1203, 1204, 1206, 1207, 1208, 1211, 1212, 1213(i), 1237, 1359, 1400, 1401, 1443, 1446, 1600.

Les souches indicatrices lysogènes sont soulignées.

\* Les souches indicatrices des phages 01198, 01200 et 01205 ne faisaient pas partie des 110 souches CNRZ examinées initialement.

(i) : souche sécrétant des substances inhibitrices.

**Figure 17.I.** Recherche des souches lysogènes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

A: Répartition des ADN des souches sur la membrane 1 de "transfert en goutte"

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CNRZ 1446	CNRZ 1358	CNRZ 1446	CNRZ 7	CNRZ 1598	CNRZ 22	CNRZ 1600	CNRZ 25	CNRZ 26	CNRZ 27	S. f CNRZ 137	CNRZ 160
B	CNRZ 1358	CNRZ 161	CNRZ 302	CNRZ 307	CNRZ 308	CNRZ 309	CNRZ 310	L. h CNRZ 65	CNRZ 312	CNRZ 366	CNRZ 368	CNRZ 385
C	L. h 328	S. s CNRZ1459	CNRZ 386	CNRZ 387	C. p	CNRZ 388	CNRZ 389	CNRZ 390	CNRZ 391	CNRZ 1358	CNRZ 402	CNRZ 403
D	CNRZ 404	CNRZ 405	CNRZ 406	L. h CNRZ1096	M. l	S. f CNRZ 137	CNRZ 407	CNRZ 408	CNRZ 409	CNRZ 410	S. ni CNRZ 411	S. ni CNRZ 412
E	CNRZ 439	CNRZ 440	CNRZ 441	CNRZ 445	CNRZ 446	CNRZ 447	CNRZ 455	CNRZ 456	CNRZ 457	CNRZ 461	CNRZ 463	CNRZ 464
F	C. p	M. l	S. s CNRZ1459	CNRZ 1446	L. h CNRZ 65	S. f CNRZ 137	CNRZ 701	CNRZ 702	CNRZ 703	S. c CNRZ 105	S. f CNRZ 137	CNRZ 1358
G	CNRZ 1358	CNRZ 736	CNRZ 748	CNRZ 756	L. h CNRZ 65	CNRZ 757	CNRZ 758	CNRZ 759	CNRZ 760	CNRZ 761	CNRZ 778	CNRZ 779
H	CNRZ 780	CNRZ 781	L. h CNRZ 328	C. p	S. s CNRZ1459	M. l	CNRZ 782	CNRZ 783	CNRZ 784	CNRZ 884	CNRZ 885	CNRZ 886

C.p : *Clostridium perfringens*, L.h : *Lactobacillus helveticus*, M.l : *Micrococcus luteus*, S.c : *Streptococcus cremoris*, S.f : *Streptococcus faecalis*, S.ni : *Streptococcus* non identifié, S.s : *S. salivarius* subsp. *salivarius*

B: Autoradiographie obtenue après hybridation de l'ADN du phage 01358 avec les ADN des souches

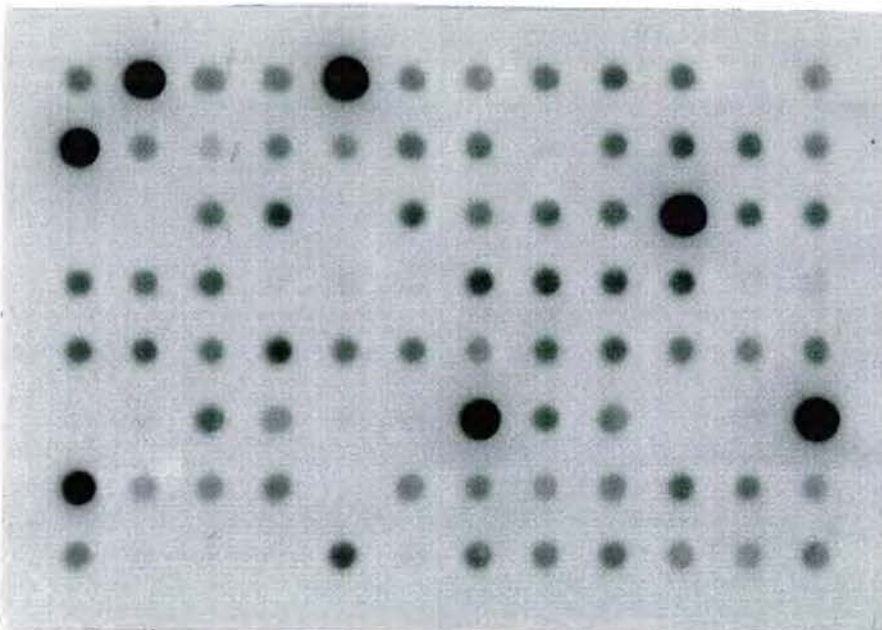


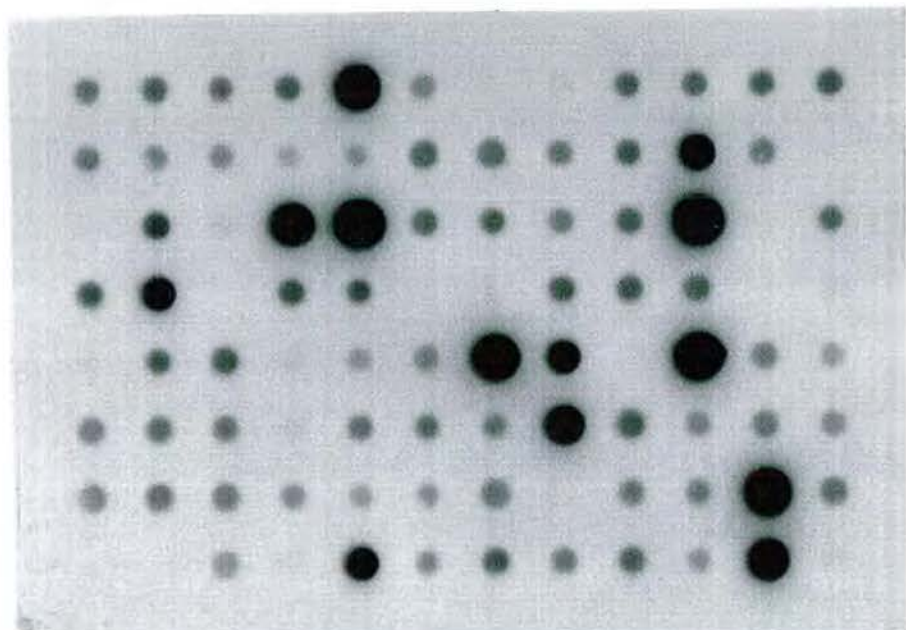
Figure 17.II. Recherche des souches lysogènes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

A: Répartition des ADN des souches sur la membrane 2 de "transfert en goutte"

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CNRZ 887	CNRZ 888	CNRZ 889	CNRZ 1005	CNRZ 1358	CNRZ 1446	S.c CNRZ 105	S.f CNRZ 137	CNRZ 1066	CNRZ 1068	CNRZ 1100	CNRZ 1119
B	CNRZ 1120	CNRZ 1151	CNRZ 1152	CNRZ 1153	CNRZ 1154	CNRZ 1155	CNRZ 1156	CNRZ 1157	CNRZ 1197	CNRZ 1198	CNRZ 1199	L.h CNRZ 65
C	C.p	S.s CNRZ1459	M.l	CNRZ 1358	CNRZ 1200	CNRZ 1201	CNRZ 1202	CNRZ 1203	CNRZ 1204	CNRZ 1205	CNRZ 1206	CNRZ 1207
D	CNRZ 1208	CNRZ 1209	CNRZ 1210	CNRZ 1211	CNRZ 1212	e.d	S.f CNRZ 137	CNRZ 1213	CNRZ 1237	CNRZ 1242	C.p	M.l
E	L.h CNRZ1096	CNRZ 1400	CNRZ 1401	S.ni CNRZ1402	CNRZ 1443	CNRZ 1446	CNRZ 1358	CNRZ 1358	C.p	CNRZ 1358	CNRZ 7	CNRZ 302
F	CNRZ 312	CNRZ 368	CNRZ 403	S.ni CNRZ 412	CNRZ 440	CNRZ 455	CNRZ 463	CNRZ 701	CNRZ 756	CNRZ 759	CNRZ 760	CNRZ 885
G	CNRZ 886	CNRZ 1005	CNRZ 1119	CNRZ 1151	CNRZ 1153	CNRZ 1154	CNRZ 1156	L.h CNRZ 65	CNRZ 1197	CNRZ 1199	CNRZ 1200	CNRZ 1201
H	CNRZ 1206	e.d	CNRZ 1446	S.f CNRZ 137	CNRZ 1209	CNRZ 1212	CNRZ 1237	CNRZ 1400	CNRZ 1401	CNRZ 1443	CNRZ 1358	M.l

C.p : *Clostridium perfringens*, e. d : eau distillée, L.h : *Lactobacillus helveticus*, M.l : *Micrococcus luteus*, S.c : *Streptococcus cremoris*, S.f : *Streptococcus faecalis*, S.ni : *Streptococcus* non identifié, S.s : *S. salivarius* subsp *salivarius*

B: Autoradiographie obtenue après hybridation de l'ADN du phage 01358 avec les ADN des souches





Des taches d'hybridation d'intensité différente ont été observées. Des taches de forte intensité ont été uniquement obtenues avec 7 des 12 souches précédemment trouvées inductibles (CNRZ 701, 1198, 1200, 1205, 1209, 1358 et 1598). Une huitième souche inductible, CNRZ 1210, n'a pas été détectée car la quantité d'ADN déposée était insuffisante (cf. paragraphe 1.2.) et 4 autres souches (CNRZ 1529, 1530, 1599 et 1601) n'ont pas été sondées. Toutes les autres souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* examinées présentent une tache d'hybridation d'intensité plus faible et variable (voir ci-dessous), à l'exception des 5 autres souches qui, comme CNRZ 1210, n'avaient pas hybridé avec la sonde pNST21 (CNRZ 411, 412, 1206 et 1402). Ces résultats montrent qu'il existe une bonne corrélation entre l'induction et la présence d'un prophage. Aucune souche testée n'héberge de prophage défectif apparenté à 01358.

#### ► Hybridations de faible intensité

Nous avons cherché à localiser la faible homologie qui existe entre l'ADN du phage tempéré 01358 et les génomes des souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* qui ne sont pas lysogènes. Des hybridations sur des profils de restriction *HindIII* de 11 de ces souches ont été réalisées. Aucun signal de forte intensité n'a été décelé (fig. 18a). L'homologie est donc répartie sur l'ensemble du génome. L'utilisation d'une autre enzyme de restriction, *EcoRV*, et d'une autre sonde d'ADN phagique (le phage tempéré 0701.CNRZ 1205) ont donné une réponse analogue (fig. 18b).

#### 3.1.3. Lysogénie de la souche type de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*

Comme le montre la figure 19, la souche type CNRZ 1358 (NCDO 573, reçue de la NCFB en 1990) hybride fortement avec la sonde 01358.CNRZ 1205. Aucune hybridation n'est détectée avec l'ADN de la souche CNRZ 1446 (ATCC 19258, reçue de l'ATCC en 1990) qui, en outre, n'est pas inductible avec la MC, contrairement à la souche reçue de la NCFB et ne donne pas de signal de forte intensité avec le phage 01358 comme sonde (fig. 17.I et 17.II). Pour confirmer cette observation, les profils de restriction *EcoRV* des 4 souches CNRZ isogéniques, représentatives de la souche type de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, mais provenant de collections différentes, ont été hybridés avec l'ADN du phage 01358. L'ADN des souches CNRZ 1358 (NCDO 573) et CNRZ 1446 (ATCC 19258) a donc été extrait de nouveau, et les 2 autres souches isogéniques, représentatives de la souche type, CNRZ 1529 (reçue de la collection de l'Institut Pasteur) et CNRZ 1530 (reçue de la collection DSM allemande) ont donc été adjointes à l'étude.



Les souches CNRZ 1358, 1529 et 1530 ont bien été trouvées lysogènes (fig. 19). Le profil d'hybridation de ces 3 souches est identique et très proche du profil de l'ADN du phage 01358.CNRZ 1205. Seuls quelques petits fragments de ce dernier sont absents dans les profils des 3 souches. Par contre, aucune hybridation n'est observée avec l'ADN de la souche CNRZ 1446. Pour comparer ces 4 souches CNRZ isogéniques, une hybridation des 4 ADN correspondants, digérés avec *EcoRV*, a été réalisée avec la sonde pNST21. Quatre profils d'hybridation identiques ont été obtenus (fig. 19b). Ce résultat montre que les 3 souches, CNRZ 1446, 1529 et 1530, dérivent bien de la souche originale NCDO 573, comme CNRZ 1358.

### **3.1.4. Comparaison des profils d'hybridation *EcoRV* obtenus avec la sonde pNST21 pour certaines souches, lysogènes ou non**

#### **- Comparaison de la souche non lysogène CNRZ 312 avec la souche dérivée lysogène CNRZ 1690**

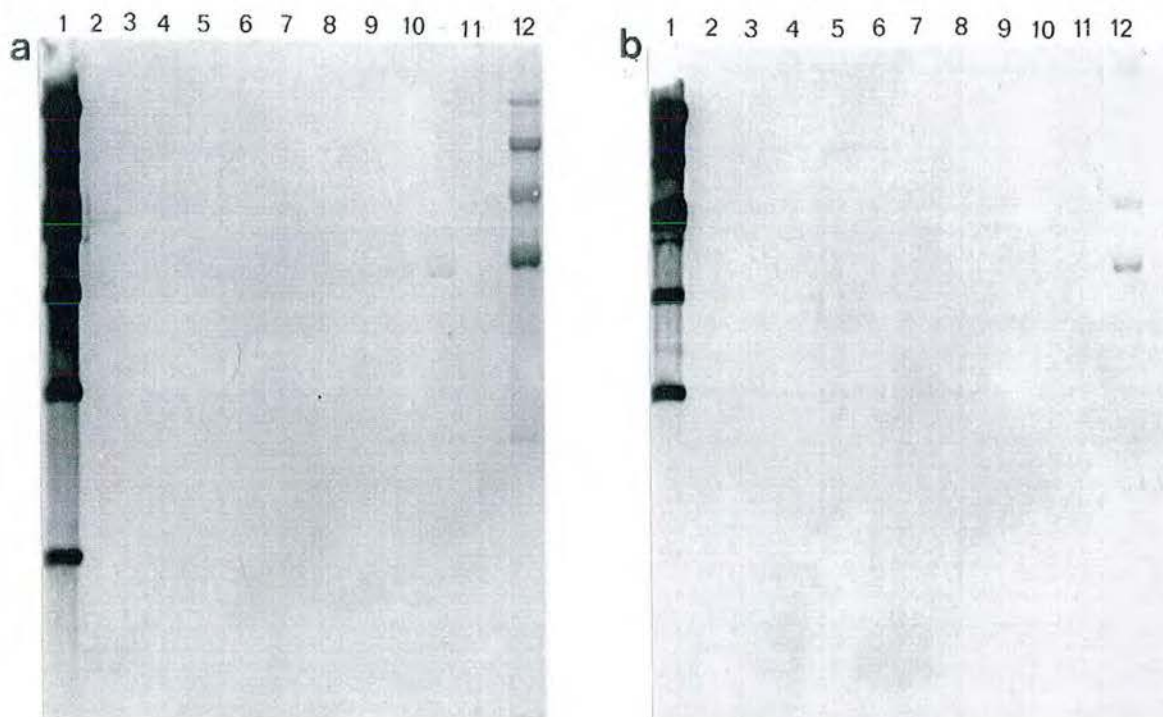
La souche CNRZ 312 a été lysogénisée avec le phage tempéré 01209.CNRZ 701. Un clone, sur les 50 testés, a été trouvé lysogène. Les profils de restriction *EcoRV* des génomes de la souche mère, CNRZ 312, et de la souche lysogénisée, CNRZ 1690, ont été hybridés avec pNST21. Un profil d'hybridation identique est obtenu pour les 2 souches (fig. 20). Le prophage ne s'intègre donc pas dans le fragment de 4,2 kb de la sonde.

#### **- Comparaison des souches guéries CNRZ 1707 et 1715 avec les souches lysogènes dont elles dérivent, CNRZ 1205 et 1690**

Deux souches, CNRZ 1205 et 1690, ont été guéries de leur prophage après induction avec la MC. Un clone sur 117 examinés (0,8%) a été trouvé sensible au phage 01205 et 1 clone sur 60 testés (2%), sensible au phage 01690. Chaque clone a été purifié par 3 réisolements successifs, et a été testé pour sa non inductibilité et sa sensibilité au prophage de la souche-mère lysogène. Des profils d'hybridation homologues ont été obtenus dans chaque cas, avec pNST21, entre la souche lysogène et la souche guérie (fig. 21, à titre d'exemple, la souche CNRZ 1205 et son clone dérivé guéri, CNRZ 1707).

#### **- Comparaison des souches lysogènes CNRZ 1598, 1599 et 1601 et de la souche non lysogènes CNRZ 1600**

Les profils d'hybridation *EcoRV* avec la sonde pNST21 sont les mêmes pour les 2 clones dérivés de la souche CNRZ 21 (CNRZ 1598 et 1599) et pour les 2 clones dérivés de la souche CNRZ 24 (CNRZ 1600 et 1601).



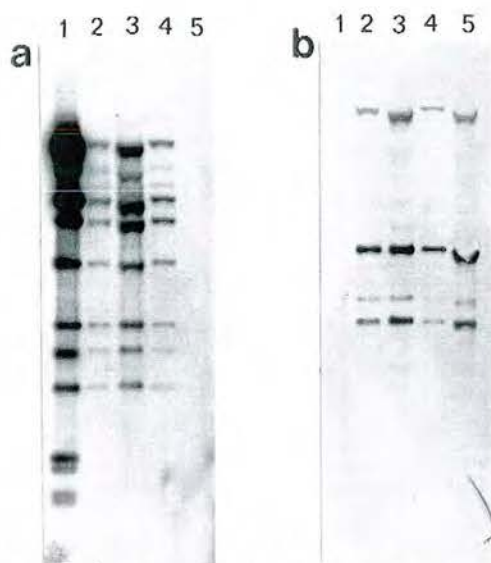
**Figure 18.** Localisation de l'homologie entre l'ADN de 11 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* présentant une homologie faible en "transfert de goutte", et les ADN de 2 phages tempérés, utilisés comme sondes:

**a** ADN du phage tempéré 01358.CNRZ 1205, sur des profils de restriction *Hind*III

**b** ADN du phage tempéré 0701.CNRZ 701, sur des profils de restriction *Eco*RV

- |   |                              |   |          |    |            |
|---|------------------------------|---|----------|----|------------|
| 1 | ADN du phage 01358.CNRZ 1205 | 5 | CNRZ 440 | 9  | CNRZ 1151  |
| 2 | CNRZ 25                      | 6 | CNRZ 447 | 10 | CNRZ 1237  |
| 3 | CNRZ 302                     | 7 | CNRZ 703 | 11 | CNRZ 1443  |
| 4 | CNRZ 368                     | 8 | CNRZ 888 | 12 | CNRZ 1358* |

\* Souche type, lysogène.

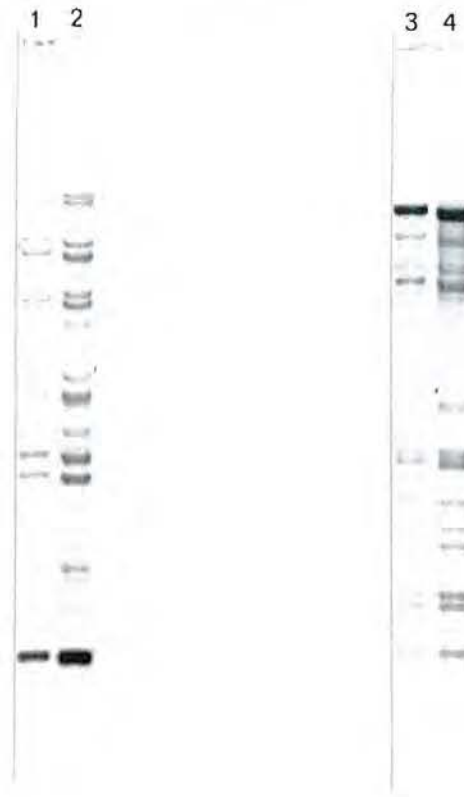


**Figure 19.** Profils d'hybridation *Eco*RV de l'ADN des 4 souches CNRZ représentatives de la souche type de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, avec comme sonde:

**a** ADN du phage tempéré 01358.CNRZ 1205

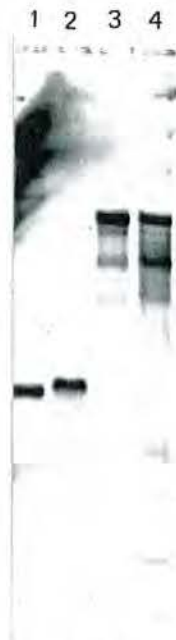
**b** ADN du plasmide pNST21

- |   |                              |   |           |
|---|------------------------------|---|-----------|
| 1 | ADN du phage 01358.CNRZ 1205 | 4 | CNRZ 1530 |
| 2 | CNRZ 1358                    | 5 | CNRZ 1446 |
| 3 | CNRZ 1529                    |   |           |



**Figure 20.** Profils obtenus après hybridation du plasmide pNST21 avec les fragments de restriction *Hind*III et *Eco*RV des souches CNRZ 312 et CNRZ 1690

<i>Hind</i> III		<i>Eco</i> RV	
1	CNRZ 312	3	CNRZ 312
2	CNRZ 1690	4	CNRZ 1690



**Figure 21.** Profils obtenus après hybridation du plasmide pNST21 avec les fragments de restriction *Hind*III et *Eco*RV des souches CNRZ 1205 et CNRZ 1707

<i>Hind</i> III		<i>Eco</i> RV	
1	CNRZ 1205	3	CNRZ 1205
2	CNRZ 1707	4	CNRZ 1707

### 3.1.5. Conclusion

Douze des 118 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* répertoriées dans le tableau 2a sont lysogènes, ce qui représente une fréquence apparente de 8% environ. Huit d'entre elles proviennent de produits laitiers artisanaux, 3 de fromageries du Jura (CNRZ 1598, 1599 et 1601) et 5 de yaourts grecs (CNRZ 1198, 1200, 1205, 1209 et 1210). La neuvième souche, CNRZ 701, provient d'un levain commercial de fromagerie utilisé dans les années 50, en Finlande, par la coopérative Valio. Enfin, les 3 dernières souches sont la souche type de la collection NCDO, isolée du lait pasteurisé en Grande-Bretagne, vers 1947 et les 2 souches isogéniques, CNRZ 1529 et 1530. La souche type reçue de la collection ATCC n'est, par contre, pas lysogène. Ce résultat avait été précédemment entrevu par d'autres auteurs, Benbadis *et al.* (1990) et Larbi *et al.* (1990), qui n'avaient pas observé d'hybridation de l'ADN de la souche ATCC avec des ADN de phages virulents utilisés comme sondes. Tous les phages sont actifs, après induction avec la MC, sur des souches indicatrices.

### 3.2. Localisation des prophages dans le génome bactérien

Pour localiser les prophages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, des hybridations ont été réalisées entre les génomes des souches lysogènes et les ADN des phages tempérés natifs correspondants. Les hybridations ont été faites sur des profils de restriction *Hind*III.

Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de mettre en évidence des sites d'intégration, mais les rendements très faibles obtenus, lors de la préparation des ADN des phages tempérés natifs, ne nous permettaient pas d'opérer dans des conditions optimales. Aussi avons-nous utilisé un autre phage tempéré, plus facile à produire, le phage 01209.CNRZ 701. Nous avons recherché le site d'intégration de ce phage dans le génome de la souche lysogénisée CNRZ 1690. Les ADN phagiques et chromosomiques ont été digérés par différentes endonucléases, qui génèrent entre 4 à 10 coupures sur le génome phagique. Les enzymes suivantes ont été utilisées: *Bcl*I, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Nco*I, *Pvu*I et *Pvu*II, et des digestions simples ou doubles ont été réalisées. Aucune différence n'a été observée, quelle que soit l'enzyme utilisée, entre le profil d'hybridation du phage 01209.CNRZ 701 et celui de la souche CNRZ 1690 (fig. 22), que les ADN soient chauffés ou non avant d'être déposés.



