

50376
1976
157

N° d'ordre : 608

50376
1976
157

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

Jean-Pierre HORNEZ

**ETUDE DES VOIES DE DEGRADATION DU GLUCOSE
ET DU FRUCTOSE CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI**



Soutenu le 25 Octobre 1976, devant la COMMISSION D'EXAMEN

MM.	J.B. GUILLAUME	Président
	J.C. DERIEUX	Rapporteur
	B. FOURNET	} Examineurs
	J. KREMBEL	

Ce travail a été effectué au laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE sous la direction de Messieurs les Professeurs GUILLAUME et DERIEUX.

Leurs précieux conseils ont permis l'orientation et la réalisation de ce travail. Nous leur exprimons notre profonde gratitude.

Nous avons toujours trouvé auprès de Monsieur FOURNET toute aide et disponibilité sans limites malgré les nombreuses occupations qui l'assailent. Nous le remercions vivement d'avoir voulu juger cette thèse.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur KREMBEL pour l'amabilité avec laquelle il a accepté de participer à ce jury.

Enfin nous adressons toute notre reconnaissance à tous ceux, collègues et amis, qui, à divers titres, nous ont apporté régulièrement aide et sympathie.

Que plus particulièrement, Monsieur COURTOIS soit remercié. Sa collaboration scientifique et ses qualités humaines favorisent l'esprit d'équipe.

S O M M A I R E

AVANT-PROPOS	1
I - INTRODUCTION	5
A - LE METABOLISME DES HYDRATES DE CARBONE CHEZ RHIZOBIUM =====	7
1) <u>Nature des sources de carbone utilisées par Rhizobium</u>	7
2) <u>Les voies de dégradation des hydrates de carbone suivies par Rhizobium</u>	8
3) <u>Les voies de dégradation particulières à Rhizobium meliloti</u>	13
4) <u>Nature des polymères carbonés synthétisés par Rhizobium</u>	16
B - LE PROBLEME POSE PAR LE METABOLISME DU GLUCOSE CHEZ RHIZOBIUM =====	16
MELILOTI =====	
1) <u>La composition chimique de l'exopolyoside de Rhizobium meliloti</u>	17
2) <u>La production d'exopolyosides par Rhizobium meliloti, en fonction de la source de carbone</u>	17
a. <u>production de polyosides lors de la croissance de la souche</u>	17
α. sur milieu solide	17
β. sur milieu liquide	18
b. <u>production de polyosides par des cellules mises en con- ditions de non prolifération</u>	20
C - CONCLUSION ET PLAN DU TRAVAIL =====	21

II - ETUDE METABOLIQUE DE <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u> EN PRESENCE DE DIFFERENTS SUBSTRATS CARBONES	23
A - MATERIEL ET METHODES	23
=====	
1) <u>Les milieux de culture</u>	23
a. <u>le milieu de Wright</u>	23
b. <u>le milieu RC</u>	24
c. <u>le tampon RN⁻</u>	24
2) <u>Les souches utilisées</u>	25
3) <u>Les conditions de culture et les contrôles physiques</u>	26
4) <u>Les conditions d'incubation en non prolifération</u>	26
B - RESULTATS	28
=====	
1) <u>Evolution de la croissance et du pH lors de la culture de la souche MSN1 en présence de différents hydrates de carbone</u>	28
a. <u>choix du milieu RC</u>	28
b. <u>croissance comparée en présence de glucose ou de fructose</u>	29
c. <u>évolution du pH lors de la croissance en présence de glucose, mannose, fructose ou mannitol</u>	30
2) <u>Evolution de la croissance et du pH des souches de Rhizobium meliloti cultivées en présence de glucose ou de fructose</u>	31
3) <u>Evolution du pH des souches de Rhizobium meliloti mises en conditions de non prolifération en présence de glucose ou de fructose</u>	34
C - CONCLUSION	
=====	
III - MISE EN EVIDENCE D'UN CYCLE DE KREBS ACTIF CHEZ <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u>	37

A - MATERIEL ET METHODES	37
=====	
1) <u>Conditions d'aérobiose et d'anaérobiose lors d'incubation en non prolifération</u>	37
2) <u>Mesures des échanges gazeux respiratoires</u>	38
a. <u>principes généraux</u>	38
b. <u>conditions expérimentales</u>	39
3) <u>Mesure de la croissance bactérienne au biophotomètre</u>	41
B - RESULTATS	42
=====	
1) <u>Absence d'un métabolisme fermentatif</u>	42
2) <u>Mesures de l'oxydation du glucose et du fructose en appareil de Warburg</u>	43
3) <u>Problèmes liés à la respiration endogène de Rhizobium meliloti</u>	44
a. <u>consommation d'oxygène lors de la respiration endogène</u>	45
b. <u>évolution du taux de consommation d'oxygène en fonction du temps de conservation des cellules</u>	47
c. <u>variabilité des coefficients respiratoires selon les lots de fabrication</u>	48
4) <u>Respiration de Rhizobium meliloti à partir de différents intermédiaires du cycle de Krebs</u>	49
a. <u>respiration sur pyruvate de sodium</u>	49
b. <u>respiration sur succinate de sodium</u>	52
c. <u>respiration sur αcéto-glutarate de sodium</u>	55
d. <u>respiration sur glyoxylate de sodium</u>	57
e. <u>conclusion</u>	58
5) <u>Croissance sur différents intermédiaires du cycle de Krebs</u>	58
a. <u>croissance sur milieu complet</u>	59
b. <u>croissance sur milieu minimum</u>	59
C - CONCLUSION	60
=====	