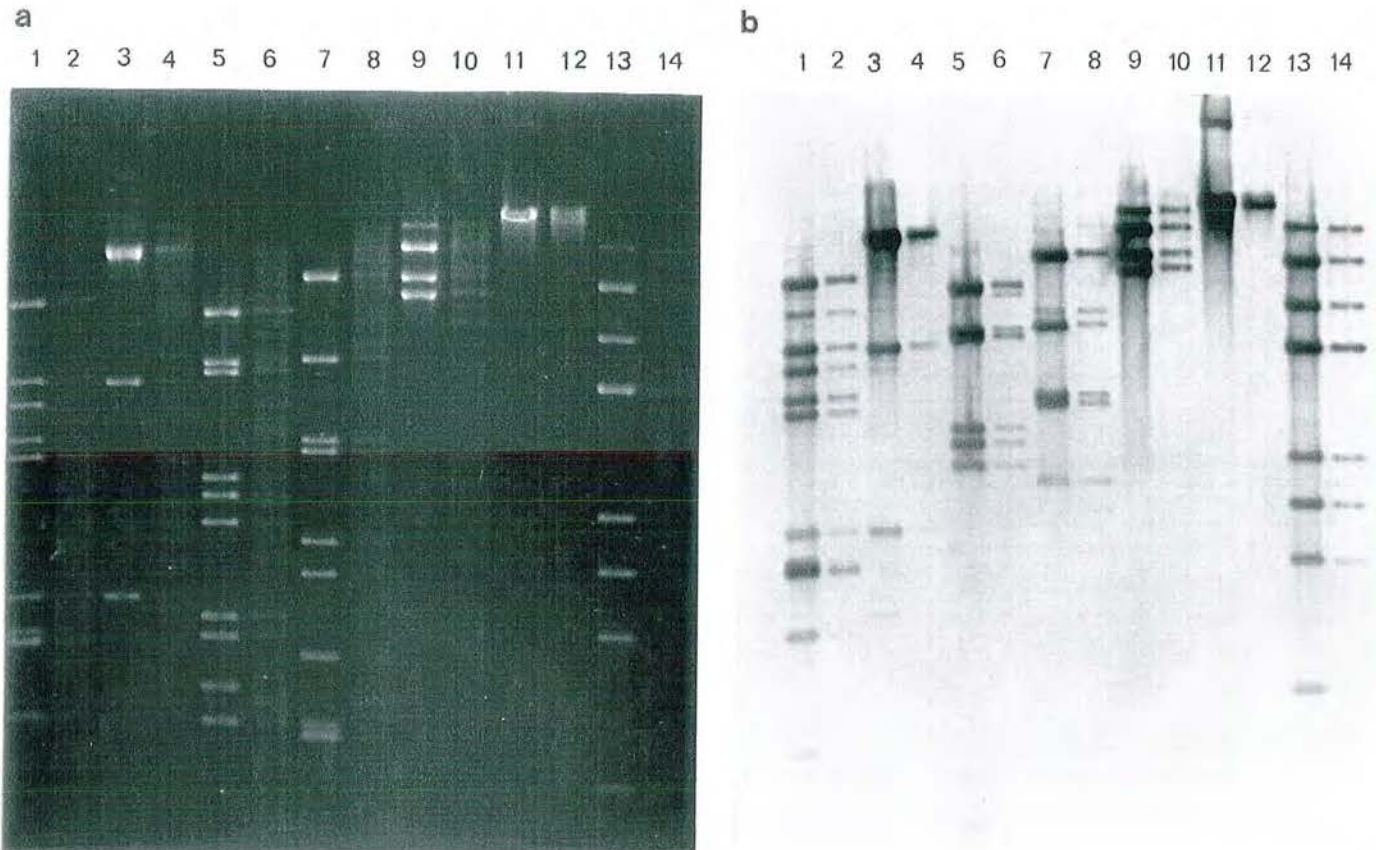
Le profil d'hybridation du phage n'apparaît donc pas altéré lorsque l'on sonde l'ADN bactérien de la souche lysogène et, en conséquence, aucun site d'intégration n'est visualisé. Tout se passe, à première vue, comme si l'ADN phagique extrait de la souche avec l'ADN bactérien était uniquement (ou très majoritairement) de l'ADN de phage libre. Il est donc possible que le phage ne soit pas intégré dans l'ADN bactérien; il est également possible qu'une forme intégrée du génome phagique coexiste avec une forme non intégrée, présente en nombre élevé de copies. Il est aussi envisageable que l'on ait affaire à un prophage qui soit aisément inductible, soit spontanément, soit au cours des premières étapes de l'extraction de l'ADN bactérien (par exemple, au cours du traitement des cellules avec le lysozyme, à 37°C pendant 1h). Pour essayer de trancher entre ces diverses possibilités, nous avons réalisé un certain nombre d'essais complémentaires:

- le culot cellulaire destiné à l'extraction de l'ADN bactérien a été soigneusement lavé 3 fois dans du tampon ES (EDTA 0,25 mM, pH 8, saccharose 10,3%) et on a vérifié, par un examen au microscope électronique, que le culot contenait bien de rares particules phagiques avant lavage, mais que celles-ci n'étaient plus retrouvées après. Il faut toutefois se souvenir que le seuil de discrimination est élevé ( $10^6$  UFP/ml). Autrement dit, des particules phagiques libres sont peut-être encore nombreuses, même si elles ne sont plus détectables avec le microscope électronique.

- le traitement au lysozyme, à 37°C pendant 1h, a été effectué en présence de rifampicine (50  $\mu$ g/ml), un inhibiteur des ARN-polymérases ADN-dépendantes et de l'assemblage des virions. Une extraction a également été réalisée, après avoir remplacé le lysozyme par la mutanolysine. Les profils d'hybridation n'en sont pas plus affectés que précédemment. Toutefois, on observe, avec l'enzyme *HindIII*, l'apparition d'un fragment supplémentaire de 5,6 kb de faible intensité sur le génome bactérien (résultats non montrés). Des essais complémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il s'agit bien du site d'intégration.

- le site d'intégration a été recherché en soumettant l'ADN bactérien non coupé à une électrophorèse en champ pulsé, avec un système CHEF. Dans ce cas, la sonde phagique hybride au niveau de l'ADN chromosomique bactérien non coupé (fig. 23). Aucun signal n'est visible au niveau d'un fragment de 42 kb (taille du génome de 01209.CNRZ 701), ce qui signifie que l'ADN phagique non intégré ne se trouve pas, dans la cellule, sous forme linéaire. Par contre, l'existence d'ADN phagique circulaire relâché et non intégré ne peut être exclue, puisque la forme circulaire relâchée ne migre ni en électrophorèse conventionnelle, ni en électrophorèse en champ pulsé.

La présence d'ADN phagique intégré reste donc à démontrer.



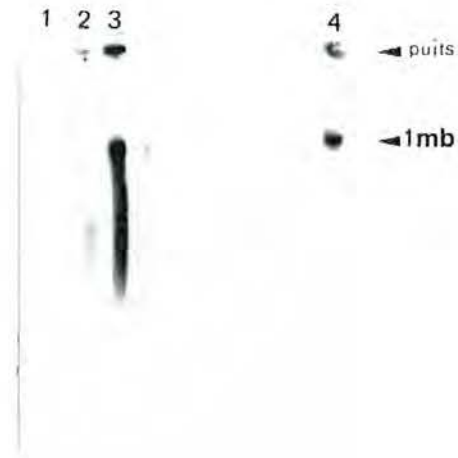
**Figure 22.** Recherche du site d'intégration du phage 01209.CNRZ 701 dans le génome de la souche lysogénisée CNRZ 1690

**a :** Profils de restriction du phage 01209.CNRZ 701 et de la souche CNRZ1690

1 Phage 01209.CNRZ 701	<i>HindIII</i>	9 Ph	<i>NcoI</i>
2 Souche CNRZ 1690		10 S	
3 Ph	<i>EcoRI</i>	11 Ph	<i>PvuI</i>
4 S		12 S	
5 Ph	<i>EcoRV</i>	13 Ph	<i>PvuII</i>
6 S		14 S	
7 Ph	<i>ClaI</i>		
8 S			

**b :** Hybridation avec l'ADN de 01209.CNRZ 701

Les ADN ont été chauffés 10 min à 70°C. L'électrophorèse en gel d'agarose (0,7%) a été réalisée dans du tampon TBE, à 1V/cm pendant 16 h.



**Figure 23.** Hybridation de la membrane d'électrophorèse en champ pulsé, avec l'ADN du phage 1209.CNRZ 701 et du phage  $\lambda$ .

1 CNRZ 312

3 CNRZ 1690

2 01209.CNRZ 701

4 Concatémères *Hind*III du phage  $\lambda$   
(marqueurs de taille)

### **3.3. Etude des propriétés autolytiques des souches lysogènes**

Les propriétés autolytiques des 13 souches lysogènes ont été examinées dans du bouillon M17 à 42°C, selon le protocole défini par Zourari (1991), c'est-à-dire dans un milieu tamponné à teneur en sucre limitée, pour éviter une diminution importante et rapide du pH. Les 13 souches se sont autolysées en fin de croissance. Dans les mêmes conditions opératoires, aucune lyse n'a été observée pour 30 souches non lysogènes de la collection. La lyse est brutale et totale, car aucune culture secondaire ne se développe dans les tubes, même après une nuit d'incubation à 42°C (fig. 24). La treizième souche CNRZ 1690, qui est un clone dérivé de la souche CNRZ 312, après lysogénisation par le phage 01209.CNRZ 701, est également devenue autolytique. Au contraire, après guérison, la souche dérivée CNRZ 1715, qui est analogue à CNRZ 312, ne subit plus d'autolyse. Le même comportement est observé pour la souche guérie CNRZ 1707, un clone non autolytique dérivé de la souche lysogène CNRZ 1205. La présence de phages actifs est mise en évidence dans tous les autolysats. Le nombre de phages présents dans l'autolysat est du même ordre de grandeur que celui que l'on attribue à l'induction spontanée du phage, comme l'indique le tableau 11, pour les phages 01601 et 01690. Ces nombres sont très inférieurs à ceux que l'on obtient quand on soumet la culture à une induction massive avec la MC.

Pour étudier l'autolyse, nous avons essayé d'obtenir et de concentrer l'enzyme lytique présente dans les autolysats de la souche CNRZ 1690 et, à titre comparatif, la lysine du phage 01690. Parallèlement, nous avons cherché à obtenir une banque de l'ADN du phage 01209.CNRZ 701.

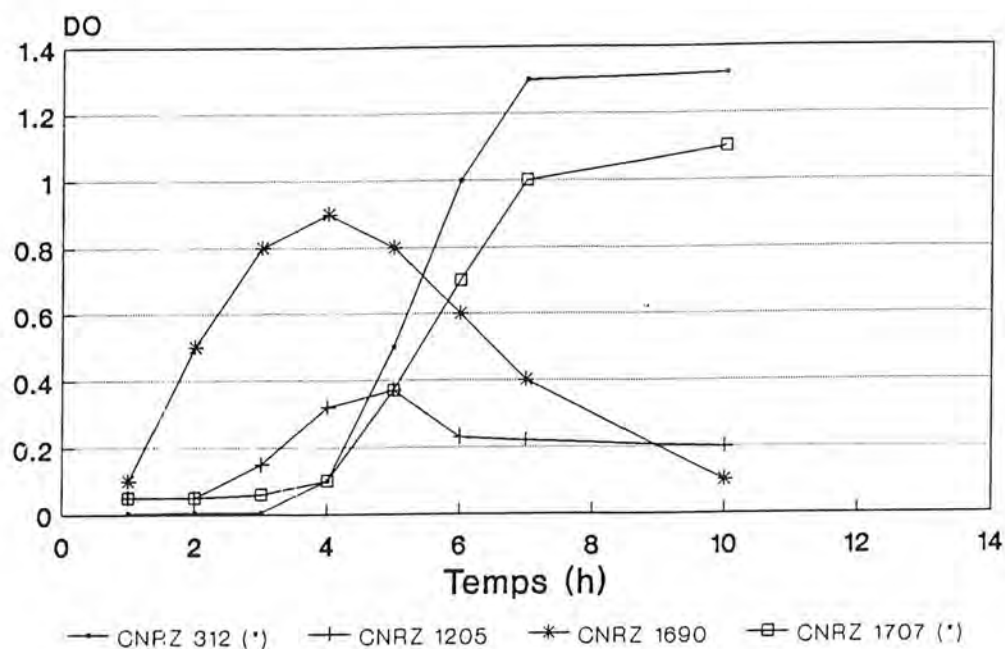
#### **3.3.1. Essais préliminaires de purification de l'autolysine de la souche CNRZ 1690 et de la lysine du phage 01690.**

Pour obtenir et concentrer ces 2 enzymes, nous avons utilisé les conditions de précipitation décrites pour l'autolysine de la souche lysogène CNRZ 1209 (Zourari, 1990). Dans un premier temps, nous avons vérifié que le même mode opératoire permettait également de précipiter la lysine du phage virulent 1151-B7.CNRZ 1151. La souche CNRZ 1151 est une souche non lysogène, et donc non autolytique. Ensuite, l'autolysat et le lysat d'induction de la souche CNRZ 1690 ont été précipités à 50% de saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Une activité lytique des 2 précipités a été mise en évidence sur la souche CNRZ 312 et sur d'autres souches, comme par exemple la souche CNRZ 1151, qui est résistante au phage 01690.



**Figure 24.** Autolyse de 2 souches lysogènes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* dans du bouillon M17, à 42°C

\* souche non lysogène



**Tableau 11.** Titres des phages 01601 et 01690, après induction, autolyse, induction-autolyse et dans les surnageants de cultures des souches CNRZ 1601 et 1690, à 42°C

- Surnageant de culture: M17 contenant 1,5% de lactose.
- Autolyse: M17 contenant 0,5% de lactose.
- Induction: M17 contenant 1,5% de lactose; induction avec 0,2 µg/ml de MC.
- Autolyse-induction: M17 contenant 0,5% de lactose; induction avec 0,2 µg/ml de MC.

Phage	Souche* (N°CNRZ)	Titre du phage (UFP/ml)			
		Conditions de culture			
		surnageant de culture	autolyse	induction	autolyse induction
01690	312*	105	106	109	109
01690	701 (L)	103	103	106	106
01601	1205 (L)	103	104	106	106

\* souche indicatrice utilisée pour dénombrer le phage induit.  
L souche lysogène.

Aucune lyse n'a été détectée pour d'autres espèces de bactéries lactiques thermophiles. L'activité est conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Après électrophorèse des précipités en conditions dénaturantes, les 2 protéines structurales majeures (32 et 27 kDa) du phage 01209.CNRZ 701 sont présentes, mais aucune autre bande, représentative des lysines, n'est visible.

### **3.3.2. Réalisation d'une banque de l'ADN du phage virulent 1151-B7.CNRZ 1151 et de l'ADN du phage tempéré 01209.CNRZ 701**

Plusieurs tentatives de clonage de l'ADN du phage 1151-B7.CNRZ 1151, dans le plasmide pBS, ont été faites en utilisant la bactérie réceptrice *E. coli* TGI. Quatre essais de clonage dans le site unique *Bam*HI de ce vecteur ont été réalisés avec l'ADN total du phage, partiellement digéré par *Sau*3AI. Un très faible nombre de recombinants (2%) a été obtenu, et l'analyse des clones a montré que la taille du fragment inséré était inférieure à 1 kb.

Deux autres essais ont alors été réalisés avec des fragments de 2 à 4 kb, extraits après électrophorèse en gel d'agarose de digestions partielles *Sau*3AI. Des résultats similaires ont été obtenus. Les essais de clonage étant infructueux, nous avons alors pensé que la nature de l'ADN phagique pouvait être responsable de ce faible taux de recombinants. Nous avons donc tenté de cloner un autre ADN phagique, celui du phage tempéré 01209.CNRZ 701. Un taux identique de transformation a été observé, que l'on utilise la digestion partielle de l'ADN total du phage ou des fragments de 2 à 4 kb extraits du gel d'agarose. Les essais de clonage réalisés par ailleurs avec de l'ADN du phage  $\lambda$  nous donnaient un taux de transformation satisfaisant.

## **3.4. Etude de quelques caractéristiques biologiques de 4 phages**

Le travail a porté sur 2 phages tempérés, 01358.CNRZ 1205 et 01601.CNRZ 1205, et sur 2 phages virulents,  $\phi$ 4.CNRZ 888 et  $\phi$ 5.CNRZ 888.

### **3.4.1. Adsorption en fonction du temps des phages tempérés 01358 et 01601 sur la souche CNRZ 1205**

Le pourcentage d'adsorption des 2 phages tempérés a été déterminé sur la souche lysogène CNRZ 1205. Les résultats sont présentés dans la figure 25. Après 5 min de contact, 80% des phages sont adsorbés sur les bactéries. Cette phase d'adsorption rapide est ensuite suivie d'une phase d'adsorption résiduelle, plus lente qui fait que la totalité des phages sont adsorbée, après 45 min.

Au cours de l'étude, nous avons considéré que 15 min de contact entre phages et bactéries étaient suffisantes pour obtenir une adsorption proche du maximum.

### 3.4.2. Rendement unitaire de la lyse cellulaire.

Le rendement unitaire de lyse a été déterminé pour 2 phages tempérés, 01358 et 01601, sur une indicatrice lysogène, la souche CNRZ 1205 et à titre comparatif, pour 2 phages virulents,  $\phi 4$  et  $\phi 5$ , sur une souche non lysogène, CNRZ 888 (fig. 26). Les rendements unitaires sont respectivement de 43 et 42 phages par centre infectieux, pour les phages tempérés 01358.CNRZ 1205 et 01601.CNRZ 1205, et de 94 et 97, pour les phages virulents  $\phi 4$  et  $\phi 5$ .

### 3.4.3. Détermination de la durée du cycle de multiplication.

La durée du cycle de multiplication a été déterminée pour 2 phages tempérés, 01358.CNRZ 1205 et 01601.CNRZ 1205 et pour 2 phages virulents,  $\phi 4$ .CNRZ 888 et  $\phi 5$ .CNRZ 888. Les résultats sont présentés sur la figure 27. Entre 30 et 40 min après l'infection, la densité optique chute brutalement pour les 2 phages virulents. Un résultat similaire est obtenu pour le phage tempéré 01601.CNRZ 1205, après 40 à 50 min. Le phage tempéré 01358.CNRZ 1205 bloque très tôt la multiplication cellulaire, mais son cycle de multiplication est beaucoup moins rapide que celui des 3 autres phages et la chute de DO n'intervient qu'après (50 min).

## 3.5. Spectres d'hôtes des phages

La sensibilité de 116 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* vis-à-vis de 59 des 69 phages (7 tempérés et 52 isolés comme lytiques) a été étudiée dans du bouillon Elliker- $\text{Ca}^{2+}$ . Chaque phage a été produit et enrichi sur sa souche de propagation de routine, choisie au cours du présent travail.

Quarante-et-une souches sont résistantes aux 59 phages (tableau 12), soit 35% des souches examinées, de même que les 3 souches CNRZ 411, 412 et 1402, qui n'appartiennent pas à l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, ainsi que la souche type de *S. salivarius* subsp. *salivarius*, CNRZ 1459. Les 73 souches restantes sont sensibles à un nombre variable de phages, allant de 1 à 47 (tableau 13). Trente-deux souches (27%) ne sont sensibles qu'à un petit nombre de phages (1 à 5 phages, fig. 28), alors que 8 autres souches sont sensibles à plus de 30 phages; 4 d'entre elles sont lysogènes (CNRZ 1200, 1205, 1209 et 1210).

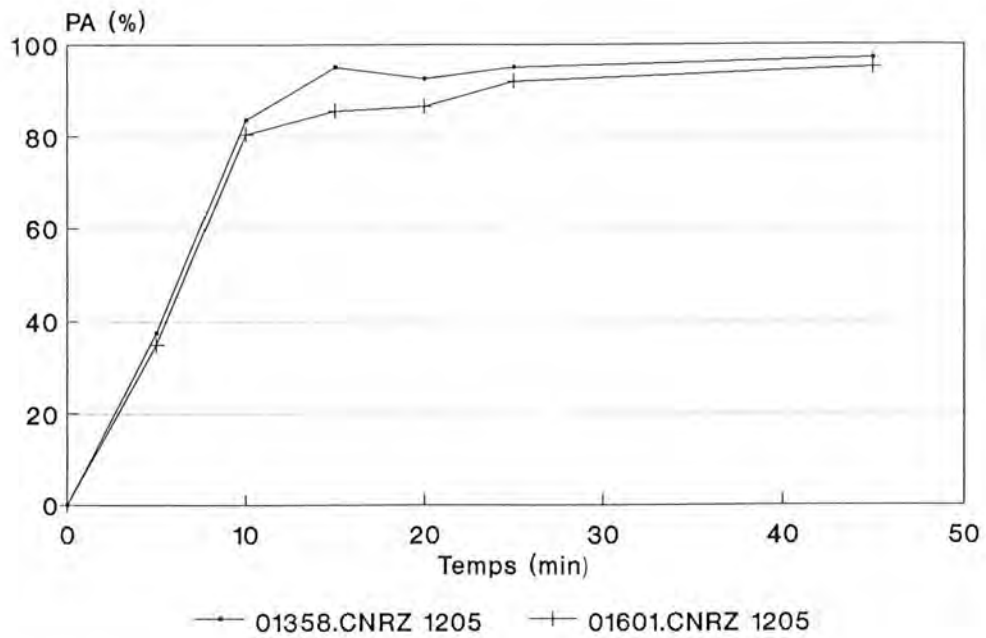


Figure 25. Pourcentage d'adsorption de 2 phages tempérés en fonction du temps

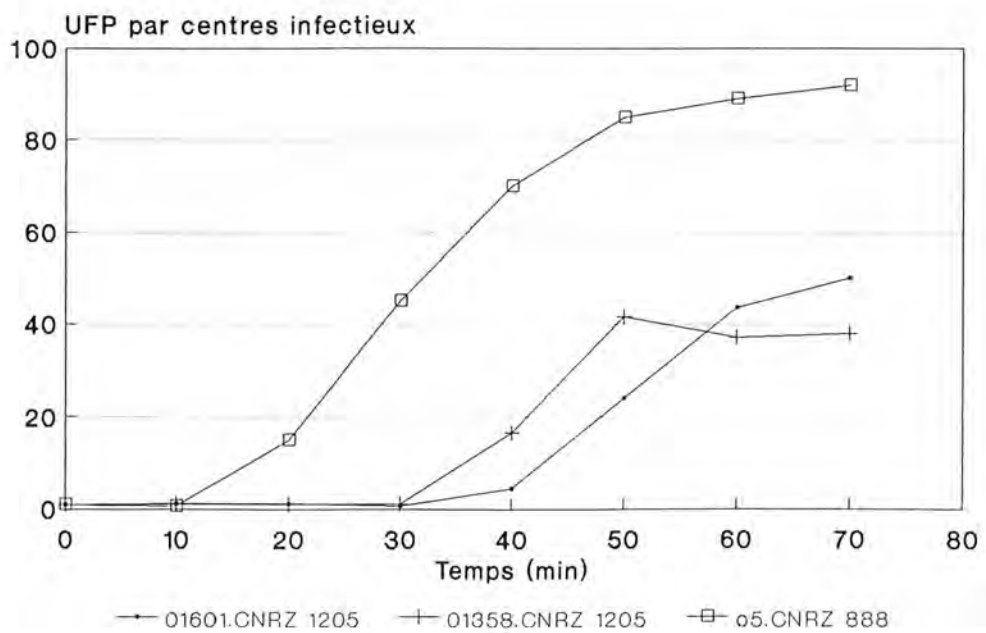
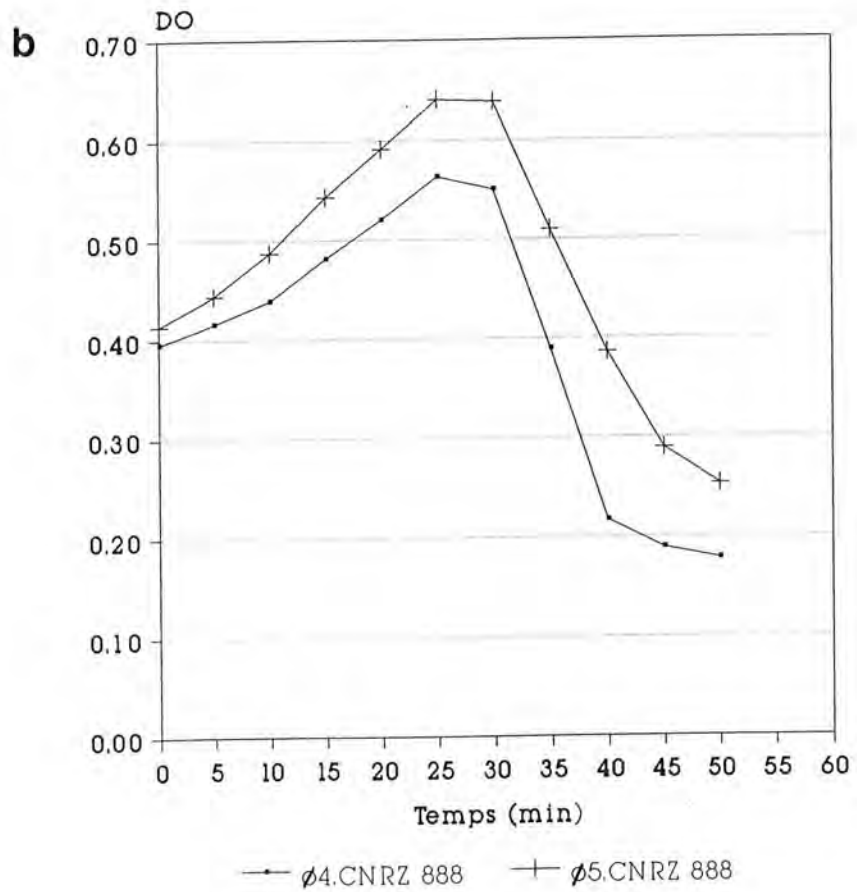
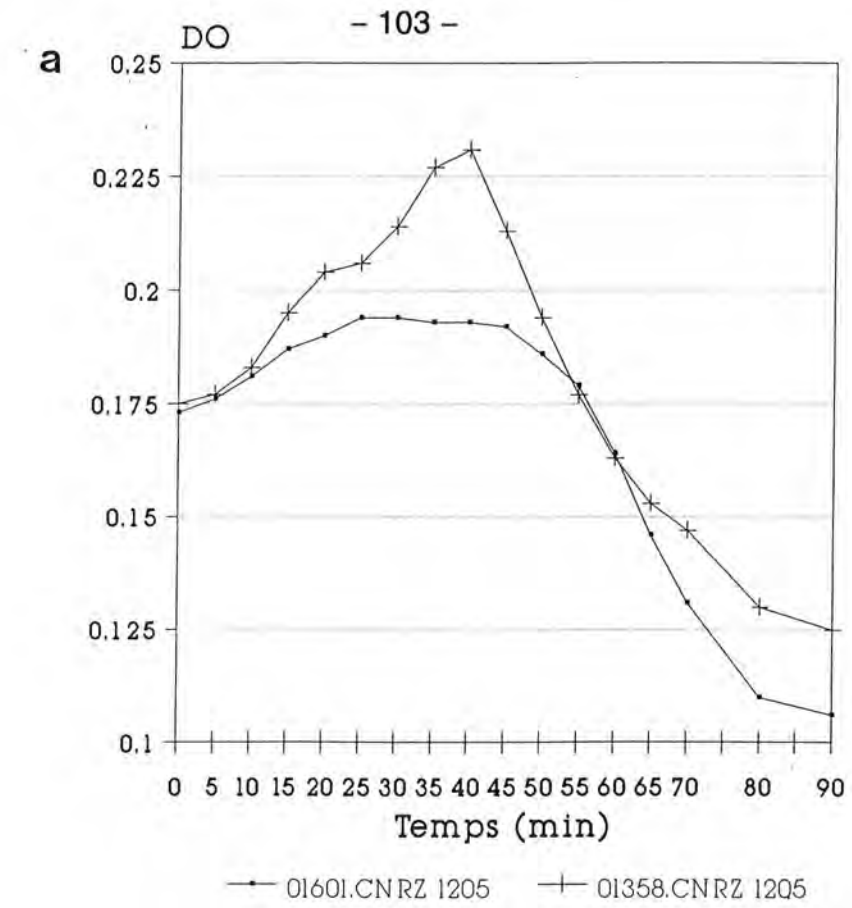


Figure 26. Courbes à cycle unique de multiplication de 2 phages tempérés et d'un phage virulent.





**Figure 27.** Détermination de la durée du cycle de multiplication de 2 phages tempérés (a) et de 2 phages isolés comme lytiques (b).

Chaque phage est actif sur un nombre très variable de souches, allant de 4 à 30 (tableaux 14 et 15). Afin d'analyser l'ensemble des données du spectre d'hôtes et de visualiser les parentés éventuelles, après avoir établi la matrice de similarité à partir des résultats, une représentation graphique a été utilisée, sous forme de 2 dendrogrammes, celui des phages (fig. 29) et celui des souches (fig. 32). Les dendrogrammes sont représentés selon la méthode du lien complet (ou du saut maximal).

### 3.5.1. Dendrogramme des phages

Le dendrogramme des 59 phages (fig. 29) met en évidence 2 groupes bien distincts, GP1 (G pour groupe et P pour phage) et GP2, puisqu'ils se séparent à une distance de 1.

**Le premier groupe, GP1**, est constitué de 44 phages. Tous, à l'exception du phage 71/St15, avaient été propagés sur la souche CNRZ 1205. Le phage 71/St15 (tracé violet, fig. 29), outre sa souche de propagation habituelle, CNRZ 1592, attaque également 8 autres souches, incluant la souche CNRZ 1205. Il fait partie d'un sous-groupe de 36 phages, GP1a, qui regroupe 3 des 5 phages tempérés produits sur la souche CNRZ 1205 et 33 phages isolés comme lytiques, de provenances diverses. Tous ces phages sont actifs sur un nombre variable de souches de diverses origines et aucun d'entre eux ne présente le même spectre d'hôtes. Toutefois, il existe des parentés entre ces différents spectres. Les phages sont, par exemple, tous actifs sur les souches lysogènes CNRZ 1200, 1205, 1209 et 1210, et sur les souches non lysogènes CNRZ 368, 761, 1157 et 1447.

Des observations analogues valent pour le sous-groupe GP1b, qui comprend 8 phages, 2 tempérés et 6 isolés comme lytiques. Ces phages, d'origines diverses, ont chacun un spectre d'hôtes différent de celui des 7 autres. Ils sont également actifs sur 2 souches lysogènes (CNRZ 1200 et 1205) et sur les souches non lysogènes précédemment citées pour GP1a.

**Le deuxième groupe, GP2**, associe les 15 phages qui sont propagés sur une souche de routine différente de la souche CNRZ 1205. Deux de ces phages, 01209 et 01210, sont tempérés, alors que les 13 autres ont été isolés comme lytiques dans différents pays et à différentes époques.

Le dendrogramme permet de définir 5 sous-groupes:

- GP2a (tracé orange, fig. 29), qui comprend les 2 phages BaS19 et BaS265, propagés sur leur souche d'isolement. Ces phages sont actifs sur la souche CNRZ 1205, utilisée ultérieurement pour les purifier et les propager.

- GP2b (tracé vert, fig. 29), qui regroupe les 5 phages virulents multipliés sur la souche CNRZ 1151, incluant c20.
- GP2c (tracé jaune), qui est constitué par les phages tempérés 01209 et 01210, les 2 seuls phages, parmi les 59 étudiés, à posséder des spectres d'hôtes identiques.
- GP2d (tracé bleu), qui contient les 2 phages  $\phi$ 1 et  $\phi$ 2 produits sur la souche CNRZ 887.
- GP2e (tracé rouge), qui rassemble les 3 phages propagés sur la souche CNRZ 447.

Les phages de GP2 sont actifs sur des souches lysogènes différentes de celles qui sont sensibles aux phages de GP1. Ce sont les souches CNRZ 701, 1198, 1598, 1599 et 1601. Les autres souches sensibles peuvent être attaquées par plusieurs phages et certaines d'entre elles sont également lysées par des phages de GP1.

On notera que tous les phages tempérés propagés sur une souche indicatrice, ceux du groupe GP1 comme ceux du groupe GP2, ont un spectre d'hôtes plus large que celui des phages induits (comparer les résultats présentés dans les tableaux 10 et 14).

Le dendrogramme traduit l'existence d'une grande diversité des spectres d'hôtes, puisque 2 phages seulement possèdent le même spectre d'hôtes. Les autres phages se rattachent à des distances variant de 0,2 à 0,8, ce qui interdit pratiquement tout regroupement significatif et, cela, quelle que soit la souche de propagation utilisée. Au vu du dendrogramme, il paraissait possible d'attribuer un effet déterminant de la souche de propagation utilisée, sur la composition du spectre d'hôtes d'un phage donné. Dans le même ordre d'idées, il est apparu que 40% des phages, une fois purifiés et enrichis sur une souche différente de leur souche d'isolement, n'étaient plus capables d'attaquer celle-ci. Pour confirmer ces diverses observations, les spectres d'hôtes de 6 des phages produits sur la souche CNRZ 1205 et celui du phage 01209 ont été comparés à ceux des mêmes phages produits sur une souche indicatrice différente (dans le cas de 01209, le phage correspondant est 01690.CNRZ 312). On a choisi le phage tempéré 01601.CNRZ 1443, 5 phages virulents propagés sur leur souche d'isolement (st2.OR, 447-B11.OR, 1151-B7.OR,  $\phi$ 4.OR et  $\phi$ 5.OR) et le phage 01690.CNRZ 312, qui a été obtenu plus tardivement et qui dérive du phage 01209.CNRZ 701. Deux souches supplémentaires, CNRZ 1690 et 1707, ont été ajoutées aux autres souches testées, pour établir les spectres d'hôtes des (2x7) préparations phagiques.

**Tableau 12.** Quarante-et-une souches CNRZ sont résistantes aux 59 phages éprouvés\*

22, 25, 26, 160, 161, 302, 307, 308, 309, 310, 385, 388, 403, 404, 441, 456, 463, 702, 703, 759, 760, 778, 781, 1005, 1100, 1119, 1120, 1152, 1153, 1154, 1155, 1199, 1202, 1204, 1206, 1211, 1213, 1358 (L), 1359, 1401 et 1446.

(L): souche lysogène.



**Tableau 13.** Spectres phagiques des 75 souches CNRZ trouvées sensibles à un ou plusieurs des 59 phages, éprouvés après multiplication dans leur souche de propagation de routine

Souche	Phages actifs (nombre)	
7	st2, 368-B4, 447-B11, BaS38, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 9	7
27	c20, 1151-B1, 1151-B4, 1151-B10, 1151-ITG, Ba24, BaS215, NCDO-01242	8
312	01209, 01210, c20, 1151-B1, 1151-B4, 1151-ITG, BaS19, BaS24, BaS73	9
366	01599, 368-B8	2
368	0701, 01358, 01599, 01601, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 440-B4, 447-B11, 701-B2, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, 1152-B10, BaL12, BaS19, BaS73, BaS85, BaS102, BaS161, BaS221, $\phi$ 1, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242, tv, 55/15, 71/St15	32
386	BaS221	1
387	b6, 447-B4, 447-B11, BaS265, $\phi$ 1, $\phi$ 2, 55/15, 124/44	8
389	368-B8, Ba24, $\phi$ 1, $\phi$ 2	4
390	0701, 01599, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 447-B11, 701-B8, 1151-B7, BaS19, BaS38, BaS73, BaS102, BaS221, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242	21
391	0701, 01599, sc, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B8, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, BaS38, BaS85, BaS161, BaS215, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 3, $\phi$ 5, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242 tv, 55/15	27
402	c20	1
405	c20, 368-B4, 701-B2, 1151-B1, 1151-ITG, Ba24, $\phi$ 1	7
406	01358, BaS265	2
407	c20	1
408	c20	1

Tableau 13 (suite)

Souche	Phages actifs (nombre)	
409	01599, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 447-B11, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, BaS85, BaS102, BaS161, BaS221, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242, tv, 55/15	27
410	01599, st2, 21-B10, 368-B8, 447-B11, 701-B8, 1151-B7, BaS85, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 11, NCDO-01242	12
439	sf, st2, 21-B10, 368-B8, 440-B4, 447-B11, BaS85, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 11, NCDO-01242	11
440	c20, st2, BaS38, $\phi$ 8, NCDO-01242, tv	6
445	b6, 447-B4, 124/44	3
446	c20	1
447	b6, 447-B4, 71/St15, 124/44	4
455	sf, st2, 21-B10, 368-B8, 440-B4, 447-B11, 1151-B7, BaS85, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242	11
457	368-B8, $\phi$ 4, $\phi$ 5	3
461	01599, st2, 21-B10, 368-B8, 447-B11, 701-B8, 1151-B7, BaS85, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 11, NCDO-01242	12
464	b6, c20, $\phi$ 4, $\phi$ 8, $\phi$ 9	5
701 L	01209, 01210, 01358, c20, 368-B8, 701-B2, 701-B3, 701-B12, 1151-B1, 1151-B4, 1151-ITG, BaS19, BaS19, Ba24, BaS73, BaS221, BaS265, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 8	20
736	c20, st2, 447-B11, 1151-B1, 1151-B4, 1151-ITG, BaS19, BaS24, BaS85, BaS215, $\phi$ 5, $\phi$ 11	12
748	1151-B4	1
756	01599, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 447-B11, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, BaS161, BaS221, $\phi$ 9, $\phi$ 11, 55/15, NCDO-01242	17
757	01599, sf, st2, 21-B10, 368-B8, 447-B11, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, BaS161, BaS221, $\phi$ 9, $\phi$ 11, 55/15, NCDO-01242	16

Tableau 13 (suite)

Souche	Phages actifs (nombre)	
758	0701, 01358, 01598, 01599, 01601, sf, 440-B4, BaS19, BaS38, BaS73, BaS99, BaS102, BaS110, BaS221	14
761	0701, 01598, sc, sch, sf, st2, 21-B10, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, 1205-BAM, BaS38, BaS73, BaS85, BaS99, BaS110, BaS161, BaS215, BaS221, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 3, $\phi$ 4, $\phi$ 5, $\phi$ 8, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242 tv	32
779	c20	1
780	BaS265	1
782	0701, 01358, 01598, 01599, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 440-B4, 447-B11, 701-B2, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1152-B10, BaS19, BaS85, BaS161, BaS215, BaS221, $\phi$ 1, $\phi$ 9, $\phi$ 11, 55/15, NCDO-01242	26
783	01209, 01210, c20, st2, 447-B11, 1151-B1, 1151-B4, 1151-B10, 1151-ITG, BaS19, Ba24, BaS38, BaS73, BaS85, BaS215, BaS265, $\phi$ 8, $\phi$ 11, NCDO-01242	19
784	01209, 01210, c20, st2, 368-B4, 447-B11, 1151-B1, 1151-B4, 1151-B10, 1151-ITG, BaS19, BaS19, Ba24, BaS38, BaS73, BaS85, BaS215, BaS265, $\phi$ 8, $\phi$ 11, NCDO-01242	21
884	c20, 1151-ITG, $\phi$ 8, tv	4
885	b6, 447-B4	2
886	BaS19	1
887	01598, 01599, sf, st2, 21-B10, 368-B8, 440-B4, 447-B11, 701-B8, 1151-B7, BaS73, BaS85, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 5, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242	18
888	01598, sc, sch, sf, 440-B4, 440-B8, 447-B4, 447-B11, BaS85, BaS215, $\phi$ 4, tv, 71/St15	13
889	BaS19	1
1066	b6, c20, st2, 447-B4, $\phi$ 8, 71/St15, 124/44	7
1068	01209, 01210, 01599, c20, st2, Ba24, BaS221, $\phi$ 8	8



Tableau 13 (suite)

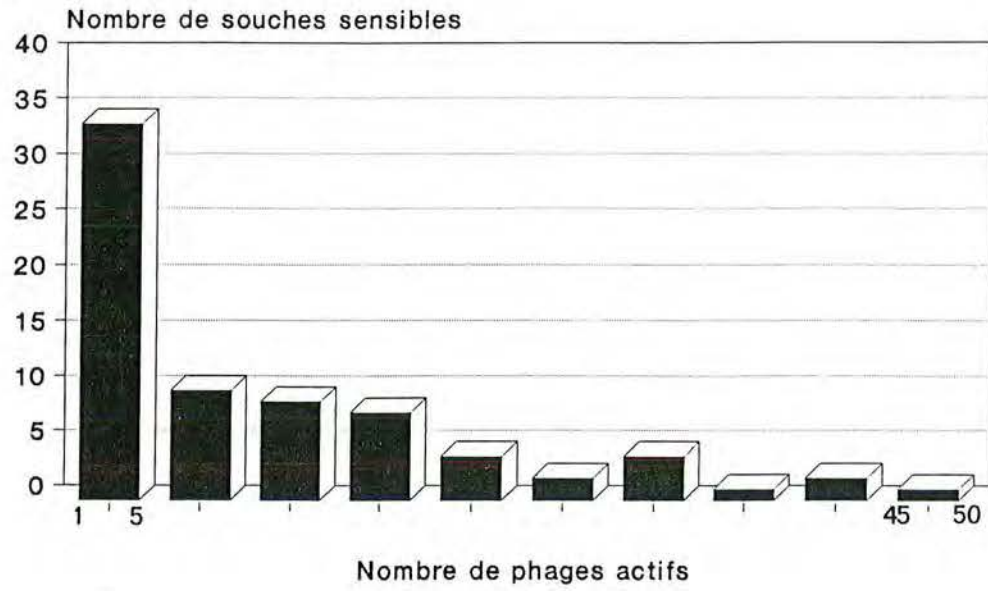
Souche	Phages actifs (nombre)	
1151	c20, sf, 368-B4, 368-B8, 701-B2, 701-B3, 701-B8, 701-B12, 1151-B1, 1151-B4, 1151-B10, 1151-ITG, Ba24, BaS215, NCDO-01242	15
1156	b6, c20, 447-B4, 124/44	4
1157	0701, 01358, 01598, 01599, 01601, sc, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, 1205-BAM, BaS19, BaS85, BaS99, BaS110, BaS161, BaS215, BaS221, $\phi$ 3, $\phi$ 4, $\phi$ 5, $\phi$ 8, $\phi$ 11, NCDO-01242, tv, 55/15	35
1197	01209, 01210, b6, $\phi$ 8, 124/44	5
1198 L	01598, 01601, b6, 447-B4, 1151-B3, 124/44	6
1200 L	0701, 01358, 01598, 01599, 01601, sc, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B3, 701-B8, 701-B12, 1151-B3, 1151-B7, 1205-BAM, BaL12, BaS19, BaS19, Ba24, BaS38, BaS73, BaS85, BaS99, BaS102, BaS110, BaS161, BaS215, BaS221, BaS265, $\phi$ 3, $\phi$ 4, $\phi$ 5, $\phi$ 8, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242, tv, 55/15, 71/St15	45
1201	447-B4	1
1203	st2, $\phi$ 8	2
1205 L	0701, 01358, 01598, 01599, 01601, sc, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B2, 701-B3, 701-B8, 701-B12, 1151-B3, 1151-B7, 1152-B10, 1205-BAM, BaL12, BaS19, BaS19, BaS38, BaS73, BaS85, BaS99, BaS102, BaS110, BaS161, BaS215, BaS221, BaS265, $\phi$ 3, $\phi$ 4, $\phi$ 5, $\phi$ 8, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242, tv, 55/15, 71/St15, 124/44	47
1207	b6, $\phi$ 8	2
1208	01209, 01210, b6, c20, 447-B4, 1151-B1, 1151-B4, 1151-B10, 1151-ITG, BaS19, BaS19, Ba24, BaS38, BaS73, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 8, 124/44	18
1209 L	0701, 01598, 01599, sc, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B8, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, 1205-BAM, BaS19, BaS19, BaS38, BaS85, BaS99, BaS110, BaS161, BaS215, BaS221, $\phi$ 4, $\phi$ 5, $\phi$ 8, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242, tv, 55/15, 71/St15	35



Tableau 13 (fin)

Souche	Phages actifs (nombre)	
1210 L	0701, 01598, 01599, sc, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B8, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, 1205-BAM, BaL12, BaS19, BaI19, BaS38, BaS73, BaS85, BaS99, BaS110, BaS161, BaS215, BaS221, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 4, $\phi$ 5, $\phi$ 8, $\phi$ 11, NCDO-01242, tv, 55/15	37
1212	sf, 440-B4	2
1237	BaL12, BaS38, BaS73, BaS221	4
1400	01598, 447-B4	2
1443	01601, 447-B4	2
1447	0701, 01358, 01598, 01599, 01601, sc, sch, sf, st2, 21-B10, 368-B4, 368-B8, 440-B4, 440-B8, 447-B11, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, 1151-B7, 1205-BAM, BaL12, BaI19, BaS38, BaS73, BaS85, BaS99, BaS110, BaS161, BaS215, BaS221, $\phi$ 1, $\phi$ 2, $\phi$ 3, $\phi$ 4, $\phi$ 5, $\phi$ 8, $\phi$ 9, $\phi$ 11, NCDO-01242, tv, 55/15, 71/St15	42
1492	$\phi$ 1, $\phi$ 2	2
1524	01209, 01210	2
1529 L	01599, BaS19, BaS265, $\phi$ 1	4
1530 L	01601, b6, BaS19, BaS265, $\phi$ 1, $\phi$ 2	6
1575	BaS19, BaI19, $\phi$ 1	3
1589	BaS265	1
1592	0701, 01598, sc, sch, sf, st2, 440-B4, 440-B8, 447-B4, 1151-B3, BaS85, BaS99, BaS215, BaS221, $\phi$ 5, $\phi$ 9, $\phi$ 11, tv, 71/St15	19
1598 L	01209, 01210, 01358, b6, sf, 701-B2, 701-B3, 1205-BAM, BaS19, BaS161, BaS221, BaS265, $\phi$ 1	13
1599 L	01209, 01210, 01358, 01598, b6, c20, sf, st2, 447-B4, 701-B2, 701-B3, 1151-B7, 1152-B10, BaI19, BaS73, BaS85, BaS161, BaS221, BaS265, $\phi$ 1, $\phi$ 8, tv,	22
1600	01598, 01601, 1151-B7	3
1601 L	01209, 01210, 01358, 01598, b6, c20, sc, sf, st1, 440-B4, 447-B4, 701-B2, 701-B3, 701-B8, 1151-B3, BaS19, BaI19, BaS161, BaS215, BaS221, BaS265, $\phi$ 1, $\phi$ 8, 55/15	24

Les souches lysogènes sont repérées par la lettre L.



**Figure 28.** Histogramme de la sensibilité phagique des 75 souches CNRZ

**Tableau 14** : Spectres des hôtes CNRZ de 7 phages tempérés, multipliés dans leur souche de propagation de routine

Phage Souche* (N°CNRZ)	Souches CNRZ sensibles (nombre)	
0701 1205	368, 390, 391, 758, 761, 782, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592	13
01209 701	312, 701, 783, 784, 1068, 1197, 1208, 1524, 1598, 1599, 1601	11
01210 701	312, 701, 783, 784, 1068, 1197, 1208, 1524, 1598, 1599, 1601	11
01358 1205	368, 406, 701, 758, 782, 1157, 1200, 1205, 1447, 1598, 1599, 1601	12
01598 1205	758, 761, 782, 887, 1157, 1198, 1200, 1205, 1209, 1210, 1400, 1447, 1592, 1599, 1600, 1601	17
01599 1205	366, 368, 390, 391, 409, 410, 461, 756, 757, 758, 782, 887, 1068, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1529	20
01601 1205	368, 758, 1157, 1198, 1200, 1205, 1443, 1447, 1530, 1600	10

\* Souche de propagation de routine

**Tableau 15.** Spectres des hôtes CNRZ de 52 phages, isolés comme lytiques et multipliés dans leur souche de propagation de routine

Phage Souche* (N° CNRZ)	Souches CNRZ sensibles (nombre)	
b6 1151	387, 445, 447, 464, 885, 1066, 1151, 1156, 1197, 1198, 1207, 1208, 1530, 1598, 1599, 1601	16
c20 1151	27, 312, 402, 405, 407, 408, 440, 446, 464, 701, 736, 779, 783, 784, 884, 1066, 1068, 1151, 1156, 1208, 1599, 1601	22
sc 1205	391, 761, 888, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592, 1601	11
sch 1205	368, 390, 391, 761, 888, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592	12
sf 1205	368, 390, 391, 409, 439, 455, 756, 757, 758, 761, 782, 887, 888, 1151, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1212, 1447, 1592, 1598, 1599, 1601	25
st2 1205	7, 368, 390, 391, 409, 410, 439, 440, 455, 461, 736, 756, 757, 761, 782, 783, 784, 887, 1066, 1068, 1157, 1200, 1203, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592, 1599, 1601	30
21-B10 1205	368, 390, 391, 409, 410, 439, 455, 461, 756, 757, 761, 782, 887, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447	19
368-B4 1205	7, 368, 390, 405, 409, 756, 782, 784, 1151, 1157, 1200, 1205, 1147	13
368-B8 1205	366, 368, 389, 390, 391, 409, 410, 439, 455, 457, 461, 701, 756, 757, 782, 887, 1151, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447	23
440-B4 1205	368, 391, 439, 455, 758, 761, 782, 887, 888, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1212, 1447, 1592, 1601	18
440-B8 1205	391, 761, 888, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592	10
447-B4 447	387, 445, 447, 885, 888, 1066, 1156, 1198, 1201, 1208, 1400, 1443, 1592, 1599, 1601	15
447-B11 1205	7, 368, 387, 390, 391, 409, 410, 439, 455, 461, 736, 756, 757, 761, 782, 783, 784, 887, 888, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447	25



**Tableau 15** (suite)

Phage Souche* (N°CNRZ)	Souches CNRZ sensibles (nombre)	
701-B2 1205	368, 405, 701, 782, 1151, 1205, 1598, 1599, 1601	9
701-B3 1205	368, 409, 701, 756, 757, 782, 1151, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1598, 1599, 1601	16
701-B8 1205	368, 390, 391, 409, 410, 461, 756, 757, 761, 782, 887, 1151, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1601	19
701-B12 1205	701, 1151, 1200, 1205	4
1151-B1 1151	27, 312, 405, 701, 736, 783, 784, 1151, 1208	9
1151-B3 1205	368, 391, 409, 756, 757, 761, 782, 1157, 1198, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592, 1601	16
1151-B4 1151	27, 312, 701, 736, 748, 783, 784, 1151, 1208	9
1151-B7 1205	368, 390, 391, 409, 410, 455, 461, 756, 757, 761, 887, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1599, 1600	19
1151-B10 1151	27, 783, 784, 1151, 1208	5
1151-ITG 1151	27, 312, 405, 701, 736, 783, 784, 884, 1151, 1208	10
1152-B10 1205	368, 782, 1205, 1599	4
1205-BAM 1205	761, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1598	8
BaL12 1205	368, 1200, 1205, 1210, 1237, 1447	6
BaS19 1575	312, 701, 736, 783, 784, 886, 889, 1200, 1205, 1208, 1209, 1210, 1529, 1530, 1575, 1598, 1601	17
BaIS19 1205	368, 390, 701, 758, 782, 784, 1157, 1200, 1205, 1208, 1209, 1210, 1447, 1575, 1599, 1601	16

Tableau 15 (suite)

Phage Souche* (N°CNRZ)	Souches CNRZ sensibles (nombre)	
Ba24 1151	27, 312, 389, 405, 701, 736, 783, 784, 1068, 1151, 1200, 1208	12
BaS38 1205	7, 390, 391, 440, 758, 761, 783, 784, 1200, 1205, 1208, 1209, 1210, 1237, 1447	15
BaS73 1205	312, 368, 390, 701, 758, 761, 783, 784, 887, 1200, 1205, 1208, 1210, 1237, 1447, 1599	16
BaS85 1205	368, 391, 409, 410, 439, 455, 461, 736, 761, 782, 783, 784, 887, 888, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592, 1599	22
BaS99 1205	758, 761, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592	9
BaS102 1205	368, 390, 409, 758, 1200, 1205	6
BaS110 1205	758, 761, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447	8
BaS161 1205	368, 391, 409, 756, 757, 761, 782, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1598, 1599, 1601	16
BaS215 1205	27, 391, 736, 761, 782, 783, 784, 888, 1151, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592, 1601	17
BaS221 1205	368, 386, 390, 409, 701, 756, 757, 758, 761, 782, 1068, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1237, 1447, 1592, 1598, 1599, 1601	22
BaS265 1598	387, 406, 701, 780, 783, 784, 1200, 1205, 1529, 1530, 1589, 1598, 1599, 1601	14
φ1 887	7, 368, 387, 389, 390, 391, 405, 410, 439, 461, 701, 761, 782, 887, 1208, 1210, 1447, 1492, 1529, 1530, 1575, 1598, 1599, 1601	24
φ2 887	7, 387, 389, 390, 391, 410, 439, 461, 701, 761, 887, 1208, 1210, 1447, 1492, 1530	16
φ3 1205	391, 761, 1157, 1200, 1205, 1447	6

Tableau 15 (fin)

Phage Souche* (N° CNRZ)	Souches CNRZ sensibles (nombre)	
φ4 1205	457, 464, 761, 888, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447	10
φ5 1205	391, 457, 736, 761, 887, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592	12
φ8 1205	440, 464, 701, 761, 783, 784, 884, 1066, 1068, 1157, 1197, 1200, 1203, 1205, 1207, 1208, 1209, 1210, 1447, 1599, 1601	21
φ9 1205	7, 368, 390, 391, 409, 455, 464, 756, 757, 761, 782, 887, 1200, 1205, 1209, 1447, 1592	17
φ11 1205	368, 390, 391, 409, 410, 439, 455, 461, 736, 756, 757, 761, 782, 783, 784, 887, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592	23
NCDO-01242 1205	27, 368, 390, 391, 409, 410, 439, 440, 455, 461, 756, 757, 761, 782, 783, 784, 887, 1151, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447	24
tv 1205	368, 391, 409, 440, 761, 884, 888, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1592, 1599	15
55/15 1205	368, 387, 391, 409, 756, 757, 782, 1157, 1200, 1205, 1209, 1210, 1447, 1601	14
71/St15 1592	368, 447, 888, 1066, 1200, 1205, 1209, 1447, 1592	9
124/44 1151	387, 445, 447, 1066, 1151, 1156, 1197, 1198, 1205, 1208	10

\* Souche de propagation de routine.