IV - IDENTIFICATION DE LA FRACTION ACIDE S'ACCUMULANT EN PRESENCE DE GLUCOSE	62
A - MATERIEL ET METHODES =====	62
1) <u>Préparation et purification de la fraction acide</u>	62
a. <u>préparation de la fraction acide</u>	62
b. <u>purification de la fraction acide</u>	63
α. élimination du polyoside	63
β. élimination des ions phosphates	64
2) <u>Méthodes d'identification</u>	64
a. <u>séparation électrophorétique</u>	65
b. <u>séparation chromatographique</u>	66
α. chromatographie de partage sur papier	66
β. chromatographie d'adsorption sur gel de silice	67
c. <u>fabrication des dérivés 2-4 dinitrophénylhydrazones</u>	67
d. <u>fabrication des dérivés méthyl -esters</u>	68
e. <u>fabrication des dérivés quinoxalinols</u>	69
B - RESULTATS =====	70
1) <u>Mise en évidence d'une substance à comportement électrophoré- tique et chromatographique identique à celui de l'acide 2 céto- gluconique</u>	70
a. <u>électrophorèses</u>	70
b. <u>chromatographies</u>	72
2) <u>Identification de la 2-4 dinitrophénylhydrazone de l'acide 2 céto-gluconique</u>	74
3) <u>Points de fusion des dérivés méthyl -esters de l'acide 2 céto- gluconique et de notre fraction acide</u>	76
4) <u>Identification du 3 tétrahydroxybutylquinoxalinol</u>	77
C - CONCLUSION =====	80

V - ASPECTS PARTICULIERS DE L'UTILISATION DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE CHEZ <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u>	82
A - MATERIEL ET METHODES =====	83
1) <u>Utilisation des radioisotopes lors du bilan de la respiration en présence d'oses</u>	83
2) <u>Dosage du glucose par la glucose oxydase</u>	83
3) <u>Dosage de l'acide 2 céto-gluconique</u>	83
4) <u>Recherche d'activités enzymatiques</u>	83
a. <u>préparation d'extraits cellulaires</u>	83
b. <u>dosage des protéines totales</u>	84
c. <u>recherche des activités deshydrogénases</u>	84
α. recherche de la glucose deshydrogénase	84
β. recherche de la gluconate deshydrogénase	84
B - RESULTATS =====	84
1) <u>Mesure de la croissance de Rhizobium meliloti en présence de glucose ou de fructose</u>	84
a. <u>mesure de la croissance en présence de glucose ou de fruc- tose à la concentration de 1 %</u>	84
b. <u>mesure de la croissance et de la variation du pH en pré- sence de glucose à différentes concentrations</u>	87
2) <u>Mesure de la respiration de Rhizobium meliloti en présence de glucose, fructose, gluconate et 2 céto-gluconate</u>	88
a. <u>comparaison des courbes de consommations d'oxygène en présence de glucose ou de fructose</u>	88
b. <u>bilan de la respiration de Rhizobium meliloti sur glucose et sur fructose</u>	93
c. <u>mesure de la respiration en présence de gluconate et de 2 céto-gluconate</u>	94
3) <u>Courbes de disparition du glucose en fonction de sa concen- tration initiale</u>	95
4) <u>Etude de la formation de l'acide 2 céto-gluconique en fonction</u>	

<u>du pH initial des milieux réactionnels</u>	97
5) <u>Recherche d'activités enzymatiques spécifiques de la voie du 2 céto-gluconique</u>	98
a. <u>mise en évidence d'une activité glucose-deshydrogénase</u>	98
b. <u>mise en évidence d'une activité gluconate-deshydrogénase</u>	101
C - <u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u> =====	103
VI - CONCLUSION GENERALE	105
VII - BIBLIOGRAPHIE	

AVANT PROPOS

L'association symbiotique des souches du genre Rhizobium avec les plantes de la famille des Légumineuses se traduit par la fixation de l'azote atmosphérique.

Depuis des temps très anciens, l'assimilation de l'azote par voie biologique joue un rôle prédominant en agriculture. L'utilisation empirique des Légumineuses en tant qu'engrais verts précède de beaucoup la démonstration scientifique de HELLRIEGEL et WILFORTH, 1888 [53] de l'activité fixatrice d'azote des nodules racinaires.

Cette découverte laisse perplexe un certain nombre de chimistes de l'époque mais n'empêche pas WILEY dès 1894 [129] de prédire de façon très optimiste devant la Société de Chimie Américaine que "la mort de l'humanité ne viendra pas de la faim mais du retour de la glaciation... et qu'il défilera encore plusieurs ères géologiques avant que la planète ne meure de froid."

D'autres observations [56,126,128] viennent confirmer dès le début du siècle les travaux de HELLRIEGEL et de son collaborateur.

La symbiose Rhizobium-Légumineuse joue donc un rôle déterminant dans la réalisation du cycle de l'azote dans la nature, et de ce fait, possède un double intérêt :

- un intérêt scientifique dans la mesure où la réduction enzymatique de l'azote gazeux représente une voie métabolique particulière mais fondamentale.

- un intérêt économique en agronomie où elle permet une limitation sinon une suppression de l'emploi des engrais azotés ainsi qu'une augmentation des rendements. Peut-être pouvons-nous entrevoir à ce niveau une solution pour combler en partie le déficit protéique mondial ?