# Echelle de distance

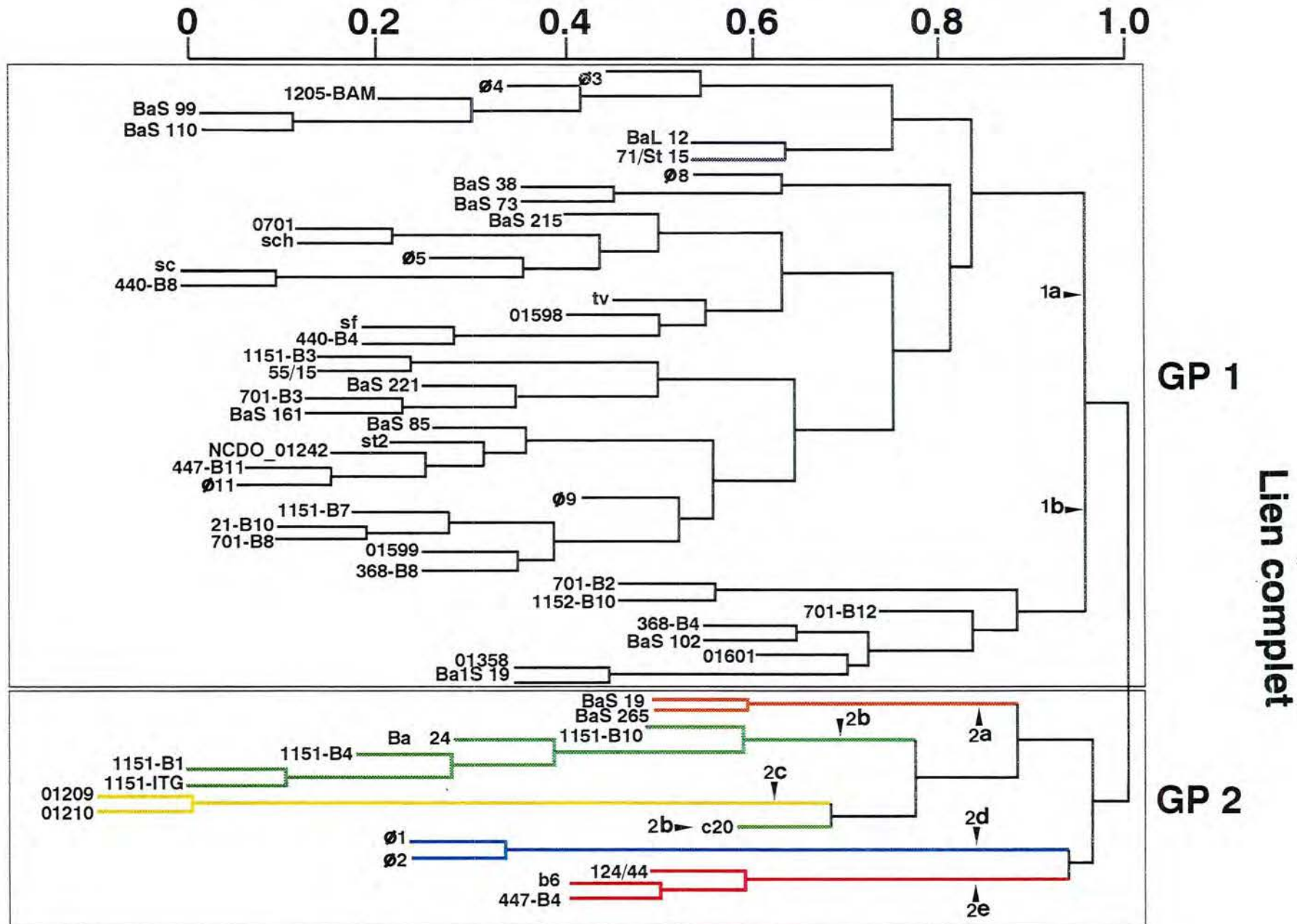


Figure 29. Dendrogramme de la lysotypie des 59 phages éprouvés sur 116 souches CNRZ



Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 16, 17 et 18, et le dendrogramme correspondant est présenté dans la figure 30. Le spectre d'hôtes de chaque phage se trouve profondément modifié, si l'on change la souche de propagation du phage. Par exemple, le phage st2 est très actif lorsqu'il a été propagé sur la souche CNRZ 1205 (30 souches attaquées sur 116) et le demeure lorsqu'il est propagé sur la souche CNRZ 440 (26 souches attaquées sur 118), mais 9 souches seulement sont communes aux 2 spectres (tableaux 13 et 17). Les souches lysogènes restent de bonnes indicatrices dans les 2 cas, à l'exception des souches CNRZ 1598, 1599 et 1601. La souche CNRZ 1707, un clone dérivé de CNRZ 1205 qui est guéri du prophage 01205, est également une bonne souche indicatrice. La souche lysogénisée CNRZ 1690 est, quant à elle, résistante aux 14 phages, à la différence de la souche non lysogène dont elle dérive, CNRZ 312, qui est sensible à 4 des 14 phages (tableau 17).

Soixante-quatorze souches (63%) sont totalement résistantes aux 7 phages étudiés, lorsqu'ils sont produits sur leur souche d'isolement (tableau 18). Il faut remarquer que 3 souches, CNRZ 308, 404 et 441, qui avaient été trouvées résistantes lors de la réalisation des premiers spectres d'hôtes, sont sensibles à 1 ou 2 phages produits sur leur souche d'isolement. L'intégration de ces nouveaux résultats, à l'exception de ceux concernant les souches CNRZ 1690 et 1707, dans la matrice des spectres d'hôtes des phages, permet d'obtenir un dendrogramme des phages qui est modifié comme le montre la figure 31:

- GP1 est retrouvé pratiquement intact, 3 phages seulement (BaS38, BaS73 et  $\phi$ 8) se trouvant reclassés dans le groupe GP2. Ces 3 phages, bien que propagés sur la souche CNRZ 1205, ont des spectres d'hôtes plus apparentés à ceux de  $\phi$ 4 et  $\phi$ 5 propagés sur la souche CNRZ 888, qu'à ceux des autres phages propagés sur la souche CNRZ 1205.
- Le phage 01601.CNRZ 1443 est très éloigné de 01601.CNRZ 1205 et forme à lui seul un nouveau sous-groupe, GP1c.
- GP2, malgré un réarrangement consécutif à l'introduction des phages ".OR", conserve les 5 sous-groupes précédemment décrits. Les phages qui sont propagés sur une souche "OR" caractéristique de l'un des sous-groupes, s'intercalent dans l'embranchement défini par celle-ci. Ainsi 1151-B7.OR se relie à GP2b (souche de propagation, CNRZ 1151, tracé vert) et 447-B11.OR à GP2c (souche de propagation, CNRZ 447, tracé rouge). Le spectre d'hôtes du phage 01690.CNRZ 312 est apparenté de façon lâche à ceux des phages de GP2b. De la même façon,  $\phi$ 4.OR et  $\phi$ 5.OR se rattachent à GP2d, qui contient les 2 phages  $\phi$ 1 et  $\phi$ 2 multipliés sur CNRZ 887 (tracé bleu). C'est à ce sous-groupe que se rattachent également les 3 phages BaS38, BaS73 et  $\phi$ 8, qui se

trouvaient précédemment placés dans GP1. Enfin, on trouve le nouveau sous-groupe GP2f, constitué par st2.OR, auquel se relie le phage c20.

#### ◆ Conclusion

Les 59 phages examinés, qu'ils soient tempérés ou virulents, se caractérisent par une grande diversité de leurs spectres d'hôtes et cela interdit tout regroupement significatif. Les souches de propagation des phages, notamment les indicatrices lysogènes, exercent un effet prépondérant sur les spectres d'hôtes.

#### **3.5.2. Echantillon le plus représentatif des phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* propagés dans leur souche de routine**

L'analyse des résultats a également conduit à choisir les 6 phages les plus représentatifs, qui permettent de détecter environ 90% des souches sensibles. Ces phages sont indiqués dans le tableau 19. Quatre d'entre-eux, c20, st2, 447-B4 et  $\phi$ 1, attaquent en effet 84% des souches sensibles examinées (le phage st2, à lui seul, est actif sur 30 des 116 souches examinées) et, avec les 2 phages complémentaires, BaS19 et BaS265, le pourcentage des souches sensibles détectées atteint 90%. Cet échantillon de 6 phages est maintenant utilisé sous forme de kit, pour obtenir une première indication sur la sensibilité phagique des souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* nouvellement isolées.

#### **3.5.3. Dendrogramme des souches sensibles aux 59 phages**

Les résultats de l'étude de la sensibilité phagique des 75 souches CNRZ sensibles à un ou plusieurs des 59 phages utilisés, sont présentés dans le tableau 13 et, sous forme de dendrogramme, dans la figure 32.

**Tableau 16.** Soixante-quatorze souches CNRZ sont résistantes au phage 01690 et aux 6 phages produits dans une souche différente de la souche de propagation de routine\*

7, 22, 25, 26, 160, 161, 302, 307, 309, 310, 366, 368, 385, 386, 387, 388, 389, 390,  
402, 403, 407, 408, 409, 410, 446, 455, 456, 457, 461, 463, 702, 703, 756, 758, 759,  
760, 761, 778, 780, 781, 782, 885, 1005, 1100, 1119, 1120, 1152, 1153, 1154, 1155,  
1157, 1197, 1199, 1201, 1202, 1203, 1204, 1206, 1207, 1211, 1212, 1213, 1358 (L),  
1359, 1401, 1446, 1447, 1492, 1524, 1575, 1598 (L), 1599 (L), 1601 (L), 1690 (L)\*\*

\* Il s'agit des phages st2, 447-B11, 1151-B7,  $\phi$ 4 et  $\phi$ 5, produits dans leur souche d'isolement, et des phages 01601.CNRZ 1443 et 01690.CNRZ 312. Le tableau 14 indique les spectres phagiques obtenus lorsque les 6 phages sont multipliés dans leur souche de propagation de routine.

\*\* La souche CNRZ 1690 est également résistante aux 7 phages correspondants, qui ont été multipliés sur leur souche de propagation utilisée en routine, au cours du présent travail.

(L): souche lysogène.

**Tableau 17.** Spectres phagiques des 44 souches CNRZ trouvées sensibles à un ou plusieurs des 6 phages produits dans une souche différente de la souche de propagation de routine\* et au phage 01690

Souche	Phages actifs (nombre)
27	st2.OR, 1151-B7.OR 2
308	447-B11.OR 1
312	01690, st2.OR, 1151-B7.OR, $\phi$ 5.OR 4
391	st2.OR 1
404	st2.OR, $\phi$ 5.OR 2
405	01601.CNRZ 1443 1
406	st2.OR 1
439	st2.OR 1
440	st2.OR 1
441	st2.OR 1
445	447-B11.OR 1
447	447-B11.OR 1
464	st2.OR 1
701 L	01690, st2.OR, 1151-B7.OR, $\phi$ 4.OR 4
736	st2.OR, 1151-B7.OR 2
748	01601.CNRZ 1443, 01690, st2.OR, $\phi$ 4.OR, $\phi$ 5.OR 5
757	01601.CNRZ 1443 1
779	st2.OR 1
783	01690, st2.OR, 1151-B7.OR, $\phi$ 5.OR 4
784	st2.OR, 447-B11.OR, 1151-B7.OR, $\phi$ 4.OR, $\phi$ 5.OR 5
884	st2.OR 1
886	st2.OR 1
887	01601.CNRZ 1443, $\phi$ 4.OR, $\phi$ 5.OR 3
888	$\phi$ 4.OR, $\phi$ 5.OR 2
889	st2.OR 1



**Tableau 17** (suite)

Souche	Phages actifs (nombre)	
1066	st2.OR	1
1068	st2.OR	1
1151	1151-B7.OR	1
1156	447-B11.OR	1
1198 L	01690, st2.OR, 447-B11.OR, 1151-B7.OR, φ4.OR, φ5.OR	6
1200 L	01601.CNRZ 1443, st2.OR, 447-B11.OR, φ4.OR φ5.OR	5
1205 L	01601.CNRZ 1443, st2.OR, 1151-B7.OR, φ4.OR φ5.OR	5
1208	01690, st2.OR, 447-B11.OR, 1151-B7.OR	4
1209 L	φ4.OR, φ5.OR	2
1210 L	1151-B7.OR, φ4.OR, φ5.OR	3
1237	01601.CNRZ 1443, st2.OR	2
1400	01601.CNRZ 1443	1
1443	01601.CNRZ 1443, 447-B11.OR	2
1529 L	01601.CNRZ 1443, φ5.OR	2
1530 L	φ4.OR, φ5.OR	2
1589	st2.OR	1
1592	φ4.OR, φ5.OR	2
1600	01601.CNRZ 1443	1
1707 **	01601.CNRZ 1443, 01690, st2.OR, φ4.OR, φ5.OR	5
	- - - - - 01209, 01601, st2, 447-B11, 1151-B7, φ4, φ5	7

\* Les phages st2, 447-B11, 1151-B7, φ4 et φ5 ont été produits dans leur souche d'isolement (indiquée ".OR") et le phage 01601, dans une souche différente de celle utilisée pour la production de routine, la souche non lysogène CNRZ 1443. Le tableau 14 indique les spectres phagiques correspondants, obtenus lorsque les 6 phages sont multipliés dans leur souche de propagation de routine.

\*\* Pour la souche CNRZ 1707 (un clone dérivé de CNRZ 1205, qui est guéri du prophage 01205), le spectre phagique obtenu avec les 6 phages multipliés dans leur souche de propagation de routine est également indiqué.

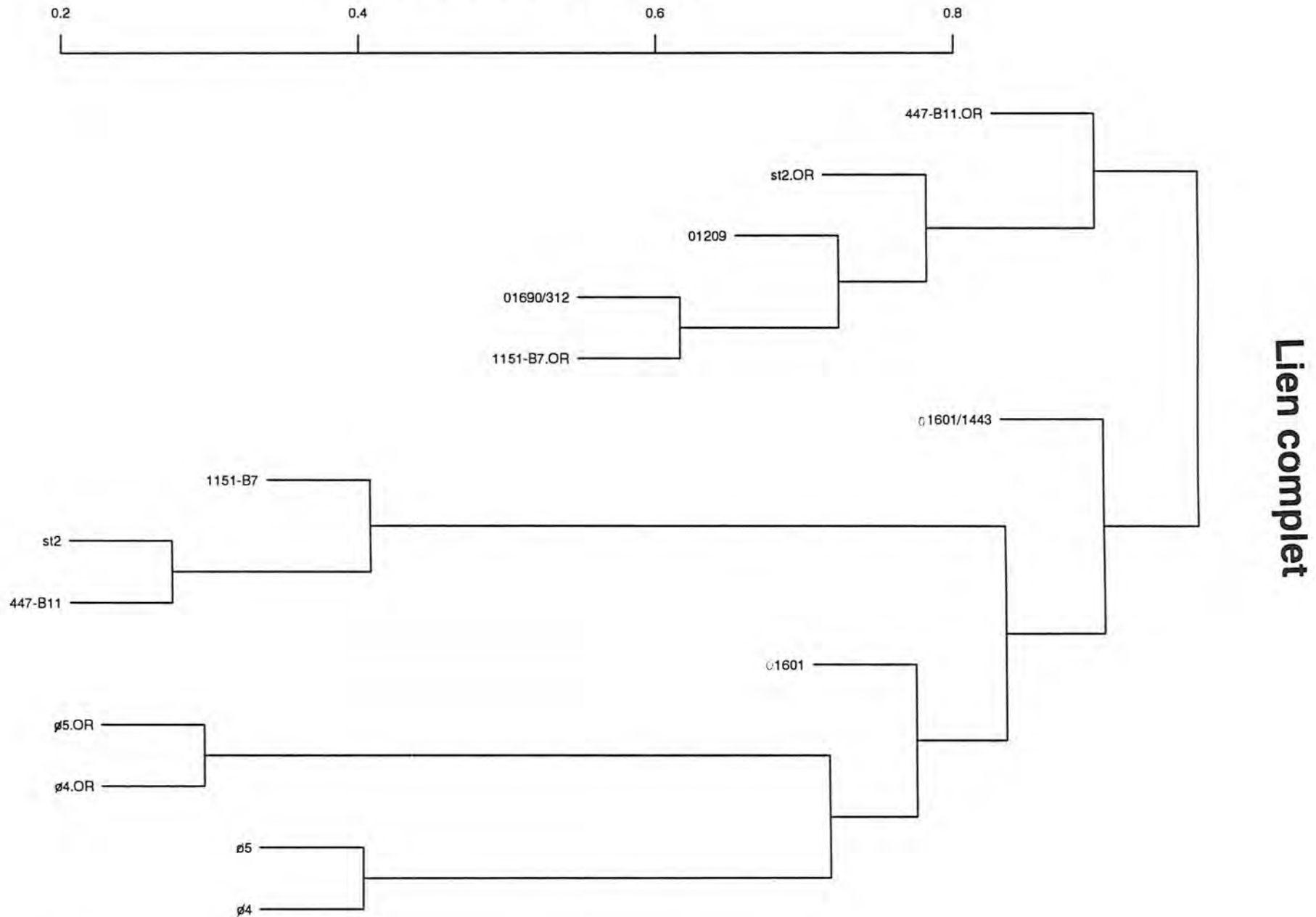
Les souches lysogènes sont repérées par la lettre L.

**Tableau 18.** Spectres des hôtes CNRZ des 6 phages produits dans une souche différente de la souche de propagation de routine\* et du phage 01690

Phages Souches* N° CNRZ	Souches CNRZ sensibles (nombre)	
01601 1443	405, 748, 757, 887, 1200, 1205, 1237, 1400, 1443, 1529, 1600, 1707	12
01690 312	312, 701, 748, 783, 1198, 1208, 1707	7
st2.OR 440	27, 312, 391, 404, 406, 439, 440, 441, 464, 701, 736, 779, 783, 784, 884, 886, 889, 1066 1068, 1198, 1200, 1205, 1208, 1237, 1589,	26
447-B11.OR 447	308, 445, 447, 784, 1156, 1198, 1200, 1208, 1443	9
1151-B7.OR 1151	27, 312, 701, 736, 783, 784, 1151, 1198, 1205, 1208, 1210	11
φ4.OR 888	701, 748, 784, 887, 888, 1198, 1200, 1205, 1209, 1210, 1530, 1592, 1707	13
φ5.OR 888	312, 404, 748, 783, 784, 887, 888, 1198, 1200, 1205, 1209, 1210, 1529, 1530, 1592, 1707	16

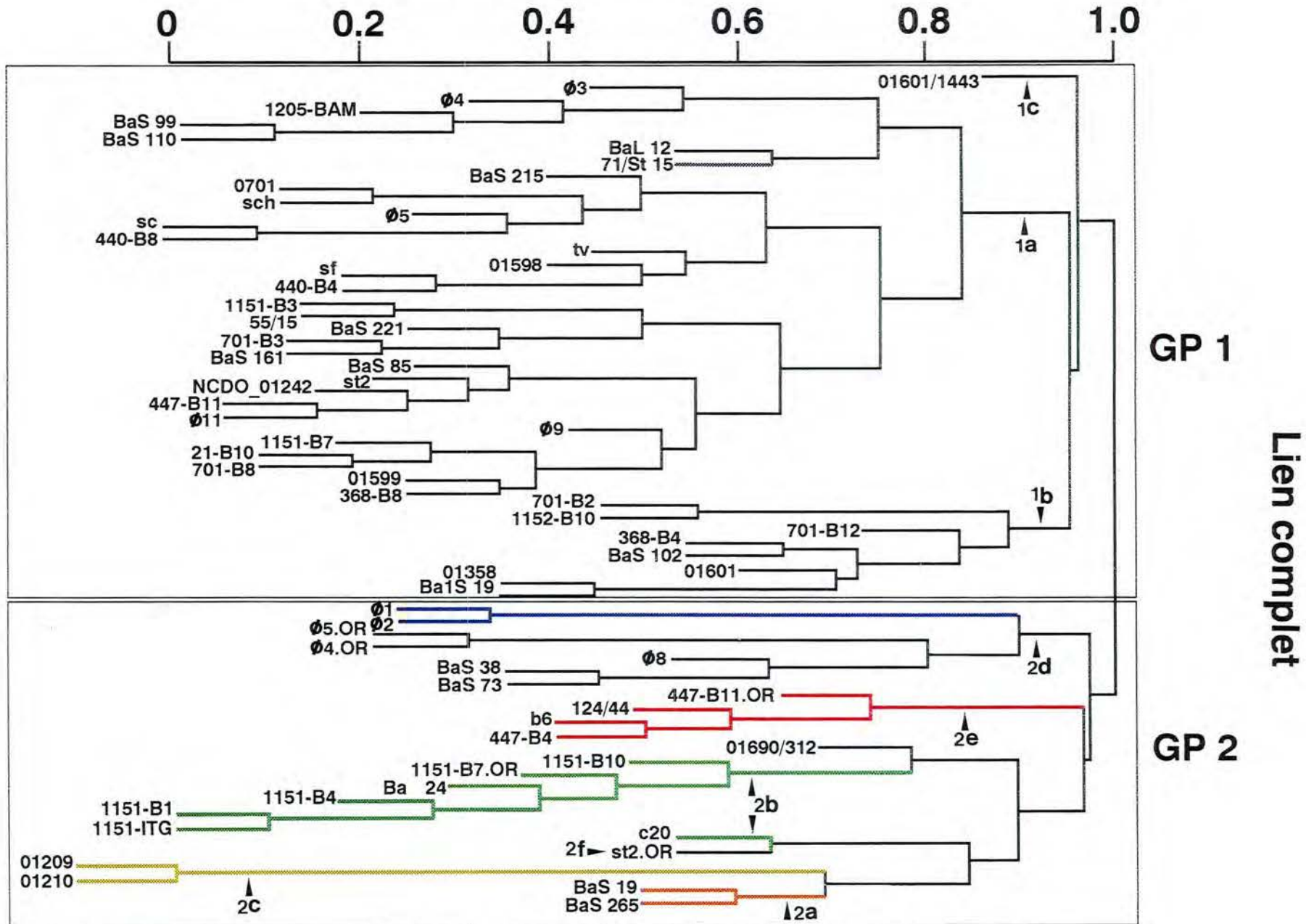
\* Lorsqu'il s'agit de la souche d'isolement du phage, le code ".OR" suit la dénomination du phage. Les tableaux 14 et 15 donnent les spectres des hôtes des 6 phages, lorsqu'ils ont été multipliés dans leur souche de propagation de routine.

# Echelle de distance



**Figure 30.** Dendrogramme du phage 01690 et des 6 phages produits, chacun, sur 2 souches différentes, lorsqu'ils sont lysotypés avec 118 souches CNRZ

# Echelle de distance



**Figure 31.** Dendrogramme modifié des phages, incluant le phage 01690 et les 6 phages propagés sur une souche différente de celle employée pour la production de routine



**Tableau 19.** Phages constitutifs de l'échantillon le plus représentatif des phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* examinés\*

Phage	c20	st2	447-B4	φ1	BaS19	BaS265
Groupe	GP2	GP1	GP2	GP2	GP2	GP2
Souche de propagation (N° CNRZ)	1151	1205	447	887	1575	1589

\* Ces 6 phages attaquent 90% des souches CNRZ qui sont sensibles à un ou plusieurs des 59 phages examinés.

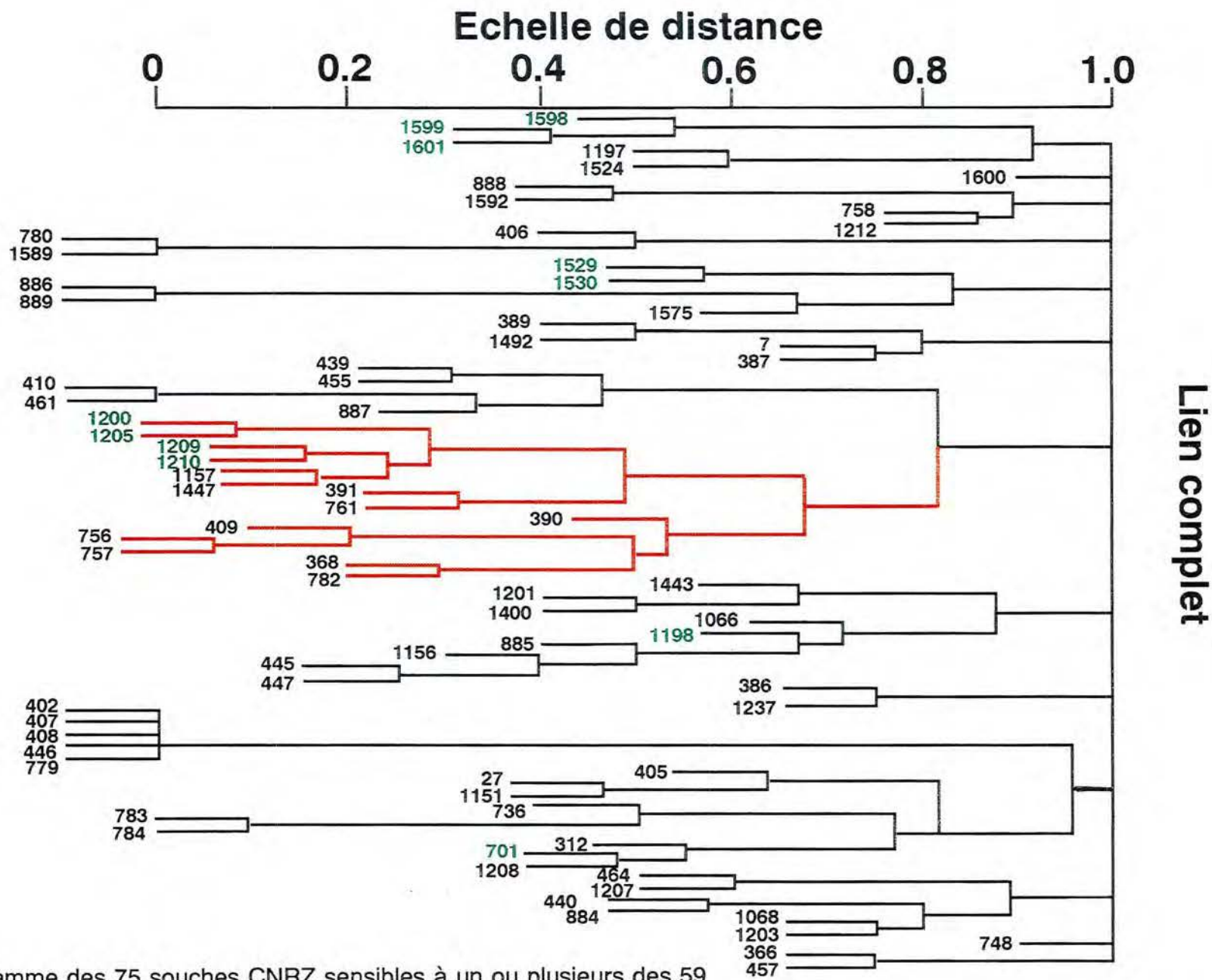
Il n'est pas possible d'effectuer un regroupement significatif des souches, car la plupart d'entre elles présentent des spectres d'hôtes particuliers, bien individualisés. On peut cependant noter qu'aucune souche n'est sensible à tous les phages et que le nombre de phages actifs sur une souche donnée varie entre 1 et 47. Onze des 13 souches lysogènes sont sensibles aux phages et certaines constituent de bonnes indicatrices, attaquées par de nombreux phages (CNRZ 701, 1200, 1205, 1209, 1210). Les souches type CNRZ 1358 (NCDO 573) et CNRZ 1446 (ATCC 19258) sont résistantes à tous les phages (tableau 11), les 2 autres souches représentatives de la souche type, CNRZ 1529 et 1530, sont sensibles, respectivement, à 4 et 6 phages (tableau 13). Les souches lysogènes possèdent des spectres d'hôtes plus ou moins apparentés, qui peuvent présenter, ou non, de l'homologie avec ceux de souches non lysogènes. Par exemple, les souches lysogènes CNRZ 1200, 1205, 1209 et 1210 ont des spectres d'hôtes proches de ceux des souches non lysogènes CNRZ 1157 et 1447. Enfin, la souche CNRZ 1600, non lysogène, possède un spectre totalement différent de celui de la souche lysogène CNRZ 1601 bien que ces 2 isolats proviennent d'un même lyophilisat (cf. paragraphe 1.1) et possèdent des profils d'hybridation identiques avec la sonde pNST21 spécifique d'espèce (cf. paragraphe 3.1.4).

#### ◆ Conclusion

La lysotypie des 116 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* examinées a montré que 35% d'entre elles (41 des 116 souches) sont résistantes aux 59 phages éprouvés. Les 75 souches sensibles se caractérisent par des spectres phagiques très variés et aucun regroupement significatif n'est possible.

#### 3.5.4. Hybridation des profils de restriction *EcoRV* de 118 génomes bactériens avec la sonde pNST21

Des hybridations ont été réalisées avec pNST21, sur des profils *EcoRV* de l'ADN de 118 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* [l'enzyme coupe 2 fois dans l'insert de 4,2 kb (fig. 3)] . Différents types de profils ont été obtenus et ces profils présentent à la fois des signaux de forte intensité et des signaux de faible intensité, comme ceux qui ont été décrits par Colmin *et al* (1992). Cela rend compte de la diversité des souches utilisées au cours de l'étude. Parmi les 118 souches, 23 possèdent des profils d'hybridation identiques ou très proches (fig. 33). Les autres souches se répartissent en 8 groupes de profils plus ou moins apparentés. Les 23 souches qui montrent des profils homologues, ne présentent pas de regroupement particulier au niveau de leur sensibilité phagique (tableau 20). Une classification plus approfondie des 118 souches n'a donc pas été poursuivie.



**Figure 32.** Dendrogramme des 75 souches CNRZ sensibles à un ou plusieurs des 59 phages examinés

Les souches lysogènes sont signalées en vert et un groupe de souches très sensibles aux phages par des tracés rouges.



**Figure 33.** Profils obtenus après hybridation du plasmide pNST21 avec les fragments de restriction *EcoRV* des 14 souches CNRZ

**Tableau 20.** Sensibilité phagique des 23 souches présentant des profils d'hybridation apparentés#

Souche (N°CNRZ)	Sensibilité phagique *	Souche (N°CNRZ)	Sensibilité phagique *
27	S(8)	703	R
160	R	736	S(12)
385	R	748	S(1)
402	S(1)	779	S(1)
404	R	783	S(19)
407	S(1)	784	S(21)
408	S(1)	884	S(4)
440	S(6)	1066	S(7)
441	R	1068	S(8)
446	S(1)	1100	R
457	S(3)	1151	S(15)
464	S(5)		

\* R : résistante, S : sensible. Le nombre de phages actifs est indiqué entre parenthèses.

# les 14 premiers profils d'hybridation sont présentés dans la figure 33



## **Discussion et conclusion**

## DISCUSSION

Dans un premier temps, l'utilisation de la sonde spécifique de l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus* nous a permis de nous assurer de l'identification des souches utilisées au cours de cette étude. Deux souches atypiques et une souche mal identifiée ont ainsi été décelées. Les profils d'hybridation obtenus ont confirmé l'existence d'une variabilité génomique intra-spécifique chez cette espèce, qui avait déjà été observée par Colmin *et al.* (1991). Cette variabilité reflète la diversité des souches incluses dans notre étude.

Par la technique des "transferts en goutte", nous avons montré que 12 des 120 souches CNRZ examinées (fréquence apparente un peu supérieure à 8%) contenaient de l'ADN phagique. Ces résultats confirmaient ceux de l'induction des souches avec la MC. Le pourcentage de souches lysogènes diffère de ceux trouvés lors de travaux précédents. Smaczny (1983) a trouvé 6 souches lysogènes et inductibles avec la MC, sur 24 souches isolées du lait cru (soit 25%). Neve *et al.* (1990) ont mis en évidence 2 souches lysogènes, en sondant les génomes de 17 souches avec l'ADN d'un phage virulent. Enfin, Carminati et Giraffa (1991) ont examiné 45 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* et n'ont trouvé qu'une seule souche lysogène inductible avec la MC (soit un peu plus de 2%). Ces variations résultent vraisemblablement de la taille des échantillons étudiés, des méthodes utilisées et de la plus ou moins grande diversité des souches examinées.

Les 13 souches lysogènes de la collection (incluant 3 des 4 souches CNRZ représentatives de la souche type et la souche lysogénisée CNRZ 1690) présentent toutes des propriétés autolytiques, qui se manifestent en fin de croissance, dans certaines conditions de culture. Ce phénomène avait déjà été observé pour 4 autres souches de la même espèce, les souches 140/76 et 11F, de Sandholm & Sarimo (1981), la souche type NCDO 573 (Thomas & Crow, 1983) et la souche CNRZ 1209 (Zourari, 1991). L'autolyse des souches lysogènes requiert une incubation dans du bouillon complexe tel que le M17. La température optimale est de 42°C et le pH optimal est de 6.5 (ce qui explique que l'autolyse se produise bien dans un bouillon tamponné à faible teneur en sucre, comme le M17). L'effet pH, initialement suggéré par Thomas et Crow (1983), n'est pas le seul en cause, lors de l'autolyse. La concentration en sucre du milieu joue également un rôle important. Le début de l'autolyse est en effet corrélé avec l'épuisement en sucre du milieu (Zourari, 1991). Le déclenchement d'une autolyse, par épuisement du glucose du milieu de culture, avait déjà été observé pour *Ent. faecalis* (Schockman *et al.*, 1961) et pour une souche de lactocoques (Moustafa &

Collins, 1968). Cela dit, ce sont Neve *et al.* (1990) qui ont, les premiers, établi un lien entre la lysogénie et les propriétés autolytiques de 2 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Les 2 souches lysogènes de leur collection s'autolysaient en effet à 45°C et étaient inductibles avec la MC. Les auteurs ont alors réussi à multiplier les phages induits sur les souches lysogènes, après les avoir guéries de leur prophage et ils ont ensuite observé que ces souches indicatrices guéries, une fois relysogénisées, possédaient à nouveau des propriétés autolytiques. Les souches lysogènes se développaient de façon homogène dans du bouillon, alors que les souches guéries perdaient leurs propriétés autolytiques et se caractérisaient, au cours de leur développement dans du bouillon, par une agrégation et une sédimentation rapides. Des observations similaires, en ce qui concerne l'autolyse, ont été faites avec les 13 souches lysogènes de notre collection, des clones guéris correspondants et des souches lysogénisées. En revanche, aucune différence dans le comportement des cultures (trouble uniforme contre sédimentation) n'a été observée entre cultures lysogènes et non lysogènes.

Ainsi, 13 souches lysogènes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* présentent un comportement analogue. Une relation étroite existe donc, chez ce streptocoque, entre la lysogénie et les propriétés autolytiques. Il est utile de rapprocher ces observations des résultats obtenus par Sanchez-Puelles *et al.* (1986), chez *S. pneumoniae*. Ces auteurs ont montré que des souches mutantes, lysogènes ou non, délétées du gène codant pour l'autolysine, perdaient leur caractère autolytique observé en phase exponentielle et qualifié de *suicidal tendencies*. Ces souches étaient alors incapables de se lyser pour libérer la population phagique issue d'une induction, lorsqu'elles étaient lysogènes, ou d'une infection phagique à faible MOI. Récemment, il a été établi qu'une homologie élevée (87%) existait entre la séquence nucléotidique de l'autolysine majeure d'une souche de *S. pneumoniae* et celle de la lysine du phage tempéré qu'elle héberge (Romero *et al.*, 1990). Les 2 enzymes ont des propriétés biochimiques et immunologiques communes et elles provoquent spécifiquement la lyse des parois bactériennes qui contiennent de la choline. Cela suggère aux auteurs que l'une des 2 enzymes dérive de l'autre, sans pouvoir préciser laquelle. Récemment, il a été montré que la séquence en acides aminés de l'autolysine de *S. pneumoniae* présente de l'homologie avec la lysine du phage  $\phi$ US3 de *Lactococcus lactis* (Platteeuw & De Vos, 1992).

Ce caractère autolytique est, certainement, en partie responsable de la découverte tardive de la lysogénie chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Les souches de bactéries lactiques sont en général sélectionnées, à l'isolement, en fonction de leur aptitude à une bonne croissance dans un bouillon convenable (par exemple, le M17 pour les streptocoques). La viabilité "défectueuse" des souches lysogènes, dans



certaines conditions de culture, pourrait expliquer la rareté des souches lysogènes présentes dans les levains commerciaux et dans les collections, à l'exception notable de la souche type NCDO 573, isolée du lait pasteurisé. La plupart des souches lysogènes caractérisées jusqu'à présent, a été isolée du lait cru (Smaczny, 1983) ou dans des levains mixtes de fromagerie (Kurmman, 1979 et les souches CNRZ du présent travail provenant du Jura), ou encore dans des yaourts artisanaux (les souches grecques du présent travail, isolées en Crête par Zourari, en 1987). Cela suggère que les souches lysogènes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* sont, en fait, plus fréquentes qu'on ne l'imaginait jusqu'à présent et qu'elles peuvent jouer, en conséquence, un rôle déterminant dans l'apparition et la dissémination des phages. Provenant principalement du lait cru, ces souches seraient surtout à craindre dans les ateliers de fabrication mal protégés contre les attaques phagiques, où elles pourraient alors participer activement à l'établissement d'un cycle d'infection phagique analogue à celui qui a été décrit par Heap et Lawrence (1988), pour les lactocoques des levains utilisés dans les fromageries de Nouvelle-Zélande fabriquant du cheddar.

D'après les résultats obtenus jusqu'à présent, concernant la lysogénie et l'autolyse chez ce streptocoque, 2 modèles peuvent être postulés. Dans le premier, les souches lysogènes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ont un système autolytique différent de celui des souches non lysogènes. La présence du prophage est responsable de ce changement phénotypique. Dans le deuxième modèle, le gène de la lysine du prophage est activé, dans des conditions de culture entraînant l'autolyse. Cette activation est indépendante de l'induction massive du prophage et de la réplication des phages issus de l'induction spontanée.

L'une de ces 2 hypothèses devrait être validée par la comparaison de la lysine du phage tempéré 01690 et de l'autolysine de la souche CNRZ 1690. Nous avons donc commencé la caractérisation de ces 2 enzymes, qui nécessitera une purification préparative. La caractérisation biologique et biochimique de ces enzymes sera alors possible. Des anticorps spécifiques permettront, en outre, de différencier ces 2 enzymes et de localiser leurs sites d'action respectifs, à l'aide des techniques immunochimiques.

Le clonage du gène de la lysine du phage tempéré devra être poursuivi, pour pouvoir faire ensuite une recherche d'homologie sur l'ADN bactérien des souches lysogènes et sur celui des souches non lysogènes. D'autre part, le clonage du gène de l'autolysine permettra d'effectuer une comparaison des séquences nucléotidiques. Il faudra utiliser un vecteur de clonage autre que le plasmide pBS, pour savoir si l'ADN phagique est responsable du faible taux obtenu de clones recombinants. Pour favoriser la viabilité des colonies transformées, un vecteur à faible nombre de copies sera



La connaissance de la régulation de l'expression des gènes sera ensuite nécessaire. La maîtrise de l'autolyse est en effet intéressante industriellement, pour la production d'enzymes intracellulaires. Ce serait également un outil utile pour l'affinage des fromages, si l'on arrive à bien en comprendre et en maîtriser les modalités. En outre, le clonage de ce système autolytique dans d'autres bactéries lactiques d'intérêt technologique, pourrait être envisagé. L'autolyse des souches lysogènes est, enfin, intéressante à considérer d'un point de vue pratique, pour le dépistage de telles souches dans les laboratoires.

Le mode de la lysogénie, chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, reste encore à préciser. Jusqu'à présent, tous les prophages bien caractérisés de bactéries lactiques, ont un mode de lysogénie de type intégratif (Davidson *et al.*, 1990). Rares sont, plus généralement chez les autres bactéries, les exemples de prophages se maintenant à l'état extrachromosomique. Le prophage non intégré le mieux étudié est le coliphage P1 (Ikeda & Tomizawa, 1968), connu pour son rôle de transducteur généralisé. Prophage, il se perpétue sous forme de plasmide, à raison d'environ 1 exemplaire par cellule. Les mécanismes par lesquels sont maintenus cet équilibre, tout comme ceux de la transduction généralisée, sont complexes (Yarmolinsky & Sternberg, 1988). Un phage tempéré non intégré, qui se maintient à l'état plasmidique dans les cellules lysogènes, a également été décrit chez *Azospirillum lipoferum* (Elmerich, 1982). Son génome est constitué d'un ADN linéaire de 36 kb, avec des extrémités cohésives. Des prophages plasmidiques ont aussi été caractérisés chez *Streptomyces fradiae* (Chung, 1982) et *Streptomyces ambofaciens* (Leblond *et al.*, 1990). De même, un prophage de 48 kb, intégré dans un plasmide de 69 kb, a été mis en évidence chez *Bacillus thuringiensis* (Kanda *et al.*, 1989).

La souche lysogène CNRZ 1690 de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, que nous avons particulièrement étudiée, ne contient pas d'ADN plasmidique. Plus généralement, l'espèce *S. salivarius* subsp. *thermophilus* apparaît naturellement pauvre en plasmides (Mercenier, 1991) et la lysogénie de type plasmidique semble donc improbable. Nos observations méritent d'être rapprochées des résultats obtenus avec le phage tempéré mv4 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, par Lahbib-Mansais *et al.* (1992). Une forme linéaire extrachromosomique de 36 kb du prophage mv4, coexiste, en effet, avec une forme intégrée dans l'ADN des souches lysogènes et masque celle-ci. Pour mettre en évidence la forme intégrée de ce prophage, il faut éliminer la forme extrachromosomique dominante du phage en soumettant l'ADN bactérien à une pré-électrophorèse, avant de réaliser l'électrophorèse en champ pulsé. Il a ainsi été mis en évidence plusieurs sites d'intégration du phage mv4, chez ses hôtes lysogénisés. L'utilisation d'un protocole similaire pour l'ADN de la souche lysogène CNRZ 1690,

devrait nous permettre de préciser les modalités de la lysogénie du phage 01690. La technique d'électrophorèse en champ pulsé FIGE (*Field Inversion Gel Electrophoresis*), en complément de la technique CHEF, pourra être essayée. Elle permet, en effet, de séparer les ADN circulaires relâchés de haut poids moléculaire (Beverley, 1988), alors que l'électrophorèse traditionnelle et les autres techniques d'électrophorèse en champ pulsé, ne permettent pas à ces ADN de migrer dans les gels d'agarose. Au cours de ce travail, nous avons montré que les génomes des 10 phages tempérés examinés sont constitués d'ADN linéaire. Certains d'entre eux possèdent des extrémités cohésives. La comparaison des profils d'hybridation a montré qu'il existait de l'homologie, d'une part entre tous les phages tempérés et, d'autre part, entre les phages tempérés et les phages virulents. Nos résultats sont en accord avec les données précédemment établies pour des phages virulents de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, par différents auteurs (Benbadis *et al.*, 1990b; Neve *et al.*, 1990). Nos résultats confortent donc l'hypothèse selon laquelle tous les phages de ce streptocoque dérivent d'un ancêtre commun (Mercenier, 1990).

A la différence des phages des lactocoques (Jarvis, 1989) et des lactobacilles thermophiles (Séchaud *et al.*, 1988 & 1992), les phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* sont tous apparentés entre eux, au plan génomique. Le maintien des mêmes caractéristiques morphologiques essentielles chez tous ces phages en serait l'une des conséquences bien visibles. Tous les phages caractérisés jusqu'à présent, plus d'une centaine, appartiennent en effet au même morphotype, celui du groupe B de la classification de Bradley (1967) ou de la famille des *Siphoviridae* de l'ITCV (Matthews, 1982) et les profils protéiques des phages de notre collection s'apparentent à ceux précédemment décrits par d'autres auteurs (Neve *et al.*, 1989; Prévots *et al.*, 1989; Benbadis *et al.*, 1990b).

Contrairement à ce qui est rapporté pour d'autres bactéries lactiques (Cluzel *et al.*, 1987; Séchaud *et al.*, 1989), on n'observe pas véritablement d'immunité lysogénique chez certaines souches lysogènes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Elles semblent, au contraire, jouer un rôle prépondérant dans la diversification des phages et dans l'évolution de la population phagique, puisque ce sont de bonnes indicatrices. L'examen au microscope électronique d'hétéroduplexes formés entre l'ADN d'un phage virulent et celui du phage tempéré hébergé par l'indicatrice lysogène, pourrait permettre de rechercher les homologies et de visualiser les remaniements génomiques postulés au cours du présent travail, si l'on parvient à surmonter les difficultés rencontrées par Benbadis *et al.* (1990b). Un mode de lysogénie non intégratif serait potentiellement plus favorable à des remaniements, en favorisant les interactions génomiques entre l'ADN du phage infectant et celui du prophage de la souche indicatrice.

## CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus soulignent le caractère particulier de la lysogénie chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Les souches lysogènes pourraient être fréquentes dans le milieu naturel et, en conséquence, jouer un rôle, jusqu'à présent insoupçonné, dans la genèse des infections phagiques affectant les levains de laiterie. En outre, ces souches lysogènes participent activement à l'évolution de la population phagique. Les phages de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, qu'ils soient tempérés ou virulents, demeurent très proches les uns des autres et forment un ensemble relativement homogène, qui pourrait être issu d'un ancêtre commun.

La lutte anti-phagique, au niveau de l'industrie laitière, suppose donc un suivi assidu de la population phagique spécifique de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Outre le respect des mesures classiques de la lutte préventive contre les phages (conception des locaux, préparation aseptique des levains, désinfection soigneuse du matériel et des salles de fabrication, éducation du personnel, etc...), l'utilisation de souches possédant une résistance phagique améliorée, cumulant notamment plusieurs systèmes de restriction/modification, devrait permettre de prévenir la prolifération des phages et les accidents de fabrication qui en découlent.

L'autolyse, caractéristique des souches lysogènes, pourrait être mise à profit pour des applications industrielles, telles que la production d'enzymes et l'affinage des fromages. Cela demande, toutefois, de poursuivre une étude comparative de l'autolyse et de la lyse phagique (enzymes impliquées, gènes responsables et régulation).

## **Bibliographie**



## BIBLIOGRAPHIE

- Accolas J.P., D. Hemme, M.J. Desmazeaud, L. Vassal, C. Bouillanne & M. Veaux.** 1980. Les levains lactiques thermophiles: propriétés et comportement en technologie laitière. Une revue. *Lait* **60**: 487-524.
- Adams M.H.** 1959. Bacteriophages. Wiley-Intersciences, New-York.
- Akpemado K.M. & P. Bracquart.** 1983. Uptake of branched-chain amino-acids by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 136-140.
- Benbadis L., M. Faelen, P. Slos, A. Fazel & A. Mercenier.** 1990a. Characterization and comparison of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt. *Biochimie* **72**: 855-862.
- Benbadis L., J.R. Garel & D.H. Hartley.** 1990b. *SthHT1*: a new restriction endonucléase from *Streptococcus thermophilus* T. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 64-71.
- Bentley R.W., J.A. Leigh & M.D. Collins.** 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int. J. System. Bacteriol.* **41**: 487-494.
- Beverley S.M.** 1988. Characterization of the "unusual" mobility of large circular DNAs in pulsed field gradient electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **16**:925-939.
- Botstein D.** 1980. A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **354**:484-491.
- Bracquart P., D. Lorient & C. Alais.** 1978. Effects des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. II Etude sur cinq souches . *Milchwissenschaft* **34**: 676-679.
- Bradley D.E.** 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **33**: 230-314.
- Carminati D. & G. Giraffa.** 1992. Evidence and characterization of temperate bacteriophage in *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* St18. *J. Dairy Res.* **59**: 1-9.
- Cerning J.** 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 113-130.
- Cerning J., C. Bouillanne, M.J. Desmazeaud & M. Landon.** 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.* **10**: 255-260.
- Chamba J.F. & F. Prost.** 1989. Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite. *Lait.* **69**: 417-431.
- Chassy B.M., A. Mercenier, & J.L. Flickinger.** 1988. Transformation of bacteria by electroporation. *Trends Biotechnol.* **6**: 303-309.