La possibilité de renouveler cette symbiose en laboratoire permet aujourd'hui de déterminer avec plus de facilité et de précision les différentes étapes de cette association et de mettre à jour les lois qui la régissent. Trois grands secteurs de la science fondamentale y participent : la physiologie végétale et bactérienne, la biochimie et la génétique.

Le processus de nodulation des Légumineuses est commun et peut être traduit simplement : la bactérie du genre *Rhizobium* pénètre spécifiquement le tissu racinaire de la plante hôte et s'y propage par l'intermédiaire d'un cordon infectieux [41, 48, 105, 106]. Sa libération dans le cytoplasme des cellules végétales s'accompagne de sa transformation progressive en bactéroïde [23, 61]. Entouré d'une membrane de séquestration [30, 46, 72] et noyé dans une solution de leghémoglobine [10, 121], il possède la totalité du potentiel enzymatique pour la réduction de l'azote atmosphérique [8, 11] qu'il effectue par l'intermédiaire de la nitrogénase [11, 74].

Nous avons montré d'ailleurs l'existence de membranes intracytoplasmiques surnuméraires, parallèles aux structures pariétales des cellules bactériennes et qui pourraient être le support de chaînes d'oxydations cellulaires particulières assurant cette fixation de l'azote [57].

D'une façon générale, les modifications biochimiques intervenant dans les cellules bactériennes au cours de l'infection des tissus racinaires sont très étudiées et en grande partie élucidées ainsi que les chaînes

enzymatiques fonctionnant à partir de l'azote gazeux. Les résultats sont rapportés dans de nombreuses revues générales [9,29,31,40,43].

Par contre, les problèmes liés à la spécificité d'hôte et aux mécanismes de l'infection restent encore très obscurs.

Cependant, de nombreux auteurs ont récemment attribué aux exopolyosides synthétisés par les cellules de *Rhizobium* un rôle important en plus de la protection des souches dans le sol [118]. En effet, ils pourraient être à la base du code de reconnaissance bactérie-plante par l'intermédiaire de phytoagglutinines se trouvant à la surface des racines de toutes les légumineuses [49,120]. D'autres auteurs décrivent l'induction de la courbure des poils absorbants par ces polymères [59] ou encore l'induction d'enzymes hydrolysant la paroi des cellules végétales [83] ou même la transformation d'une souche avirulente en souche virulente [82].

Aujourd'hui les exopolyosides sont régulièrement reliés aux mécanismes d'infection de la plante et à la spécificité de la relation *Rhizobium*-Légumineuses.

Dans ce cadre, le laboratoire s'intéresse d'une façon générale aux exopolyosides des souches, représentantes de tous les groupes d'inoculation, du point de vue de leur composition chimique [20] et de leur physiologie de synthèse.

Etant donné la réponse différente de l'apparition de ces biopolymères en fonction de la nature de la source carbonée et le rôle soupçonné de cette dernière au niveau de la régulation cellulaire,

nous avons été amené à étudier le métabolisme comparatif de certains oses par le genre Rhizobium.

I

I N T R O D U C T I O N

I. INTRODUCTION

Selon PREVOT [109], Rhizobium représente le genre unique de la tribu des Rhizobieae, appartenant à la famille des Protobacteriaceae de l'ordre des Bacteriales.

Chaque espèce est définie par rapport à un ensemble de Légumineuses qu'elle infecte spécifiquement et avec lequel elle entretient des relations symbiotiques se traduisant par la fixation de l'azote atmosphérique.

On distingue chez Rhizobium deux groupes différenciés sur la base de leur vitesse de croissance respective (Tableau 1).

CROISSANCE	GENRE	ESPECE	GROUPE D'INOCULATION
l e n t e	Rhizobium	japonicum	Soja
	"	lupini	Lupin
	"	du "Cowpea-group"	Cowpea
r a p i d e	"	leguminosarum	Pois
	"	meliloti	Luzerne
	"	phaseoli	Haricot
	"	trifolii	Trèfle

Tableau 1 : Taxonomie du genre Rhizobium.

Les Rhizobia sont des chimiorganotrophes dont la température maximale de croissance varie de 25°C à 30°C selon les souches, cultivées sur des milieux complexes. Bien qu'aérobie, Rhizobium demande peu d'oxygène pour assurer sa croissance [37].

Malgré certaines incertitudes récentes [38,45,68,91], Rhizobium est incapable de fixer l'azote atmosphérique mais utilise les ions nitrate et ammonium et les acides aminés. Un seul de ces derniers peut constituer l'unique source d'azote dans un milieu de culture mais il est démontré que l'utilisation d'un hydrolysate de caséine permet à Rhizobium japonicum d'assurer une meilleure croissance que celles obtenues sur toutes les combinaisons possibles d'acides aminés [35]. De plus, chez Rhizobium meliloti, NEAL et coll. [102] et WALKER et coll. [127] signalent une meilleure assimilation de l'ion ammonium comparé à l'ion nitrate.

FRED et coll. [43] et NORRIS [104] distinguent deux groupes différents de par leur production d'acides ou de bases dans des conditions standard de culture. Ces groupes sont dépendants du taux de croissance des souches :

- groupe des Rhizobia à croissance rapide, producteurs d'acides : Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti, Rhizobium phaseoli, Rhizobium trifolii.

Le temps de génération de ces souches varie de 2 à 4 heures.

- groupe des Rhizobia à croissance lente, producteurs de bases : Rhizobium japonicum, Rhizobium lupini, Rhizobium du Cowpea group.

Le temps de génération varie dans ce cas de 6 à 8 heures.

Si la notion d'accumulation de produits acides pour les uns et basiques pour les autres est aujourd'hui largement dépassée, la

différenciation des deux groupes à croissance lente et rapide reste valable et est basée sur des caractères métaboliques plus précis.

A_ LE METABOLISME DES HYDRATES DE CARBONE CHEZ RHIZOBIUM

=====

1) Nature des sources de carbone utilisées par Rhizobium

De nombreux auteurs ont étudié l'utilisation des sources de carbone par Rhizobium [6,44,79] mais la plupart d'entre eux emploient des milieux complexes dont la source d'azote est apportée par une quantité appréciable d'eau de levure. Leurs résultats sont imprécis et peuvent prêter à confusion si l'on sait que cette eau de levure contient en solution des mannanes dont l'hydrolyse et la dégradation peuvent interférer avec la source de carbone testée.

GRAHAM, conscient de ce problème, met au point une technique simple de visualisation de l'utilisation de substrats carbonés en boîte de Pétri contenant un milieu très pauvre en extrait de levure [47]. Ses résultats permettent d'affirmer que toutes les souches à croissance rapide sont capables d'utiliser pour leur croissance les vingt sources de carbone différentes testées, choisies parmi les oses simples, les disaccharides et les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques. Par contre, les souches à croissance lente possèdent des exigences plus marquées. Elles dégradent préférentiellement le glucose, le citrate de sodium, le xylose, le mannitol, l'arabinose, le galactose et le fructose.

Quant aux modifications du pH qui accompagnent la dégradation de ces substrats, elles ne sont pas spécifiques de la vitesse de croissance des souches mais varient d'après GRAHAM [47] selon la nature de la source de carbone.

2) Les voies de dégradation des hydrates de carbone suivies par Rhizobium

Depuis très longtemps déjà, les chercheurs se sont intéressés à l'utilisation des carbohydrates en tant que sources de carbone et d'énergie par les cellules de Rhizobium en culture ou en symbiose ; mais comparativement, très peu d'équipes ont étudié le détail des voies cataboliques empruntées.

Cependant, les travaux publiés, quoi que concernant des souches de groupes d'inoculations différents, nous permettent de penser que les Rhizobia à croissance rapide possèdent le potentiel enzymatique nécessaire au déroulement complet ou partiel des trois voies principales de la glycolyse :

- Embden - Meyerhoff - Parnas (EMP) : Annexe 1
- Dickens - Horecker ou voie des pentoses phosphates ou voie des hexoses monophosphates (HMP) : Annexe 2
- Entner - Doudoroff (ED) : Annexe 3

Les Rhizobia à croissance lente dépendraient essentiellement de la voie de Entner - Doudoroff [65,95].

De plus, la dégradation du pyruvate se fait par le cycle de Krebs chez tous les Rhizobia [60,66].

En 1955, KATZNELSON [62] signale la production par Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti, Rhizobium phaseoli et Rhizobium trifolii de pyruvate et de trioses phosphate à partir de glucose 6 phosphate et de gluconate 6 phosphate en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺). Ces résultats s'identifient à ceux publiés quelques temps auparavant pour une souche de Pseudomonas saccharophila par ENTNER et DOUDOROFF [36] et par MacGEE et DOUDOROFF [93]

ainsi que pour une souche de Pseudomonas fluorescens par WOOD et coll. [76,131]. On sait de plus que les souches de Pseudomonas et de Rhizobium sont capables d'hydrolyser le 2 céto 3 déoxy 6 phosphogluconate, intermédiaire type de la voie de E.D.

En 1957, KATZNELSON et ZAGALLO [65] démontrent que Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti et Rhizobium phaseoli possèdent en plus les enzymes des voies de EMP et HMP. Ceci est confirmé par JORDAN en 1962 [61].

En 1960, TUZIMURA et MEGURO [122] démontrent qu'en culture, Rhizobium japonicum peut oxyder le glucose, le fructose 1-6 diphosphate, l'α-céto-glutarate, le fumarate et le succinate. Ces résultats font suggérer aux auteurs que la souche possède le potentiel enzymatique nécessaire au déroulement de la voie de EMP et du cycle de Krebs.

En 1966, JOHNSON et coll. [60] remarquent que si Rhizobium japonicum, Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti, Rhizobium phaseoli et Rhizobium trifolii oxydent rapidement le pyruvate de sodium et l'acétate de sodium, ils ne peuvent pas utiliser ces substrats pour leur croissance. Les auteurs pensent que la cause en est due à l'absence d'isocitrate-lyase qui ne permet pas le renouvellement normal des composés en C₄ accepteurs des deux substrats pour leur intégration dans le cycle de Krebs.

En 1969, KEELE et coll. [66], par l'emploi de méthodes radiorespirométriques et par la mise en évidence d'activités enzymatiques spécifiques, confirment que Rhizobium japonicum dans leurs conditions expérimentales emprunte les voies de E.D. et du cycle de Krebs pour l'oxydation totale du glucose. Les auteurs signalent l'absence de l'enzyme-clé de la voie des H.M.P : la 6 phosphogluconate-deshydrogénase et remarquent que

la voie d'E.M.P. ne fonctionne pas. Ils ne s'en étonnent guère depuis que STILL et WANG [117] ont démontré que les voies de E.M.P et E.D. n'opèrent pas simultanément chez un microorganisme même s'il possède les deux systèmes enzymatiques [34].