- Chu G., D. Vollrath & R.W. Davis.** 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric field. *Science* **234**: 1582–1585.
- Chung S.T.** 1982. Isolation and characterization of *Streptomyces fradiae* plasmids which are prophage of the actinophage  $\phi$ SF1. *Gene* **17**: 239–246.
- Ciblis E.** 1970a. [Differentiation of phage-sensitive and phage-resistant strains of *Streptococcus thermophilus*]. *Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionk. Hyg., Abt. II* **125**: 525–540.
- Ciblis E.** 1970b. [Characterization of a bacteriophage of *Streptococcus thermophilus*]. *Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionk. Hyg., Abt. II* **125**: 541–554.
- Cluzel P.J., M. Veaux, M. Rousseau & J.P. Accolas.** 1987. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Res.* **54**: 397–405.
- Colmin C., M. Pébay, J.M. Simonet, & B. Decaris.** 1991. A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**: 123–128.
- Davidson B.E., I.B. Powell & A.J. Hillier.** 1990. Temperate bacteriophage and lysogeny in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 79–90.
- Deane D.D., F.E. Nelson, F.G. Ryser & P.H. Carr.** 1953. *Streptococcus thermophilus* bacteriophage from Swiss cheese whey. *J. Dairy Sci.* **36**: 185–191.
- Desmazeaud M.J.** 1974. Propriétés générales et spécificité d'action d'une endopeptidase neutre intracellulaire de *Streptococcus thermophilus*. *Biochimie* **56**: 1173–1181.
- Driessen F.M., F. Kingma & J. Stadhouders.** 1982. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.* **36**: 134–144.
- Duckworth D.H., J. Gleen & D.J. McCorquodale.** 1981. Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetic elements. *Microbiol. Rev.* **45**: 52–71.
- Elliker P.R., A.W. Anderson & G. Hannesson.** 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.* **39**: 1611–1612.
- Elmerich C., B. Quiviger, C. Rosenberg, C. Franche, P. Laurent & J. Döbereiner.** 1982. Characterization of a temperate bacteriophage for *Azospirillum*. *Virology* **122**: 29–37.
- El Soda M. & M.J. Desmazeaud.** 1982. Les peptidases hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.* **28**: 1181–1188.
- Farrow J.A.E. & M.D. Collins.** 1984. DNA base composition, DNA–DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 357–362.
- Foucaud C. & B. Poolman.** 1992. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, sous presse.

**Gélin M., T. Wurch & R. Linder.** 1970. Mise en évidence d'un bactériophage du *Streptococcus thermophilus*, cause d'un accident de fermentation du yoghourt. C. R. Acad. Sci. (Paris) **270**: série D, 425-427.

**Greener A.** 1990. *E. coli* SURE strain clones "unclonable" DNA. *Strategies in Molecular Biology* **1**: 5-9.

**Heap H.A. & R.C. Lawrence.** 1988. Culture systems for the dairy industry. In *Developments in food microbiology* (R.K. Robinson, ed.) vol.4, p. 149-185, Elsevier Applied Science, London.

**Henry P., C. Guimont & P. Bracquart.** 1990. Mise en évidence d'une activité endonucléasique chez *Streptococcus thermophilus*. XXIII<sup>e</sup> Cong. Int. Lait. Brèves communications et résumés d'affiches, vol. 2, p. 346.

**Herman R.E. & L.L. McKay.** 1986. Cloning and expression of  $\beta$ -D-galactosidase gene from *Streptococcus thermophilus* in *E. coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 825-831.

**Hutkins R.W. & H.A. Morris.** 1987. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. *J. Food Prot.* **50**: 876-884.

**Hutkins R.W., H.A. Morris & L.L. McKay.** 1985a. Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 772-776.

**Hutkins R.W., H.A. Morris & L.L. McKay.** 1985b. Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 777-780.

**Ikeda H. & J.I. Tomizawa.** 1968. Prophage P1, an extrachromosomal replication unit. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**: 791-798.

**Jarvis A. W.** 1989. Bacteriophages of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **72**: 3406-3428.

**Jarvis A.W. & B.D.W. Jarvis.** 1981. Deoxyribonucleic acid homology among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 77-83.

**Juillard V., H.E. Spinnler, M.J. Desmazeaud & C.Y. Boquien.** 1987. Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait* **67**: 149-172.

**Juillard V., M.J. Desmazeaud & H.E. Spinnler.** 1988. Mise en évidence d'une activité uréasique chez *Streptococcus thermophilus*. *Can. J. Microbiol.* **34**: 818-822.

**Kanda K., Y. Tan & K. Aizawa.** 1989. A novel phage genome integrates into plasmid in *Bacillus thuringiensis* strain AF101. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3035-3041.

**Kiuru V.J.T. & E. Tybeck.** 1955. Characteristics of bacteriophages active against lactic acid bacteria in Swiss cheese. *Suom. Kemistil. B* **28**: 57-62.

**Kivi S., T. Peltomäki, K. Luomala & S.S. Sarimo.** 1987. Some properties of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Folia Microbiol.* **32**: 101-106.

**Kleinschmidt A.K.,** 1968. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules. In *Methods in enzymology*, vol 12 part B, p.361-377.

**Krusch U., H. Neve, B. Luschei & M. Teuber.** 1987. Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy. *Kieler Milchwirtsch. Forschungber.* **39**: 155-167.



**Kurmann J.L.** 1979. [Production d'acide insuffisante causée par des bactériophages dans la fabrication des fromages à pâte dure]. *Schweiz. Milchw. Forsch.* **8**: 71–76.

**Kurmann J.L.** 1983. [Libération par la pénicilline de bactériophages de bactéries lactiques thermophiles, une cause cachée des perturbations d'acidification attribuables aux phages]. *Schweiz. Milchw. Forsch.* **12**: 39–43.

**Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

**Lahbib-Mansais Y., B. Boizet, L. Dupont, M. Mata & P. Ritzenthaler.** 1992. Characterization of a temperate bacteriophage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and its interactions with the host cell chromosome. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1139–1146.

**Lakshmidēvi G., B.E. Davidson & A.J. Hillier.** 1988. Circular permutation of the genome of a temperate bacteriophage from *Streptococcus cremoris* BK5. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1039–1045.

**Larbi D.** 1991. Etudes génétique et biologique de neuf bactériophages de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*; études des interactions phages–bactéries. Thèse de doctorat, Université de Nancy 1.

**Larbi D., C. Colmin, L. Rousselle, B. Decaris & J.M. Simonet.** 1990. Genetic and biological characterization of nine *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* bacteriophages. *Lait* **70**: 107–116.

**Larbi D., B. Decaris & J.M. Simonet.** 1992. Different bacteriophage resistance mechanisms in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *J. Dairy Res.* **59**: 349–357.

**Lawrence R.C. & T.D. Thomas.** 1979. The fermentation of milk by lactic acid bacteria. In *Microbial technology: current state, future prospects*, 29<sup>th</sup> Symposium of the Society of General Microbiology (A.T. Bull, D.C. Ellwood & C. Ratledge, eds), p. 187–219.

**Leblond P., F.X. Francou, J.M. Simonet & B. Decaris.** 1990. Pulse-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Streptomyces ambofaciens* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**: 79–88.

**Le Bourgeois P., M. Mata & P. Ritzenthaler.** 1989. Genome comparison of *Lactococcus* strains by pulse-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 65–70.

**Maniatis T., E.F. Fritsch & J. Sambrook.** 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*, p. 383–385. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

**Marmur J.**, 1961. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208–218.

**Marranzini R.M., R.H. Schmidt, R.B. Shireman, M.R. Marshall & J.A. Cornell.** 1989. Effect of threonine and glycine concentrations on threonine–aldolase activity of yogurt microorganisms during growth in modified milk prepared by ultrafiltration. *J. Dairy Sci.* **72**: 1142–1148.

**Mata M., A. Trautwetter, G. Luthaud & P. Ritzenthaler.** 1986. Thirteen virulent and temperate bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* belong to a single DNA homology group. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 812–818.



- Matthews R.E.F.**, 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **17**: 1–200.
- Mercenier A.** 1990. Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 61–78.
- Mercenier A. & Y. Lemoine.** 1989. Genetics of *Streptococcus thermophilus*: a review. *J. Dairy Sci.* **72**: 3444–3454.
- Mercenier A., P. Slos, M. Faelen & J.P. Lecocq.** 1988. Plasmid transduction in *Streptococcus thermophilus*. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 386–389.
- Meyer J. & R. Jordi.** 1987. Purification and characterisation of X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus lactis* and from *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* **70**: 783–745.
- Meyer J., D. Howald, R. Jordi & M. Fürst.** 1989. Location of proteolytic enzymes in *Lactobacillus lactis* and *Streptococcus thermophilus* and their influence on cheese ripening. *Milchwissenschaft* **44**: 678–681.
- Mocquot G.** 1979. Swiss-type cheese. *J. Dairy Res.* **46**:133–160.
- Moustafa H.H. & E.B. Collins.** 1968. Role of galactose or glucose-1-phosphate in preventing the lysis of *Streptococcus diacetilactis*. *J. Bacteriol.* **95**: 592–602.
- Neve H., U. Krusch & M. Teuber.** 1989. Classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yoghurt and Swiss-type cheese. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 624–629.
- Neve H., U. Krusch & M. Teuber.** 1990. Virulent and temperate bacteriophages of thermophilic lactic acid streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: P58.
- Orla-Jensen S.** 1919. The lactic acid bacteria. A.F. Host & Sons, Copenhagen.
- Ottogalli G., A. Galli & F. Dellaglio.** 1979. Taxonomic relationships between *Streptococcus thermophilus* and some other streptococci. *J. Dairy Res.* **46**: 127–131.
- Pette J.W.** 1957. Joghurt und seine probleme. *Kieler Milchw. Forsch. Ber.* **9**: 177–190.
- Pette J.W. & J.S. Kooy.** 1952. Bacteriophages in yoghurt. *Neth. Milk Dairy J.* **6**: 233–241.
- Piard J.C., F. Delorme, G. Giraffa, J. Commissaire & M.J. Desmazeaud.** 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.* **44**: 143–158.
- Platteuw C. & W. M. De Vos.** 1992. Location, characterization and expression of lytic enzyme-encoding gene, *lytA*, of *Lactococcus lactis* bacteriophage  $\phi$ US3. *Gene* **118**: 115–120.
- Poolman B., T.J. Royer, S.E. Mainzer & B.F. Schmidt.** 1989. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *J. Bacteriol.* **171**: 244–253.

- Prévots F., P. Relano, M. Mata & P. Ritzenthaler.** 1989. Close relationship of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* at both the protein and the DNA level. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3337–3344.
- Radke–Mitchell L. & W.E. Sandine.** 1984. Association growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: a review. *J. Food Prot.* **47**: 245–248.
- Raya R.R., M.C. Manca de Nadra, A. Pesce de Ruiz Holgado & G. Oliver.** 1986. Acetaldehyde metabolism in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* **41**: 397–399.
- Reddy M.S.** 1974. Development of cultural techniques for the study of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus* bacteriophages. Ph. D. Thesis, Iowa State University, USA.
- Reinbold G.W. & M.S. Reddy.** 1973. Bacteriophages for *Streptococcus thermophilus*. *Dairy Ind.* **38**: 413–416.
- Relano P., M. Mata, M. Bonneau & P. Ritzenthaler.** 1987. Molecular characterization and comparison of 38 virulent and temperate bacteriophages of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3053–3063.
- Rigby P.W., M. Dieckmann, C. Rhodes & P. Berg.** 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick–translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**: 237–251.
- Romero D.A., R. Lopez & P. Garcia.** 1990. Sequence of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage HB–3 amidase reveals high homology with the major host autolysin. *J. Bacteriol.* **172**: 5064–5070.
- Roussel Y., M. Pébay, J.M. Simonet, & B. Decaris.** 1992. Carte génétique et physique du chromosome de *Streptococcus thermophilus* AO54. Communication, Club des Bactéries Lactiques, Nancy.
- Sanchez–Puelles J.M., C. Ronda, J.L. Garcia, P. Garcia, R. Lopez & E. Garcia.** 1986. Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.* **158**:289–293.
- Sanders M.E.** 1988. Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**:411–422.
- Sandholm E. & S.S. Sarimo.** 1981. Autolysis of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **11**: 125–129.
- Sanger F., A.R. Coulson, T. Friedmann, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, J.C. Fiddes, C.A. Hutchinson III, P.M. Slocombe & M. Smith.** 1978. The nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174. *J. Mol. Biol.* **125**: 225–246.
- Schleifer K.H., M. Ehrmann, U. Krusch & H. Neve.** 1991. Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla–Jensen, 1919). *System. Appl. Microbiol.* **14**: 386–388.
- Schleifer K.H. & R. Kilpper–Bälz.** 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *System. Appl. Microbiol.* **10**: 1–19.

- Shahbal S., D. Hemme & M.J. Desmazeaud.** 1991. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait* **71**: 351-357.
- Shahbal S., D. Hemme & P. Renault.** 1993. Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**. *in press*.
- Shockman G.D., M.J. Conover, J.J. Kolb, P.M. Phillips, L.S. Riley & G. Toennies.** 1961. Lysis of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **81**: 36-43.
- Séchaud L., P.J. Cluzel, M. Rousseau, A. Baumgartner & J.P. Accolas.** 1988. Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie* **70**: 401-410.
- Séchaud L., M.L. Callegari, M. Rousseau, M.C. Muller & J.P. Accolas.** 1989. Relationship between temperate bacteriophage 0241 and virulent bacteriophage 832-B1 of *Lactobacillus helveticus*. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 261-277.
- Séchaud L., M. Rousseau, B. Fayard, M.L. Callegari, P. Quénée & J.P. Accolas.** 1992. Comparative study of 35 bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: Morphology and host range. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1011-1018.
- Sing W.D. & T.R. Klaenhammer.** 1990. Characteristics of phage abortion conferred in lactococci by the conjugal plasmid pTR2030. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1807-1815.
- Smaczny T.,** 1983. [Perturbations de l'acidification au cours de la fabrication du yaourt et du Bioghurt, causées par des bactériophages et des bactériocines]. Inaugural-dissertation zur Erlangung der Doktorwürde, Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Allemagne Fédérale.
- Smaczny T. & J. Krämer.** 1984a. [Perturbations de l'acidification au cours de la fabrication du yaourt, du Bioghurt et du Biogarde, causées par des bactériocines et des bactériophages de *Streptococcus thermophilus*. I. Mise en évidence et caractérisation des bactériocines]. *Dtsch. Molk.-Ztg.* **105**: 460-461 et 464.
- Smaczny T. & J. Krämer.** 1984b. [Perturbations de l'acidification au cours de la fabrication du yaourt, du Bioghurt et du Biogarde, causées par des bactériocines et des bactériophages de *Streptococcus thermophilus*. II. Mise en évidence et caractérisation des bactériophages]. *Dtsch. Molk.-Ztg.* **105**: 614-618.
- Smart J.B., V.L. Crow & T.D. Thomas.** 1985. Lactose hydrolysis in milk and wheys using  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **20**:43-56.
- Sokal R.R. & C.C. Michener.** 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bulletin* **38**: 1409-1438.
- Solaiman K.Y. & G.A. Somkuti.** 1990. Isolation and characterization of a type II restriction endonuclease from *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 261-266.
- Southern E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Sozzi T.** 1972. Etude sur l'exigence en calcium des phages de ferments lactiques. *Milchwissenschaft* **27**: 503-507.



- Sozzi T. & R. Maret.** 1975. Isolement et quelques caractéristiques des bactériophages de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus helveticus* de ferments d'emmental. *Lait* **55**: 269-288.
- Sozzi T., R. Maret & J.M. Poulin.** 1976. Study of plating efficiency of bacteriophages of thermophilic lactic acid bacteria on different media. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 131-137.
- Spinnler H.E. & G. Corrieu.** 1989. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *J. Dairy Res.* **56**: 755-764.
- Stadhouders J., F. Hassing, G.J.M. Leenders & F.M. Driessen.** 1984. Disturbance of acid production by bacteriophages in the manufacture of yogurt. *Zuivelzucht* **2**: 40-43.
- Stadhouders J., L. Smalbrink, G. Maessen-Damsma & T. Klompaker.** 1988. Phage prevention at the manufacture of yogurt. *Voedingsmiddelentechnologie* **21**: 21-24.
- Terzaghi B.E. & W.E. Sandine.** 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**: 807-813.
- Thomas T.D. & V.L. Crow.** 1983. Lactose and sucrose utilization by *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **17**: 13-17.
- Thomas T.D. & V.L. Crow.** 1984. Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 186-191.
- Verhue W.M.** 1978. Interaction of bacteriophage infection and low penicillin concentrations on the performance of yogurt cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 1145-1149.
- Whitehead H.R. & G.A. Cox.** 1935. The occurrence of bacteriophages in cultures of lactic streptococci. A preliminary note. *N.Z. J. Sci. Technol.* **16**: 319-320.
- Yamamoto K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne & G. Treiber.** 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* **40**: 734-744.
- Yarmolinsky M.B. & N. Sternberg.** 1988. Bacteriophage P1. In *The bacteriophages* (R. Calendar, ed.) vol. 1, p. 291-438. Plenum press, New York.
- Zourari A.** 1991. Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées à partir de yaourts artisanaux grecs. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Zourari A., S. Roger, C. Chabanet & M.J. Desmazeaud.** 1991. Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. I. Souches de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Lait* **71**: 445-461.
- Zourari A. & M.J. Desmazeaud.** 1991. Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. II. Souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et cultures mixtes avec *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Lait* **71**: 463-482.
- Zourari A., J.P. Accolas & M.J. Desmazeaud.** 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria: a review. *Lait* **72**: 1-34.



## **Glossaire**

## GLOSSAIRE

**Autolyse:** éclatement d'une cellule à la suite d'un processus d'autodestruction.

**Bactériophage:** virus des bactéries (abréviation courante: phage).

**Capside:** enveloppe protéique qui contient normalement l'ADN phagique, ce qui forme la tête du phage.

**Clone:** ensemble de bactéries dérivant d'une cellule, en pratique, d'une colonie isolée sur gélose.

**Compétence:** état physiologique des cellules bactériennes qui favorise la transformation ou la transduction.

**Complémentation:** capacité des produits de gènes mutants en configuration trans de donner un phénotype sauvage.

**Concatémère:** série d'unités génomiques.

**Configuration trans:** décrit des gènes (ou séquences d'ADN) porté(e)s par 2 molécules d'ADN différentes (chromosome, phage, plasmide), s'oppose à la configuration cis.

**Crossing-over:** échange de séquences entre 2 molécules d'ADN différentes.

**Défectif:** décrit une particule phagique ou un prophage qui a perdu une ou des fonction(s) nécessaire(s) pour assurer un cycle de multiplication végétative complet.

**Dénaturation:** passage de l'ADN double brin sous forme simple brin, souvent consécutif à un traitement alcalin ou thermique.

**Extrémités cohésives:** extrémités simple brin complémentaires de l'ADN linéaire du phage  $\lambda$  ou d'autres phages.

**Guérie:** décrit une bactérie viable qui a perdu le prophage qu'elle hébergeait.

**Hôte:** bactérie sensible à un phage.

**Hybridation:** association de 2 séquences complémentaires d'ADN ou d'ARN.

**Indicatrice:** décrit une bactérie sensible à un phage.

**Inductible:** décrit une bactérie qui présente une phase de lyse consécutive à un traitement d'induction avec la mitomycine C, ou avec d'autres agents inducteurs.

**Induction:** décrit l'excision d'un prophage du génome bactérien hôte et son passage à la multiplication végétative, ce qui entraîne la lyse de la cellule hôte.

**Immunité lysogénique:** capacité d'un prophage de prévenir toute surinfection de la souche qui l'héberge par un phage infectant qui lui est apparenté.

**Isogénique:** décrit des bactéries dérivant d'un même clone.

**kb:** abréviation pour 1000 paires de bases d'ADN ou 1000 paires de bases d'ARN.

**Levain:** culture contenant une ou plusieurs souche(s), utilisée pour la fabrication des produits laitiers.

**Lyse (phagique):** mort d'une cellule à la fin du cycle de multiplication végétative d'un phage, quand la cellule éclate pour libérer la descendance virale.

**Lysogène:** définit une bactérie qui héberge un prophage dans son génome.

**Lysogénie:** état d'une cellule qui héberge un prophage stable.

**Lysogénisation:** action de rendre une souche lysogène.

**Lysotypie:** étude des spectres d'hôtes.

**Multiplication végétative:** cycle lytique du phage.

**Mitomycine C:** agent mutagène utilisé pour induire une souche.

**Paire de bases:** définit l'association de la base A (Adénine) avec la base T (Thymine) et de la base C (Cytosine) avec la base G (Guanine).

**Phage:** virus des bactéries (bactériophage)

**Phage isolé comme lytique:** phage mis en évidence sur une souche sensible dont le caractère tempéré ou virulent n'a pas été établi.

**Plage de lyse:** zone circulaire d'éclaircissement formée sur un tapis bactérien à la suite du développement d'une particule phagique.

**Plasmide:** molécule d'ADN circulaire, extrachromosomique et à réplication autonome.

**Prophage:** génome d'un phage, qui se maintient à l'état réprimé, généralement intégré dans le chromosome bactérien d'une bactérie hôte.

**Recombinaison:** échange d'ADN par crossing-over entre 2 éléments génétiques distincts ou 2 régions distinctes d'un même élément.

**Sensible:** décrit une bactérie qui subit la multiplication d'un phage et est lysée par ce phage (cf. indicatrice).

**Site d'intégration:** locus du chromosome bactérien-hôte où un phage tempéré insère (ou excise) son génome.

**Souche:** ensemble de bactéries issues d'un clone.

**Spectre d'hôtes** (d'un phage): ensemble des souches sensibles à un phage.

**Tempéré:** phage capable, lorsqu'il infecte une cellule, de lysogéniser ou d'emprunter la voie de la multiplication végétative.

**Transduction:** transformation effectuée par un phage.

**Transformation:** modification du patrimoine génétique et du phénotype d'une cellule par introduction d'ADN étranger.

**Virulent:** phage qui emprunte systématiquement la voie de la multiplication végétative.

## **Annexes**



## ANNEXE 1

### Etude de l'autolyse

Milieu M17 (selon Terzaghi & Sandine, 1975)

	g/l
Bio-polytone (Mérieux)	5
Bio-soyase (Mérieux)	5
Extrait de viande (Biokar)	5
Extrait de levure (Difco)	2,5
$\beta$ -glycérophosphate de sodium (Merck)	19
Acide ascorbique (Prolabo)	0,50
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O, Merck)	0,25

pH 7,1 à 7,2

Le milieu est stérilisé à 115°C pendant 20 min.

Une solution de lactose à 20% préparée séparément et stérilisée à 110°C pendant 10 mn est ajoutée dans le milieu avant son utilisation, pour obtenir une concentration finale de lactose de 0,5% ou de 1,5%.



**Title: Interactions of temperate bacteriophages of Streptococcus salivarius subsp. thermophilus with lysogenic indicators affect phage DNA restriction patterns and host ranges**

**Authors: BLANDINE FAYARD, MORITZ HAEFLIGER\*, AND JEAN-PIERRE ACCOLAS\*\***

**Address: Station de Recherches Laitières, Institut National de la Recherche Agronomique, 78350 Jouy-en-Josas, France**

**Running title: Temperate phages in Str. salivarius subsp. thermophilus**

**\*Present address: Schweizerische Milch-Gesellschaft AG, CH-6280 Hochdorf, Switzerland**

**\*\*Corresponding author**

SUMMARY. After treatment with mitomycin C, 12 of the 120 strains of the French Collection of Lactic Acid Bacteria (CNRZ), belonging to the species Streptococcus salivarius subsp. thermophilus were found to be inducible and lysogenic. The corresponding temperate phages were multiplied on indicator strains and further characterized. It is noteworthy that some of the indicators were themselves lysogenic.

The temperate phages belonged to Bradley's group B, or to the Myoviridae family of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Seven of them were shared among the 2 protein profiles previously established for virulent phages of Str. salivarius subsp. thermophilus. Seven different DNA restriction profiles were found for 10 native temperate phages examined just after mitomycin C induction. Genome sizes varied from 40 to 45 kb and were classified into 4 related homology groups by DNA cross-hybridization, but there was no clear-cut relationship with the protein clusters previously shown. DNA homology with representatives of virulent phages was also found. The DNA restriction profiles of 7 native temperate phages, examined just after mitomycin C induction of the lysogenic hosts, were noticeably different from those of the corresponding phages once they had been propagated on lysogenic indicators. Moreover, the host-range of the latter phages was extended to a greater number of sensitive strains.

The possible role of lysogenic strains of Str. salivarius subsp. thermophilus in the occurrence of phage outbreaks affecting this dairy streptococcal species is discussed.



Streptococcus salivarius subsp. thermophilus is the streptococcal species characteristic of thermophilic dairy starters used in the manufacture of yogurt and several types of cheeses (Auclair & Accolas, 1983; Zourari et al., 1992). As in the case of other dairy lactic acid bacteria, these streptococci are often the prey of phage outbreaks which cause  
5 slow lactic acid fermentation and downgraded products.