Toujours par l'emploi des mêmes techniques, KEELE et coll. [67] en 1970 apportent quelques précisions sur le métabolisme du gluconate. La mise en évidence de l'activité gluconokinase et d'un système enzymatique complet convertissant le 6 phosphogluconate en pyruvate démontre que le Rhizobium japonicum oxyde le substrat par l'intermédiaire de la voie de E.D. Mais par l'utilisation de la technique de radiorespirométrie, les auteurs constatent l'apparition d'un taux élevé en $^{14}\text{CO}_2$ provenant du C_1 du gluconate. Il existe donc une autre voie se développant parallèlement à la voie d'E.D. utilisant la décarboxylation en C_1 . Or, l'enzyme-clé de la voie des pentoses (H.M.P), la 6 phosphogluconate-deshydrogénase, n'est pas mise en évidence. Par contre, les chercheurs détectent une activité gluconate-deshydrogénase importante. Cet enzyme représente le premier de la voie du céto gluconique, découvert chez les bactéries acétiques [64].

De plus, ils signalent l'utilisation rapide par la souche de Rhizobium japonicum du 2 céto gluconate et du 2,5 dicéto gluconate pour sa croissance.

De ces observations, nous pouvons rapprocher celles de JOHNSON et coll. [60] qui précisent que Rhizobium japonicum peut oxyder sans délai le pyruvate et l'acétate mais ne peut utiliser l'un ou l'autre de ces deux substrats en tant que seule source de carbone.

Dans ce cas, l'existence d'une voie du céto gluconate pourrait être très avantageuse pour Rhizobium. Peut-être possède-t'il les mêmes

voies de dégradation du gluconate que celles employées par les bactéries acétiques ? Ces voies permettent le passage par le 2 cêto- et le 5cêtogluconate, le 2-5 dicêtogluconate puis, par un mécanisme encore inconnu, autoriserait l'entrée dans le cycle de Krebs par l'intermédiaire de l'acide α cêto-glutarique [25] (figure 1).

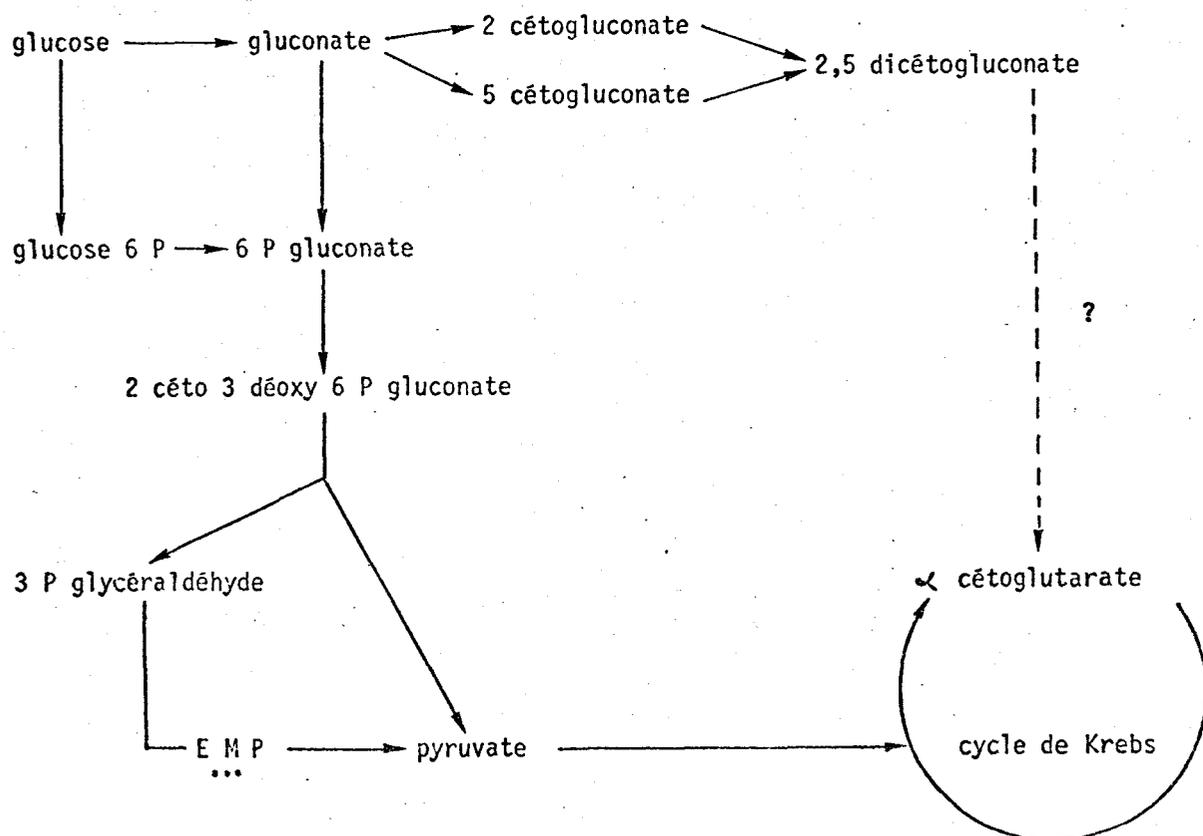


Figure 1

Voies de dégradation du glucose et du gluconate selon KEELE et coll. [66,67] chez Rhizobium japonicum

En 1972, MARTINEZ DE DRETS et ARIAS effectuent une recherche systématique, chez les souches de Rhizobium représentant tous les groupes d'inoculation, des enzymes-clés de chaque voie de dégradation du glucose. [95].