The first phages of Str. salivarius subsp. thermophilus were described in the early 1950s (Deane et al., 1953; Kiuru & Tybeck, 1955) and numerous observations since then have shown that this streptococcus was the victim of specific phage infections relatively often. Nevertheless, work on Str. salivarius subsp. thermophilus phages remained scant and  
10 limited for some time, and it was only in the second half of the 1980s that several surveys were conducted. Their results filled in gaps in our knowledge, because of the molecular characterization of the phages in question (Krush et al., 1987; Neve et al., 1989; Prévots et al., 1989; Benbadis et al., 1990; Larbi et al., 1990). All the phages studied until the present, isolated after acidification difficulties during cheesemaking or yogurt manufacture, form a  
15 relatively homogeneous set. One predominant morphotype is found, belonging to the Siphoviridae family of Matthews (1982), or to Bradley's group B (1967). It is characterized by an isometric head (50–60 nm) and a relatively long, non-contractile tail (200–300 nm). At the molecular level, no more than 2 or 3 phage types can be distinguished. Each has identical or very similar protein profiles and considerable genome homology. Genome homology also  
20 exists, but to a lesser extent, among different phage types (Benbadis et al., 1990). This suggested to Mercenier (1990) that all phages studied up to the present time were derived from a common ancestor and that the diversity of phage genomes observed by different authors could have resulted from multiple rearrangements occurring in the phage population in the course of time.

25 Until the present, the role of lysogeny in the genesis of phage infections was poorly evaluated, if not ignored altogether, because of insufficient documentation. Lysogenic strains had been described several times in the past (Ciblis, 1970; Kurmann, 1979, 1983; Smaczny,

1983; Smaczny & Krämer, 1984), but this work was not followed up. More recently, Neve *et al.* (1990) detected 2 lysogenic strains by probing the genomes of 17 strains with phage DNA, and Carminati & Giraffa (1992) found 1 mitomycin C (MC)-inducible strain, among the 45 they examined.

5 It is in this context that we decided to examine the problem of lysogeny in *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*, benefiting from the French collection of lactic acid bacteria (CNRZ acronym) in our laboratory. Our aim was to demonstrate prophages present in certain *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* strains, using a sufficiently diversified population of strains, and then to compare temperate phages among themselves and with the virulent  
10 phages of this streptococcus, described previously.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and bacteriophages

One hundred and twenty *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* strains of the CNRZ Collection of Lactic Acid Bacteria (Jouy-en-Josas, France), all of dairy origin, were used.  
15 Their species status was first verified by using dot-blot hybridization with the species-specific DNA probe described by Colmin *et al.* (1991). Lysogenic strains and their corresponding prophages found in the present work are listed in Table 1. Prophages were designated by the CNRZ number of their lysogenic host strains, preceded by 0.

In the results section, native temperate phages (or phage DNAs) obtained just after prophage induction of the lysogenic strains are distinguished from temperate phages (or phage DNAs) obtained after propagation of induced phages in their respective routine hosts.  
20 In the second case, the designation of the temperate phage is followed by that of the CNRZ strain used for propagation, e.g. 0701.CNRZ 1205. The same is true for the 2 virulent phages used in this work for comparative purposes, after propagation in their usual bacterial hosts  
25 ( $\phi$ 17.CNRZ 1596 et  $\phi$ 29.CNRZ 1597).

## Media

Elliker broth and agar (Biokar, Pantin, France), formulated according to Elliker *et al.* (1956), were buffered with 1.9% (w/v) sodium  $\beta$ -glycerophosphate, and supplemented with 10 mM-CaCl<sub>2</sub> (Elliker-Ca<sup>2+</sup>) when specified. These media were routinely used to grow or  
5 plate (colony forming units, CFU) bacteria or to propagate and count (plaque forming units, PFU) phages as previously described (Accolas & Spillmann, 1979). M17 broth or agar (Terzaghi & Sandine, 1975) was used instead of Elliker media for strain CNRZ 1707, which grew poorly in the latter.

## Induction of lysogenic strains and screening for indicator strains

Each strain of the CNRZ collection was treated with MC (Sigma, St. Louis, Mo, USA) at 0.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in Elliker-Ca<sup>2+</sup> broth as previously described (Cluzel *et al.*, 1987). After 5 h, cultures were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore membranes and 0.5 ml of each bacteria-free filtrate was added to an Elliker-Ca<sup>2+</sup> broth culture (10 ml) of each CNRZ strain. These cultures and their corresponding controls without filtrate were incubated and sequentially  
10 subcultured 3 times in order to detect any possible delayed lysis, as previously described (Séchaud *et al.*, 1992).

## Isolation of a prophage-cured derivative of lysogenic strain CNRZ 1205

Strain CNRZ 1205 was induced with MC at 0.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , as described above. After 90, 105, and 120 min of incubation, aliquots of the culture were taken and immediately  
20 diluted 10 and 100 times in Elliker broth in order to avoid phage lysis of the cured cells when they were produced. One hundred  $\mu\text{l}$  aliquots of both dilutions were then spread on plates of Elliker agar, which were incubated at 37°C for 2 d in anaerobiosis jars (BBL, Cockeysville, MD, USA), with Gaspak H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>. Six clones among 70 isolates were found sensitive to temperate phage 01205. One of them was further purified by 3 successive reisolations on  
25 Elliker agar, and retested for its sensitivity to temperate phage 01205 and for its non-inducibility by MC. The cured clone received CNRZ number 1707. As anticipated, both CNRZ

1205 and CNRZ 1707 showed identical hybridization profiles when Southern blots of HaeIII digests of their respective DNA extracts were probed with the DNA-specific probe of Colmin et al. (1991).

#### Propagation, purification and concentration of induced phages

5           Once phages were detected, they were propagated in Elliker-Ca<sup>2+</sup> broth, at 42°C, and then purified 3 times on Elliker-Ca<sup>2+</sup> agar with the standard plaque method. Propagated phages 0701.CNRZ 1205, 01209.CNRZ 701, and 01210.CNRZ 701, which did not form plaques in the conditions used, were purified by 3 successive multiplication steps in Elliker-Ca<sup>2+</sup> broth, according to the limiting-dilution method.

10           The method used to concentrate phages was largely taken from Yamamoto et al. (1970). Initially, an exponentially growing culture of the host strain was infected at a multiplicity of infection (MOI) close to 0.5 and further incubated for 15 min, in order to obtain good phage attachment to the cells. The infected broth was then diluted (1/10) with prewarmed Elliker-Ca<sup>2+</sup> broth and further incubated until lysis occurred, generally after 5-6  
15 h. Cell debris was removed from the culture by low speed centrifugation (2,000 g for 45 min) and phages were precipitated from the supernatant by adding 0.5 M-NaCl and 10% (w/v)-polyethylene glycol 8000 and leaving at 4°C for 24 h. The phage-containing phase was then sedimented at 4°C by low speed centrifugation, resuspended in 30 ml of TM buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgSO<sub>4</sub>), and kept overnight at 4°C. After a low speed  
20 centrifugation at 4°C (6,000 g for 30 min) to eliminate polyethylene glycol, phages were pelleted by ultracentrifugation (100,000 g for 1 h, at 20°C), and resuspended in 3 ml of TM buffer. They were then concentrated in CsCl gradients as previously described (Séchaud et al., 1992), and finally dialyzed against TM buffer. Phage yields after gradient centrifugation were often poor, due either to insufficient counts of mature phage particles and/or to phage  
25 deterioration. Modifying phage growth conditions and using buffers with higher salt concentrations in order to counteract any detrimental osmotic shock did not enable yields to be significantly improved.



In the case of native temperate phages obtained after induction of their lysogenic hosts with MC, the last step of phage concentration in a CsCl gradient was omitted, and the pelleted phages resuspended in TM buffer were used directly for the extraction of native phage DNA.

### Electron microscopy

Dialyzed phage concentrates were stained with 2% (w/v) uranyl acetate, as previously described (Accolas & Spillmann, 1979), and observed with a Zeiss EM-10 electron microscope operating at 80 kV.

### Host-range

The sensitivity of the 120 CNRZ streptococcal strains to temperate phages was determined in Elliker-Ca<sup>2+</sup> broth. Cultures were infected with phage at an MOI close to 1, and incubated at 37°C. As previously described (Séchaud *et al.*, 1992), the turbidity of phage-infected cultures was compared to that of the corresponding controls without phage at regular intervals by visual examination, and 3 sequential subcultures were systematically prepared when lysis was delayed or did not occur.

### SDS-PAGE

Dialyzed phage concentrates were disintegrated by boiling for 5 min in an equal volume of sample buffer (Laemmli, 1970). The samples were electrophoresed overnight on a 12% polyacrylamide vertical slab gel at 8 mA and stained with Coomassie brilliant blue G250 (Sigma). Two virulent phages of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*,  $\phi$ 17.CNRZ 1596 and  $\phi$ 29.CNRZ 1597, previously described by Benbadis *et al.* (1990) were used as calibration controls.

### Phage and bacterial DNA purification

Phage concentrates were treated with 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> RNase and 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> DNase I (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) for 1 h at 37°C. The preparation was then treated

with 5 mM EDTA, 0.1% SDS, and pronase (Sigma) at 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , at 37°C for 30 min. Proteins were extracted once with Tris-HCl-saturated phenol (pH 8) and once with chloroform-isoamyl alcohol (24/1, v/v). DNA was precipitated at -20°C in the presence of 0.3 M sodium acetate.

5 Bacterial DNA was purified as described by Marmur (1961).

#### Restriction enzyme analysis

Cleavages with restriction enzymes were done according to suppliers' instructions (Life Technologies). Digests were heated at 70°C for 10 min, held in ice, and loaded onto horizontal 0.8% agarose slab gels in TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8).

10 Hind III fragments of lambda DNA were used as molecular size markers.

#### DNA-DNA hybridization

Dot-blot hybridization was done with phage DNA labelled with [ $^{32}\text{P}$ ]- $\alpha\text{dATP}$  with the nick-translation kit (Amersham International, Amersham, England) under stringent conditions. The membrane was washed twice in 2xSSC (0.3 M NaCl, 0.03 M trisodium citrate, pH 7) containing 0.1% SDS at room temperature for 15 min, twice in 1xSSC containing 0.1% SDS at 65°C for 15 min, and finally in 0.1xSSC containing 0.1% SDS at 65°C for 10 min.

20 Restriction fragments of phage DNAs prepared by electrophoresis on agarose gels were blotted on a Hybond N+ membrane (Amersham) with 20xSSC. For the sake of convenience, DNA-DNA hybridization was subsequently performed with the enhanced chemiluminescence (ECL)-direct nucleic acid labelling and detection systems (Amersham) according to suppliers' instructions. Hybridization was done under stringent conditions (6M urea, 42°C) with total linear genomic phage DNA purified with the GeneClean process (Bio 101, La Jolla, CA, USA).

## RESULTS

### Induction of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* strains

Twelve strains among the 120 examined, including 3 isogenic representatives of the type strain (CNRZ 1358, CNRZ1529, and CNRZ 1530), gave a typical bell-shaped growth curve after MC induction, and indicator strains were found in each case (Table 1). Only 9 of the temperate phages were initially detected with specific indicator strains. When new strains subsequently became available, indicators were also found for the 3 remaining temperate phages, 01198, 01200, and 01205. This showed that these 3 phages were also fully active, but by then it was too late to include them in the current comparative study of the other temperate phages. As shown in Table 1, 9 native temperate phages, 0701, 01198, 01200, 01205, 01209, 01210, 01358, 01529, and 01530 were each propagated in only one indicator strain. It is noteworthy that 2 of these indicator strains, CNRZ 701 and CNRZ 1205, were themselves lysogenic. On the other hand, the 3 remaining native temperate phages were able to grow in 4 to 6 indicator strains, either lysogenic or not.

Results of induction were further confirmed by dot-blot hybridization of the 120 bacterial DNAs, using the DNA of temperate phage 01358.CNRZ 1205 as probe. The 12 strains previously found to be MC-inducible were the only ones which gave a strong signal with the probe, and no other lysogenic strain was detected (results not shown). Initially, phage lysis was detected only in broth, and no plaques were produced when MC lysates were tested on indicator lawns in solid medium. After 1 passage in broth, however, 5 temperate phages (0701, 01358, 01598, 01599, and 01601) were found capable of producing lysis plaques on their respective indicator lawns.

The lysogeny of 3 isogenic representatives of the type strain, CNRZ 1358 (NCDO 573, received from the English National Collection of Food Bacteria, Reading, England), CNRZ 1529 (CIP 102303, received from the French Collection of the Institut Pasteur, Paris, France), and CNRZ 1530 (DSM 20617, received from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany) was confirmed, as expected, when their

genome DNA was probed with DNA from 01358.CNRZ 1205, both by dot-blot and Southern blot hybridizations. In the latter case, genomic DNA digests of the 3 strains gave rise to identical hybridization profiles. The fourth isogenic strain, CNRZ 1446 (ATCC 19258, received from the American Type Culture Collection, Rockville, USA) harbored no related prophage but indeed behaved as a derivative of the original NCDO strain, since its hybridization profile was closely related, if not identical, to those of the 3 other isogenic strains when probed with the species-specific DNA probe of Colmin *et al.* (1991) (results not shown). Only 1 of the 3 isogenic phages, 01358, was studied further.

### Morphology

The temperate phages, directly observed after MC induction or examined after propagation in their routine host, possessed isometric heads with hexagonal outlines (45 to 65 nm in diameter) and flexible non-contractile tails (220 to 245 nm in length) (Fig. 1a). A basal plate fitted with a fibre of variable length was occasionally observed at the distal extremity of the tail. Thus, all the phages belonged to Bradley's group B (Bradley, 1967) or to the Siphoviridae family of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Matthews, 1982). As indicated in methods, it was often difficult to obtain good phage preparations after the gradient centrifugation step. In the best cases, the thin upper band containing intact phage particles was accompanied by a larger and lower band where tailless full heads and very rare intact particles were clustered, as illustrated in Fig. 1b for phage 0701. In the worst cases, the upper band was lacking and phage harvest was restricted to tailless full heads. Intact particles in this case were produced only in a non-purified form by ultracentrifugation of phage lysates.

### Phage structural proteins

Due to poor phage yields after CsCl gradient purification, it was impossible to load sufficiently rich and well-standardized samples of temperate phage protein extracts on SDS-PAGE gels. Nevertheless, the protein profiles of temperate phages were relatively consistent with those of virulent phages  $\phi$ 17.CNRZ 1596 or  $\phi$ 29.CNRZ 1597 used as controls (results



not shown). Four phages, 0701.CNRZ 1205, 01209.CNRZ 701, 01210.CNRZ 701, and 01358.CNRZ 1205, possessed 2 major proteins whose sizes were similar to those of phage  $\phi$ 29.CNRZ 1597, with an estimated molecular mass of 32 and 27 kDa, respectively. The 32 kDa protein was the major head protein, since it appeared alone in the protein extract of  
5 tailless particles of phage 0701.CNRZ 1205. The tailless phage preparations of 3 other phages, 01598.CNRZ 1205, 01599.CNRZ 1205, and 01601.CNRZ 1205, on the other hand, enabled only 1 major structural head protein to be characterized, whose size was similar to that of phage  $\phi$ 17.CNRZ 1596, i.e. 43 kDa.

#### Comparative analysis of restriction patterns of temperate phage DNAs.

10 The DNAs of the 10 temperate phages examined were refractory (cut little or not at all) to restriction by endonucleases such as Apal, BamHI or PstI. On the contrary, ClaI, HindIII, EcoRV, and PvuII were usually efficiently active. As an example, Fig. 2 and Table 2 show the 7 different HindIII restriction patterns obtained with the 10 native phage DNAs. HindIII restriction patterns of both phage 01200 and phage 01205 native DNAs were largely  
15 similar (Fig. 2a, lanes 3 and 4). On the other hand, Fig. 2b shows the ClaI restriction pattern of phage 01358 native DNA, which was not cut by HindIII. The estimated genome sizes obtained by the cumulative sum of restriction fragment sizes of a given profile ranged from 40 to 45 kb with at least 2 endonucleases.

20 When the temperate phages were propagated in their usual indicator host strains, their respective DNA restriction profiles were different (Fig. 3) but there was no significant change of DNA size. Temperate phages 01209 and 01210 which exhibited identical restriction profiles with their native DNAs (Fig. 2a, lanes 5 and 6), gave different restriction profiles after propagation in their routine host, lysogenic strain CNRZ 701, but both new profiles were again identical (Fig. 3, lanes 2 and 3). In contrast, the restriction profiles of  
25 temperate phages 01598, 01599, and 01601, which were identical when native phage DNA was examined (Fig. 2a, lanes 7 to 9), were different when phage DNA was examined after propagating the 3 phages in their routine host, lysogenic strain CNRZ 1205 (Fig. 3, lanes 5,

6, and 7, respectively). The DNA restriction profiles of 01598.CNRZ 1205 and 01601.CNRZ 1205 were related, but the corresponding profile of 01599.CNRZ 1205 was very different from them. In addition, it is noteworthy that DNA restriction profiles obtained after propagation in the routine lysogenic host, CNRZ 701 or CNRZ 1205, also differed from the restriction profiles of native phage DNAs obtained after induction of the corresponding prophages 0701 and 01205 (Fig. 2a, lanes 1 and 4). In other words, phage progeny did not result from induction of the resident prophage which would have been triggered by the infecting phage.

#### Phage DNA-DNA hybridization

Several native phage DNAs were used as hybridization probes to further examine the homology of temperate phage DNAs. Initially, ClaI digests of phage 01358 native DNA and HindIII digests of 9 other phage native DNAs (ClaI was used in place of HindIII which did not cut phage 01358 native DNA) were probed with phage 01205 native DNA (Fig. 4.I). Using an order of decreasing homology, phage 01200 native DNA gave a restriction profile similar to that of phage 01205 native DNA and all the restriction fragments strongly hybridized with the probe. Considerable homology was also detected with phage 01198 native DNA (especially with the largest fragments) and with 2 fragments of phage 0701 native DNA. Hybridization was also seen with a large native DNA fragment of phages 01598, 01599, and 01601, but no significant homology was found with native DNAs of phages 01209, 01210, and 01358.

In a second attempt, native DNA of phage 01209 was used to probe the same native DNA digests (Fig. 4.II). As expected, considerable homology was observed with phage 01210 native DNA and, more unexpectedly, with phage 01198 native DNA. Thus, the latter phage occupied a key place, at the boundaries of 2 other DNA homology groups (see Fig. 5).

In a third attempt, native DNA of phage 01601 was used as probe (Fig. 4.III). Strong homology was observed with HindIII native DNA fragments of phages 0701, 01598, and 01599 (the latter 2 restriction profiles were closely related to that of phage 01601 native DNA), and with the ClaI native DNA fragments of phage 01358. In contrast, the native 01601

probe hybridized only to a limited number of HindIII fragments of the other 5 native DNA digests.

In the 2 last attempts, DNA from 2 representatives of virulent phages studied by Benbadis *et al.* (1990),  $\phi$ 17.CNRZ 1596 and  $\phi$ 29.CNRZ 1597, were used as probes. The  $\phi$ 17 probe hybridized only with a large native DNA fragment of phages 01598, 01599, and 01601, and with 2 shorter native DNA fragments of phages 01200 and 01205 (Fig. 4.IV). The  $\phi$ 29 probe, on the other hand (Fig. 4.V), hybridized strongly with several fragments of the native DNA digests of 5 phages, 01198, 01200, 01205, 01209, and 01210. In contrast, only one native DNA fragment of phages 0701 and 01358 furnished a signal with the  $\phi$ 29 probe, and no hybridization was detected with the remaining 3 native phage DNAs, 01598, 01599, and 01601.

In summary, a schematic grouping of the 10 corresponding native temperate phages according to their genomic relationships is shown in Fig. 5.

When the same 3 phage native DNAs (i.e. those of temperate phages 01205, 01209, and 01601) were used to probe DNA digests of temperate phages propagated in their routine hosts, the hybridization patterns were noticeably altered. Thus, the native 01601 probe again hybridized strongly with phage 01598.CNRZ 1205 and phage 01599.CNRZ 1205 DNAs, but hybridized only with a large DNA fragment of phages 0701.CNRZ 1205 and 01358.CNRZ 1205 (results not shown). If the same DNA digests were probed with DNA from phage 01209.CNRZ 701, the hybridization patterns of phages 01209.CNRZ 701 and 01210.CNRZ 701 were again found to be definitely different from those of the other temperate phages examined (results not shown).

#### Phage host-ranges

As indicated in Table 1, we found only a small number of indicator strains that could replicate native temperate phages just after MC induction of the prophage harbored by a lysogenic strain. Depending on the temperate phages detected, this number varied between

1, e.g. native phage 0701, and 6 strains (for native phage 01601). Phages obtained after propagation in indicator strains, however, had a much broader host-range, as shown in Table 3 for the 7 temperate phages studied in detail in this work. Once propagated in their respective indicators, these temperate phages attacked between 11 (phage 01601.CNRZ 1205) and 21 strains (phage 01599.CNRZ 1205).

Host-ranges (Table 3) enabled us to distinguish 2 groups among the 7 temperate phages examined. The first group, PG 1, contained temperate phages 01209 and 01210, replicated in the lysogenic indicator CNRZ 701. Five of the 6 temperate phages clustered in the second group, PG 2, were propagated in the lysogenic indicator CNRZ 1205. As shown in the example of phages 01601.CNRZ 1205 (lysogenic indicator) and 01601.CNRZ 1443 (non-lysogenic indicator), the host-range of the same phage can vary notably, depending on the propagation strain used. It should also be noted that strain CNRZ 1707, a prophage-cured derivative of strain CNRZ 1205, was resistant to all native temperate phages, except for phage 01205 (Table 1), but was sensitive to the corresponding temperate phages once they had been propagated in their routine hosts (Table 3).

In summary, once the 8 temperate phages examined (including phage 01601 twice) were propagated in an indicator strain, they attacked 44 of the 120 CNRZ strains, i.e. close to 37%. These bacterial strains had been isolated between 1957 and 1990 from diverse dairy products and do not constitute a homogeneous set with particular characteristics. As already mentioned, for example, some are lysogenic.

## DISCUSSION

We have shown that 12 of the 120 CNRZ strains examined (apparent frequency 10%) were lysogenic and released active temperate phages after induction with MC. This was confirmed by probing bacterial genomes with labeled phage DNA. If we refer to prior work in this area, substantial variations are seen. Thus, Smaczny (1983) found 6 lysogenic strains inducible by MC among the 24 strains examined, all isolated from raw milk, i.e. 25%. Neve *et al.* (1990) detected 2 lysogenic strains after probing the chromosomal DNAs of 17 strains



with DNA from virulent phages, i.e. close to 12%. Finally, Carminati & Giraffa (1991) obtained only 1 MC-inducible lysogenic strain among 45 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* strains, i.e. close to 2%. These variations probably result from the size of the samples examined and the variable diversity of the constitutive strains, as well as from the methods used by the different authors.

Inducible temperate phages were propagated with varying ease in indicator strains, with the exception of one, temperate phage 01205. This phage could be propagated only on a prophage-cured strain, CNRZ 1707, derived from the corresponding lysogenic strain, CNRZ 1205. Some of these lysogenic strains were also shown to be good indicators for other temperate phages, e.g. strains CNRZ 701 or CNRZ 1205, which thus belong to immunity groups different from those of prophages harbored by the lysogenic indicators. More generally, these lysogenic strains are also good propagation strains for a large number of virulent phages (unpublished results). We have observed that the host-range of temperate phages propagated in their respective indicator strains was richer in sensitive strains than those of native temperate phages, just after induction. In most cases, lysogeny thus does not result in a notable increase of phage resistance of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*.

The morphology of these temperate phages was similar to that of virulent phages previously examined by different authors (Accolas & Spillmann, 1979; Krush *et al.*, 1987; Prévots *et al.*, 1989; Benbadis *et al.*, 1990). They all belonged to Bradley's group B (1967) or to the *Siphoviridae* family of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Matthews, 1982). Some of these phages were fragile and could not easily be purified intact by CsCl density gradient centrifugation, as previously observed by Neve *et al.* (1989) for virulent phages. The sizes of the major structural proteins of these phages were comparable to those of phages studied previously and, for example, enabled the phages to be placed in one of the 2 protein groups proposed by Benbadis *et al.* (1990) for the virulent phages they studied.

Concerning phage genomes, we have shown the existence of a homology, strong or weak depending on the case, between the various temperate phages examined. The same

was true when temperate phages were compared to virulent phages. This is a reflection of genomic relationships between all the phages studied. The DNA restriction profiles of native temperate phages enabled subdivisions to be established but they did not perfectly overlap those obtained with the 2 protein profiles. For example, the protein sizes of phage 0701.CNRZ 1205, of phages 01209.CNRZ 701 and 01210.CNRZ 701 and, finally, of phage 01358.CNRZ 1205 were comparable but they had 3 different restriction profiles.

One important result of this work is that the passage of a native temperate phage in a lysogenic indicator strain affects the characteristics and behavior of the phage. For example, the phage DNA profile is substantially altered and the host range of the phage thus propagated includes a larger number of strains than that of the native temperate phage. This could result from a genome rearrangement in the infecting temperate phage, once inside the indicating cells in contact with the resident prophage. This makes it possible to speculate on the genome variability that could generate this mechanism, as did Mercenier (1990), who attributed the variability of thermophilic streptococcal phages observed by other authors to frequent modular exchanges between the different phage genomes. It is nonetheless indispensable to first confirm the preliminary observations reported here by a careful analysis of the modalities of such a genome rearrangement, in the case of one or several of these temperate phages.