En accord avec les résultats publiés [65,66] les auteurs retrouvent une activité nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-glucose 6 phosphodeshydrogénase (NADP^+ 6PGD) pour toutes les souches étudiées avec toutefois une activité spécifique plus importante chez les souches à croissance rapide. Par contre, sur la base de leur activité 6 phosphogluconate deshydrogénase, deux groupes ont pu être différenciés :

- un premier groupe possédant une activité NADP^+ 6PGD correspondant aux souches à croissance rapide,
- un second groupe ne possédant pas d'activité NADP^+ 6PGD et incluant toutes les souches à croissance lente.

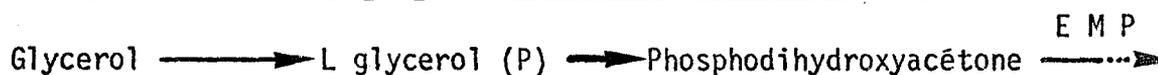
Cette différenciation basée sur une activité enzymatique spécifique est en accord avec la classification de VINCENT [124] et pourrait être utilisée dans la détermination de l'appartenance d'une souche de Rhizobium à l'un ou l'autre des deux groupes.

En 1974, PEDROSA et coll. [108] décrivent les voies de dégradation de l'arabinose, pentose défini comme étant la source de carbone préférée par Rhizobium japonicum [2,119]. Oxydée en 2 céto-3 deoxy-arabonate la molécule est ensuite hydrolysée en glycoaldéhyde et en pyruvate. Déjà décrite chez Pseudomonas [22] l'existence de cette même voie chez Rhizobium apporte un nouvel argument aux relations phylogéniques entre ces deux souches.

Les auteurs mettent aussi en évidence une activité NAD^+ NADP^+ glycoaldéhyde deshydrogénase, ce qui indique en accord avec JOHNSON et coll. [60] que le cycle du glyoxal joue un rôle très important.

En 1976, ARIAS et coll. [5] décrivent les voies de catabolisme du glycérol, classé très bon substrat carboné chez Rhizobium japonicum [84]

et qui possède l'avantage d'être beaucoup plus économique que l'arabinose. La présence d'une glycérolkinase, d'une glycérolphosphate-deshydrogénase et l'absence de glycéroldeshydrogénase dans les extraits cellulaires de Rhizobium trifolii et Rhizobium japonicum indiquent que le métabolisme du glycérol emprunte une voie identique à celle d'Escherichia coli [21, 75] de Rhodopseudomonas capsulata [85] et d'Aerobacter aerogenes [111].



Trop peu de souches sont étudiées pour tirer une conclusion au niveau de la différenciation des groupes de Rhizobium à croissance rapide et à croissance lente.

3) Les voies de dégradation particulières à Rhizobium meliloti

Outre quelques particularités communes à Rhizobium meliloti et à d'autres souches de groupes d'inoculations différents et déjà rapportées au préalable, quelques connaissances complémentaires et spécifiques à Rhizobium meliloti peuvent être précisées.

En 1969, ERTOLA et coll. [37] étudient les effets de la composition du milieu et de son taux d'oxygénation sur la croissance de Rhizobium meliloti. Il s'avère que les besoins en oxygène sont peu élevés comme pour les autres Rhizobia [16, 32] et que la croissance en fermenteur est maximale en présence de saccharose. Dans ces conditions expérimentales, le pH des milieux dénote une tendance à une légère alcalinisation sur glycérol, mannitol et saccharose et une acidification un peu plus marquée sur glucose.

En 1970, MARTINEZ DE DRETS et ARIAS [94] étudient les voies de catabolisme de plusieurs polyols. Déjà en 1942, BURRIS et coll. [15] annonçaient que le métabolisme des polyols se faisait par un mécanisme

oxydatif et suggéraient que cette oxydation pouvait être effectuée par des enzymes inductibles.

Travaillant sur des extraits cellulaires de Rhizobium meliloti cultivé sur mannitol, MARTINEZ et coll. testèrent le D mannitol, le D arabitol et le D sorbitol. Deux polyols deshydrogénases différentes sont induites par ces substrats :

- une nicotiamide adénine dinucléotide (NAD^+)arabitol-deshydrogénase
- une NAD^+ - sorbitol deshydrogénase.

Toutes les recherches d'activité polyol-phosphates deshydrogénases restent vaines.

La D arabitol-deshydrogénase réduit à la fois le D arabitol et le D mannitol mais la D sorbitol-deshydrogénase est spécifique du D sorbitol. Le D arabitol est oxydé en D xylulose, le D-mannitol et le D sorbitol sont oxydés en D Fructose.

Il existe de plus une hexokinase adénosinetriphosphate (ATP) dépendante phosphorylant le D fructose mais aucune activité hexose-isomérase dans ces cellules de Rhizobium cultivées sur mannitol n'est détectée.

Ces voies de dégradations des polyols sont rapportées sur la figure 2

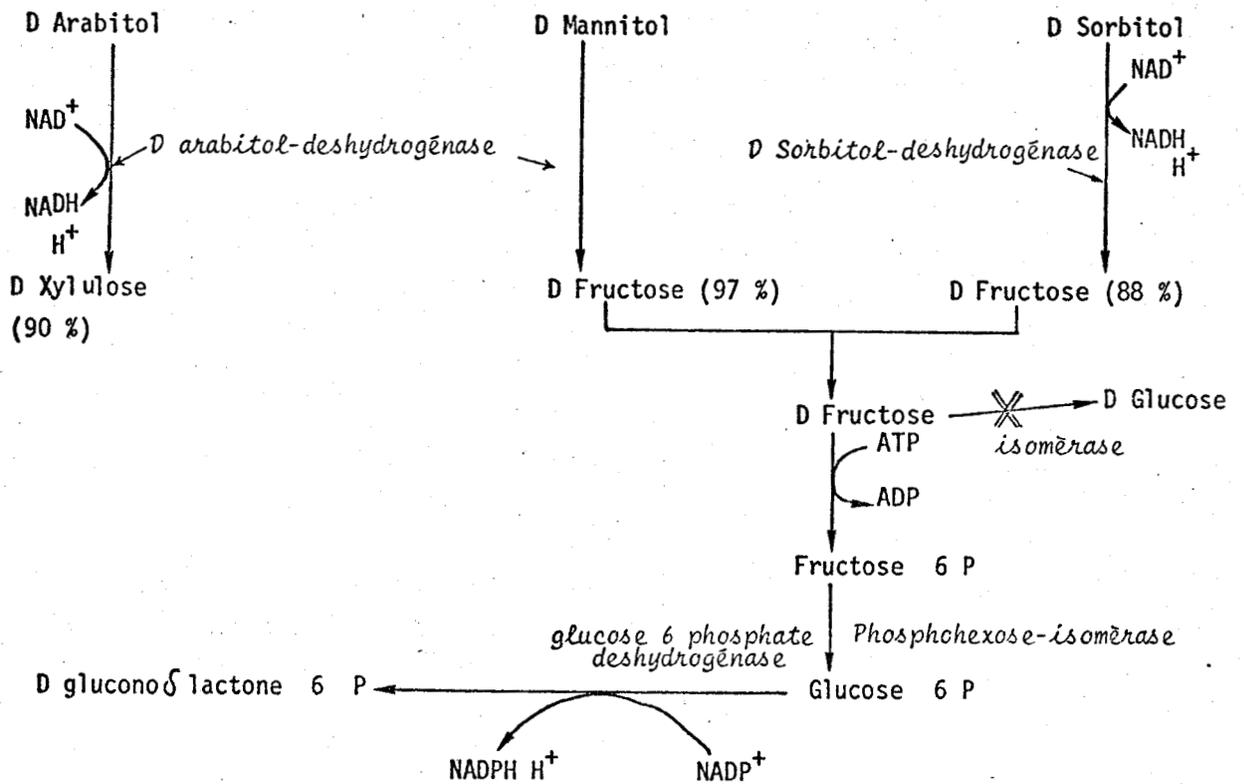


Figure 2

Métabolisme des polyols chez Rhizobium meliloti [94]

Toutes les polyols-deshydrogènases sont inductibles par n'importe lequel des trois substrats. Ce type d'induction croisée a déjà été décrit par SCOLNICK et LIN [113] chez Cellvibrio polyoltrophicus. La fructo-kinase ATP dépendante est induite par le fructose.

4) Nature des polymères carbonés synthétisés par Rhizobium

Les deux dérivés de biosynthèse provenant directement du métabolisme carboné et produits en quantités importantes sont les poly- β hydroxybutyrate (PHB) et les exopolyosides. Nous reviendrons sur la synthèse de ces derniers par la suite.

FRED et coll. [43] déjà en 1932 signalent la présence de granules de PHB dans le cytoplasme des cellules âgées de Rhizobium, granules ressemblant fortement aux grains d'amidon décrits dans les tissus végétaux. L'identification du polymère est ensuite confirmée par SMITHIES et coll. en 1955 [116] et FORSYTH et coll. en 1958 [42]. Son poids moléculaire varie de 1000 à 250 000 [88] et son rôle est probablement de constituer une réserve hydrocarbonée permettant la survie de la cellule dans un milieu très pauvre [52, 125].

B. LE PROBLEME POSE PAR LE METABOLISME DU GLUCOSE CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI (*) ===== Travaux du laboratoire publiés [19, 20, 58].

Les études antérieures réalisées au laboratoire sur la synthèse des exopolyosides par les souches de Rhizobium ont décelé quelques particularités métaboliques liées à une souche du groupe d'inoculation de la luzerne : Rhizobium meliloti (M5N1).

(*) Les matériels, méthodes, milieux et souches employés pour l'obtention des résultats décrits sont précisés dans le chapitre II A.

1) La composition chimique de l'exopolyoside de Rhizobium meliloti

Nous avons étudié la composition des polyosides synthétisés par Rhizobium [20]. Pour Rhizobium meliloti, nous constatons que le polymère est constitué essentiellement d'oses neutres : glucose (80 %) et galactose (20 %). Il est pratiquement exempt d'acide glucuronique (0 à 2 %). Ces résultats sont en accord avec les observations d'AMARGER et coll. [3].

2) Production d'exopolyosides par Rhizobium meliloti en fonction de la source de carbone utilisée

Comme tous les Rhizobia, Rhizobium meliloti synthétise des exopolyosides en milieu complet additionné d'une source de carbone.

a. production de polyosides lors de la croissance de la souche

α - sur milieu solide

Sur milieu solide, cette biosynthèse s'exprime par l'apparition de colonies plus ou moins muqueuses en fonction de la nature du substrat carboné (Tableau 2).

Ce Tableau confirme l'utilisation par notre souche de Rhizobium meliloti d'un très grand nombre de substrats carbonés pour sa croissance. Par contre, au niveau de la synthèse des polyosides, seuls l'adonitol, le sorbitol, le mannitol, le fructose et le ribose donnent lieu à la formation de colonies fortement muqueuses. Ces substrats sont qualifiés de "bons substrats" pour cette synthèse et tous les autres de substrats médiocres.