Most lysogenic strains of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* detected until the present have been found in raw milk (Smaczny, 1983), in mixed-strain starters used for cheese making (e.g. Kurmann, 1979 and the CNRZ strains of the present work from the Jura mountains), and in artisan yogurts [e.g. the Greek strains of the present work, isolated in Crete (Zourari, 1991)]. It should also be remembered that the type strain NCDO 573, lysogenic, was isolated from pasteurized milk in England. This suggests that lysogenic strains of *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* are naturally relatively frequent and so could play a determinant role in the appearance and spread of phages, in particular in dairy plants poorly protected against phage attacks. These lysogenic strains may be both a source of phages and a privileged target for virulent phages, since they were often good indicators. For

example, we may imagine that lysogenic strains of Str. salivarius subsp. thermophilus arising from raw milk participate actively in the establishment of phage infection cycles in the dairy factories, according to modalities analogous with those described by Heap & Lawrence (1988) for the phage infection cycle of lactococci.

5            This work is dedicated to the memory of Germain Mocquot, creator and legendary leader of French Dairy Research, who passed away in March 1989. We are indebted to Micheline Rousseau who efficiently conducted the electron microscopy examination of our phages. Catherine Colmin and Laurent Benbadis are gratefully acknowledged for the kind gift of the species-specific DNA probe from Str. salivarius subsp. thermophilus and of virulent  
10 phages  $\phi$ 17 and  $\phi$ 29, respectively. The work was financially supported, in part, by the EC contract Nr. AGRE. 0064

## REFERENCES

- ACCOLAS, J.-P. & SPILLMANN, H. 1979. The morphology of six bacteriophages of Streptococcus thermophilus. Journal of Applied Bacteriology **47** 135-144
- 5 AUCLAIR, J. & ACCOLAS, J.-P. 1983. Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry. Antonie van Leeuwenhoek **49** 313-326
- BENBADIS, L., FAELLEN, M., SLOS, P., FAZEL, A. & MERCENIER, A. 1990. Characterization and comparison of virulent bacteriophages of Streptococcus thermophilus isolated from yogurt. Biochimie **72** 855-862
- 10 BRADLEY, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriological Reviews **33** 230-314
- CARMINATI, D. & GIRAFFA, G. 1992. Evidence and characterization of temperate bacteriophage in Streptococcus salivarius subsp. thermophilus St18. Journal of Dairy Research **59** 71-79
- 15 CIBLIS, E. 1970. [Characterization of a bacteriophage of Streptococcus thermophilus]. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Abt. II **125** 541-554
- CLUZEL, P.-J., VEAUX, M., ROUSSEAU, M. & ACCOLAS, J.-P. 1987. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of Lactobacillus bulgaricus. Journal of Dairy Research **54** 397-405
- 20 COLMIN, C., PEBAY, M., SIMONET, J.M. & DECARIS, B. 1991. A species-specific DNA probe obtained from Streptococcus salivarius subsp. thermophilus detects strain restriction polymorphism. FEMS Microbiology Letters **81** 123-128
- DEANE, D.D., NELSON, F.E., RYSER, F.G. & CARR, P.H. 1953. Streptococcus thermophilus bacteriophage from Swiss cheese whey. Journal of Dairy Science **36** 185-191



ELLIKER, P.R., ANDERSON, A.W. & HANNESSON, G. 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. Journal of Dairy Science **39** 1611–1612

5 HEAP, H.A. & LAWRENCE, R.C. 1988. Culture systems for the dairy industry. In Developments in food microbiology Vol.4 pp. 149–185 (Ed. R.K. Robinson) London: Elsevier Applied Science

KIURU, V.J.T. & TYBECK, E. 1955. Characteristics of bacteriophages active against lactic acid bacteria in Swiss cheese. Suomen Kemistilehti B **28** 57–62

10 KRUSCH, U., NEVE, H., LUSCHEI, B., & TEUBER, M. 1987. Characterization of virulent bacteriophages of Streptococcus salivarius subsp. thermophilus by host specificity and electron microscopy. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **39** 155–167

KURMANN, J.L. 1979. [Insufficient acid production due to bacteriophages in hard cheese manufacture]. Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung **8** 71–76

15 KURMANN, J.L. 1983. [Liberation by penicillin of bacteriophages from thermophilic lactic acid bacteria, a hidden cause of phage-induced acidification troubles]. Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung **12** 39–43

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) **227** 680–685

20 LARBI, D., COLMIN, C., ROUSSELLE, L., DECARIS, B. & SIMONET, J.M. 1990. Genetic and biological characterization of nine Streptococcus salivarius subsp. thermophilus bacteriophages. Lait **70** 107–116

MARMUR, J. 1961. A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of Molecular Biology **3** 208–218

MATTHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology **17** 1–200

MERCENIER, A. 1990. Molecular genetics of Streptococcus thermophilus. FEMS Microbiology Reviews **87** 61–78

5 NEVE, H., KRUSCH, U. & TEUBER, M. 1989. Classification of virulent bacteriophages of Streptococcus salivarius subsp. thermophilus isolated from yoghurt and Swiss-type cheese. Applied Microbiology Biotechnology **30** 624–629

NEVE, H., KRUSCH, U. & TEUBER, M. 1990. Virulent and temperate bacteriophages of thermophilic lactic acid streptococci. FEMS Microbiology Reviews **87** P58.

10 PREVOTS, F., RELANO, P., MATA, M. & RITZENTHALER, P. 1989. Close relationship of virulent bacteriophages of Streptococcus salivarius subsp. thermophilus at both the protein and the DNA level. Journal of General Microbiology **135** 3337–3344

SECHAUD, L., ROUSSEAU, M., FAYARD, B., CALLEGARI, M.L., QUENEE, P. & ACCOLAS, J.-P. 1992. Comparative study of 35 bacteriophages of Lactobacillus helveticus: Morphology and host range. Applied Environmental Microbiology **58** 1011–1018

15 SMACZNY, T. 1983. [Acidification disturbance in manufacture of yogurt and Bioghurt caused by bacteriophages and bacteriocins]. Thesis, Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität, Bonn, Germany

20 SMACZNY, T. & KRÄMER, J. 1984. [Acidification disturbance in manufacture of yogurt, Bioghurt<sup>R</sup> and Biogarde<sup>R</sup> caused by bacteriocins and bacteriophages of Streptococcus thermophilus. II. Distribution and characterization of bacteriophages]. Deutsche Molkerei-Zeitung **105** 614–618

TERZAGHI, B.E. & SANDINE, W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology **29** 807–813

25 YAMAMOTO, K.R., ALBERTS, B.M., BENZINGER, R., LAWHORNE, L. & TREIBER, G. 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. Virology **40** 734–744

ZOURARI, A. 1991. [Characterization of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Greek artisan yogurts]. Doctoral Thesis, Institut National Agronomique Paris-Grignon, France.

ZOURARI, A., ACCOLAS, J.-P. & DESMAZEAUD, M.J. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait* 72 1-33

Table 1. Lysogenic strains and their prophages found in the present work

Strains (CNRZ code)	Prophage	Synonyms <sup>a</sup> , origin	Indicator strains <sup>c</sup> (CNRZ code)
701	0701	Finnish emmenthal cheese starter, early 1950s. Received from E. Tybeck (Helsinki), in 1974.	<u>1205</u>
1198	01198	Traditional Greek yogurt, 1987	<u>1597</u>
1200	01200	Traditional Greek yogurt, 1987	<u>1597</u>
1205	01205	Traditional Greek yogurt, 1987	<u>1707<sup>d</sup></u>
1209	01209	Traditional Greek yogurt, 1987	<u>701</u>
1210	01210	Traditional Greek yogurt, 1987	<u>701</u>
1358	01358	NCDO 573 <sup>b</sup> , type strain. Pasteurized milk, England, c.1947	<u>1205</u>
1529	01529	CIP 102303 <sup>b</sup> , type strain	<u>1205</u>
1530	01530	DSM 20617 <sup>b</sup> , type strain	<u>1205</u>
1598	01598	Artisan gruyère cheese starter, Jura district, France, 1959	1200, <u>1205</u> , 1400 & 1600
1599	01599	Artisan gruyère cheese starter, Jura district, France, 1959	1200, <u>1205</u> , 1400, 1443, & 1600
1601	01601	Artisan gruyère cheese starter, Jura district, France, 1959	1200, <u>1205</u> , 1237, 1400, 1443 & 1600

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection; CNRZ, French Collection of Lactic Acid Bacteria; DSM, German Collection of Microorganisms; CIP Institut Pasteur Collection of Microorganisms; NCDO National Collection of Dairy Organisms.

<sup>b</sup> By contrast with the 3 other representatives of the type strain examined, strain CNRZ 1446 (ATCC 19258) did not harbour any prophage (see text).

<sup>c</sup> The indicator strains subsequently used for routine propagation of temperate phages are underlined.

<sup>d</sup> Prophage-cured derivative of lysogenic strain CNRZ 1205



Table 2. Restriction patterns of HindIII digests of native DNAs from the 10 temperate phages examined\*

Pattern	1	2	3	4	5	6	7
Phage	0701	01198	01200	01205	01209 01210	01598 01599 01601	01358+

\*See the restriction patterns of Fig.2

+HindIII does not cut phage 01358 DNA

Table 3. Host-ranges of 7 temperate phages after propagation in indicator hosts

Phage	Indicator host (CNRZ code)*	Sensitive strains (CNRZ code)*	Phage group+
0701	<u>1205</u>	368 390 391 758 761 782 1157 <u>1200 1205 1209</u> <u>1210</u> 1447 1592 1707	PG2
01209	<u>701</u>	312 <u>701</u> 783 784 1068 1197 1208 1524 <u>1598 1599</u> <u>1601</u> 1707	PG1
01210	<u>701</u>	Same as those for phage 01209	PG1
01358	<u>1205</u>	368 406 <u>701</u> 758 782 1157 <u>1200 1205</u> 1447 <u>1598</u> <u>1599 1601</u> 1707	PG2
01598	<u>1205</u>	758 761 782 887 888 1157 <u>1198 1200 1205 1209</u> <u>1210</u> 1400 1447 1592 <u>1599 1600 1601</u> 1707	PG2
01599	<u>1205</u>	366 368 390 391 409 410 461 756 757 758 782 887 1068 1157 <u>1200 1205 1209 1210</u> 1447 <u>1529</u> 1707	PG2
01601	<u>1205</u>	368 758 1157 <u>1198 1200 1205</u> 1443 1447 <u>1530</u> 1600 1707	PG2
01601	1443	405 748 757 887 <u>1200 1205</u> 1237 1400 1443 <u>1529</u> 1600 1707	PG2

\* CNRZ: acronym of the French Collection of Lactic Acid Bacteria. Lysogenic strains are underlined.

+ See text.

## Figure legends

Fig. 1. Electron micrographs of temperate phage 0701.CNRZ 1205. **a)** Intact particles from the upper band of the CsCl gradient. Small base plates and short fibres present at the distal ends of the tails are arrow-headed **b)** Tailless particles from the lower band. Some rare intact particles are arrow-headed. Bar: 100 nm.

Fig. 2. Restriction patterns of native DNAs from 10 temperate phages. **a)** *Hind*III digests: lanes **1**, 0701; **2**, 01198; **3**, 01200; **4**, 01205; **5**, 01209; **6**, 01210; **7**, 01598; **8**, 01599; **9**, 01601. **b)** *Cla*I digest of 01358.

Fig. 3. *Hind*III restriction patterns of DNAs from temperate phages after propagation in their routine hosts: **lanes 1**, 0701.CNRZ 1205; **2**, 01209.CNRZ 701; **3**, 01210.CNRZ 701; **4**, 01358.CNRZ 1205; **5**, 01598.CNRZ 1205; **6**, 01599.CNRZ 1205; **7**, 01601.CNRZ 1205.

Fig. 4. Genome relationships of 10 native temperate phages. Southern blots (Fig. 2) were successively hybridized with the following ECL-labelled DNA probes: **I)** native 01205; **II)** native 01209; **III)** native 01601; **IV)** virulent  $\phi$ 17.CNRZ 1596; **V)** virulent  $\phi$ 29.CNRZ 1597. **Lanes:** see legend of Fig. 2.

Fig. 5. Schematic representation of the genome relationships found in the 10 native temperate phages examined. Phages in the same circle are closely related. Homology is weaker between phages of 2 intersected circles.

Fig 1

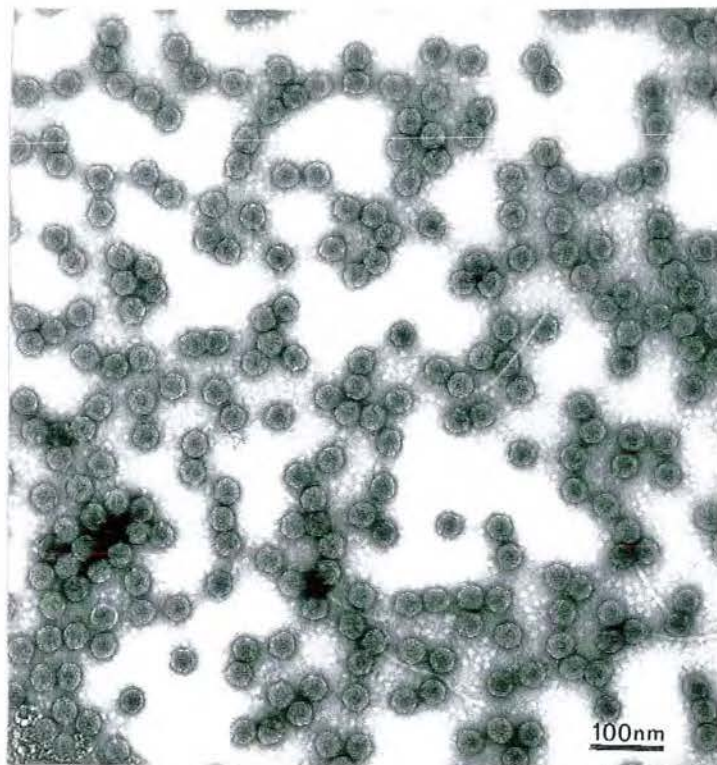
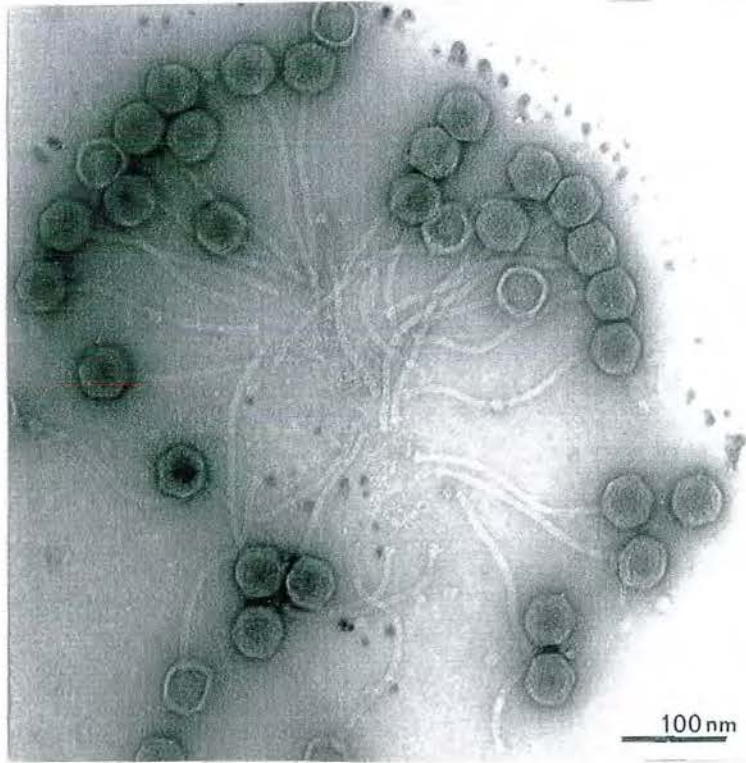




Fig. 2.

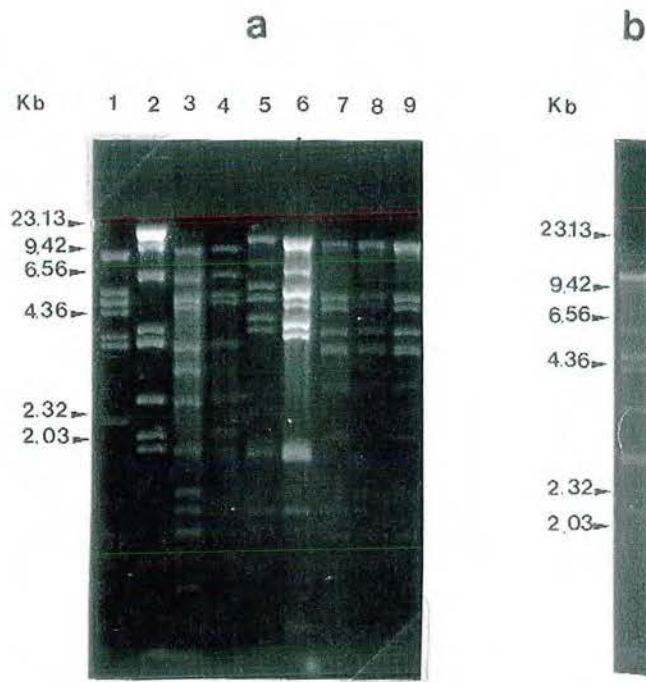


Fig- 3.

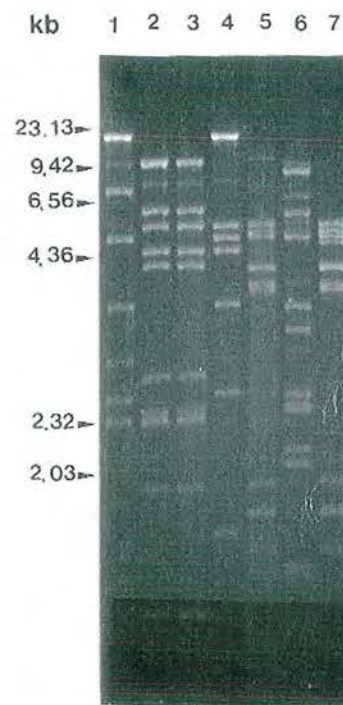


Fig. 4.

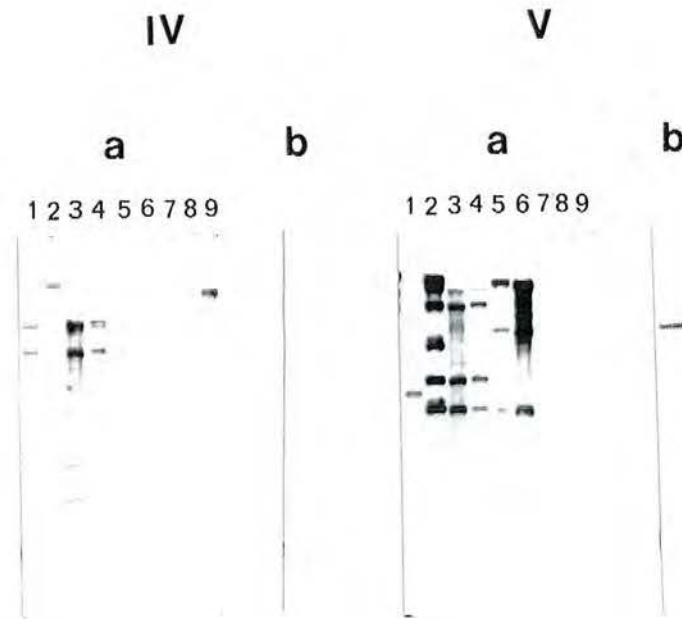
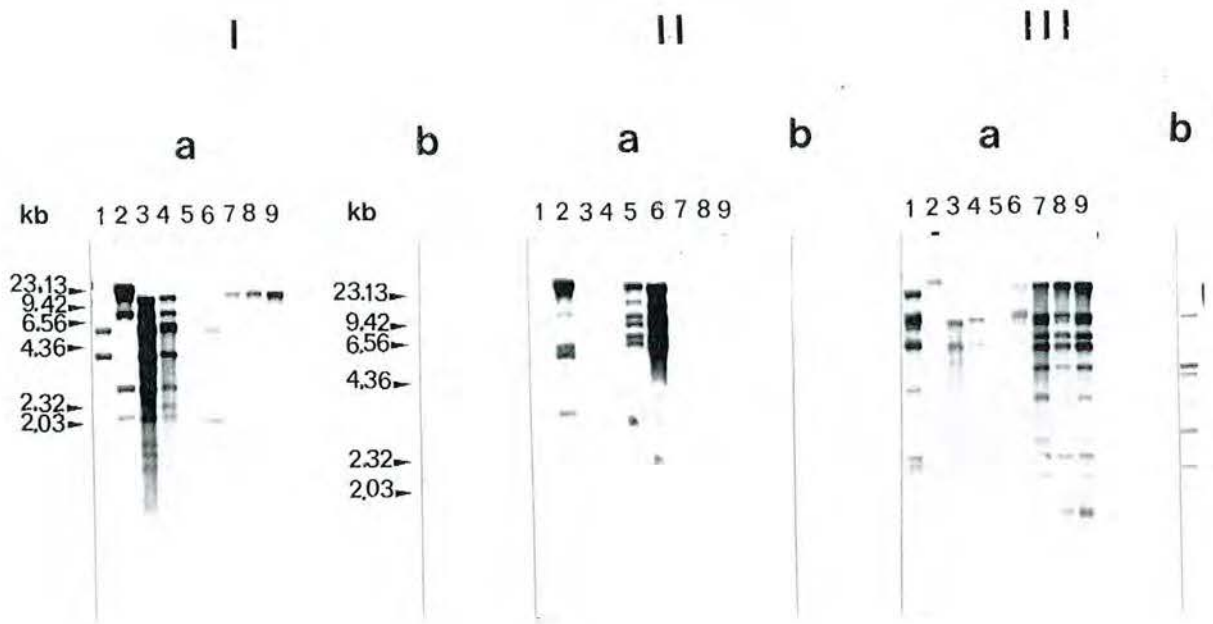
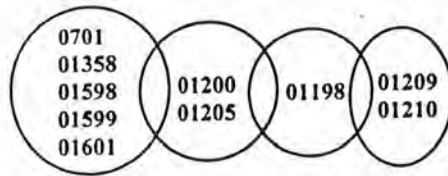


Fig. 5





# UNIVERSITE DE NANCY I

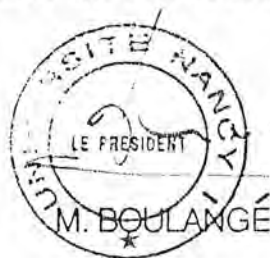
NOM DE L'ETUDIANT : Mademoiselle FAYARD Blandine

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I  
en GENETIQUE MOLECULAIRE

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 14 JAN. 1993 n°20

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I





## RESUME

Douze des 118 souches de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* de la collection CNRZ présentent une phase lytique après induction avec la mitomycine C et contiennent des phages actifs. Les phages tempérés correspondants ont été multipliés sur des souches indicatrices et comparés à 56 phages isolés comme lytiques. Toutes les souches lysogènes se caractérisent par des propriétés autolytiques, dans certaines conditions de cultures. Du point de vue morphologique, les 69 phages étudiés, tempérés ou virulents, appartiennent tous au groupe B de la classification de Bradley (1967) ou à la famille des Siphoviridae de l'International Committee on Taxonomy of Viruses (Matthews, 1982). Les profils protéiques des virions sont de 2 types. Les ADN phagiques sont pour la plupart linéaires, avec des extrémités cohésives et leur taille varie de 35 à 50 kb. Ils présentent un polymorphisme de restriction important. De l'homologie existe entre tous les ADN phagiques, en particulier entre les ADN des phages tempérés et ceux des phages virulents. L'étude des interactions phages-bactéries a montré que certaines des souches lysogènes sont sensibles aux surinfections par de nombreux phages et que ces souches remanient alors le génome des phages infectants. Les résultats obtenus suggèrent que les souches lysogènes de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* pourraient jouer un rôle majeur dans la genèse des infections phagiques et dans l'évolution de la population phagique spécifique de ce streptocoque.

**Mots clés:** *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, prophage, phage, autolyse

## ABSTRACT

Twelve of the 118 strains of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* of the CNRZ collection exhibited a lytic phase after mitomycin C induction and contained active phages. The corresponding temperate phages were multiplied on indicator strains and compared to 56 phages isolated as lytic. All lysogenic strains were characterized by autolytic properties in certain conditions of culture. Morphologically, the 69 temperate or virulent phages studied all belonged to Bradley's (1967) group B, or to the family of the Siphoviridae of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Matthews, 1982). There were 2 types of virion protein profiles. Most phage DNA were linear with cohesive ends, and size varied from 35 to 50 kb. There was considerable restriction polymorphism. Homology existed among all phage DNA, in particular between the DNA of temperate phages and those of virulent phages. The study of phage-bacteria interactions showed that some lysogenic strains were sensitive to superinfections by numerous phages and that in this case, these lysogenic strains rearranged the genome of infecting phages. The results suggest that lysogenic strains of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* could play a major role in the genesis of phage infections and in the evolution of the phage population specific to this streptococcus.

**Key words:** *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, prophage, phage, autolysis.