SOURCE DE CARBONE AMENANT EN MILIEU SOLIDE LA FORMATION DE COLONIES		
Très peu muqueuses	Légèrement muqueuses	Très muqueuses
Amidon	Galactose	Adonitol
Arabinose	Lactose	Fructose
Cellobiose	Maltose	Mannitol
Dulcitol	Saccharose	Ribose
Glucose		
Glutarate		
Glycogène		
Inositol		
Mannose		
Pyruvate		
Raffinose		
Succinate		
Xylose		

Tableau 2 : Aspects des colonies d'une souche de *Rhizobium meliloti* (M5N1) cultivée sur milieu complet solide (RC) additionné de différentes sources de carbone et incubé à 30°C durant 5 jours.

β- en milieu liquide

L'apparition sur boîte de Pétri de colonies fortement muqueuses ou de petites colonies non muqueuses lors de l'essai de différentes sources de carbone nous amène à poser la question suivante :

le pouvoir de synthèse des polysides des cellules est-il lié à leur croissance ou en est-il indépendant ?

Pour répondre à cette question, nous avons contrôlé à la fois la croissance de la souche (par numérations des cellules viables) et le taux de synthèse des polysides (par pesée des poids secs) sur des milieux

complets (RC) additionné d'une part d'un bon substrat : le mannitol et d'autre part d'un substrat médiocre : le glucose, conformément à la nomenclature définie auparavant (Figures 3 et 4).

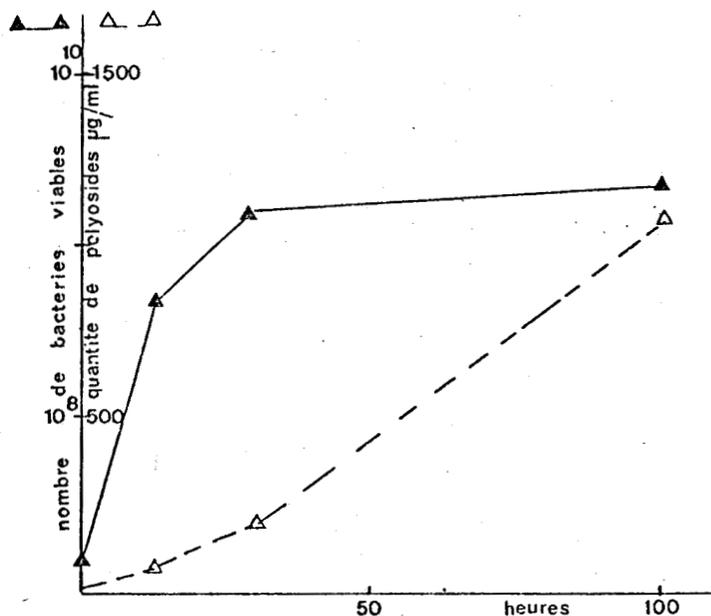


Figure 3

Croissance (en trait plein) et synthèse de polysides (en pointillé) par Rhizobium meliloti (M5N1) sur milieu RC mannité à 1 %.

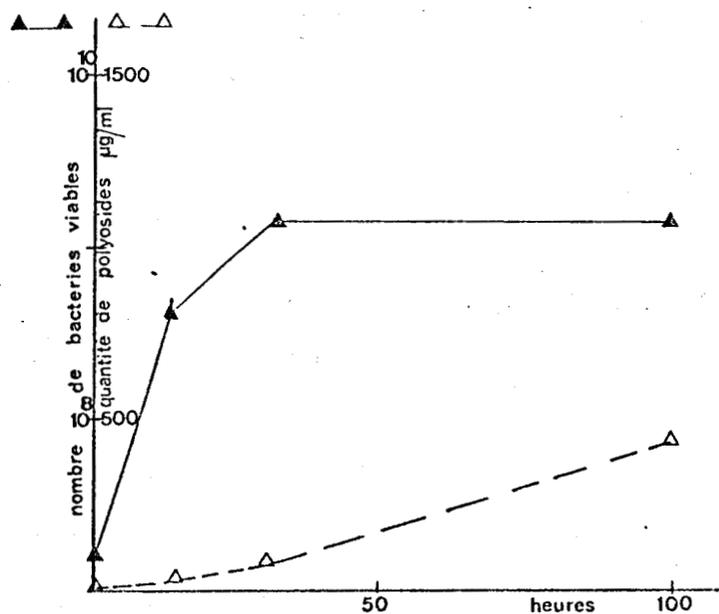


Figure 4

Croissance (en trait plein) et synthèse de polysides (en pointillé) par Rhizobium meliloti (M5N₁) sur milieu RC glucosé à 1 %.

Nous pouvons voir sur ces figures que la souche employée cultive aussi bien sur glucose que sur mannitol. Par contre, le milieu glucosé est beaucoup moins favorable à la synthèse des polyosides [19].

Il faut noter dès à présent les modifications importantes de pH intervenant dans ces conditions de culture : pour un pH initial de 7,5 dans chacun des cas, les pH finaux sont respectivement de 7,2 pour le mannitol et 4,8 pour le glucose.

b. production de polyosides par des cellules mises en conditions de non prolifération

Par incubation des cellules dans des conditions de non prolifération, nous obtenons des résultats similaires reproduits sur les courbes des figures 5A et 5B [58].

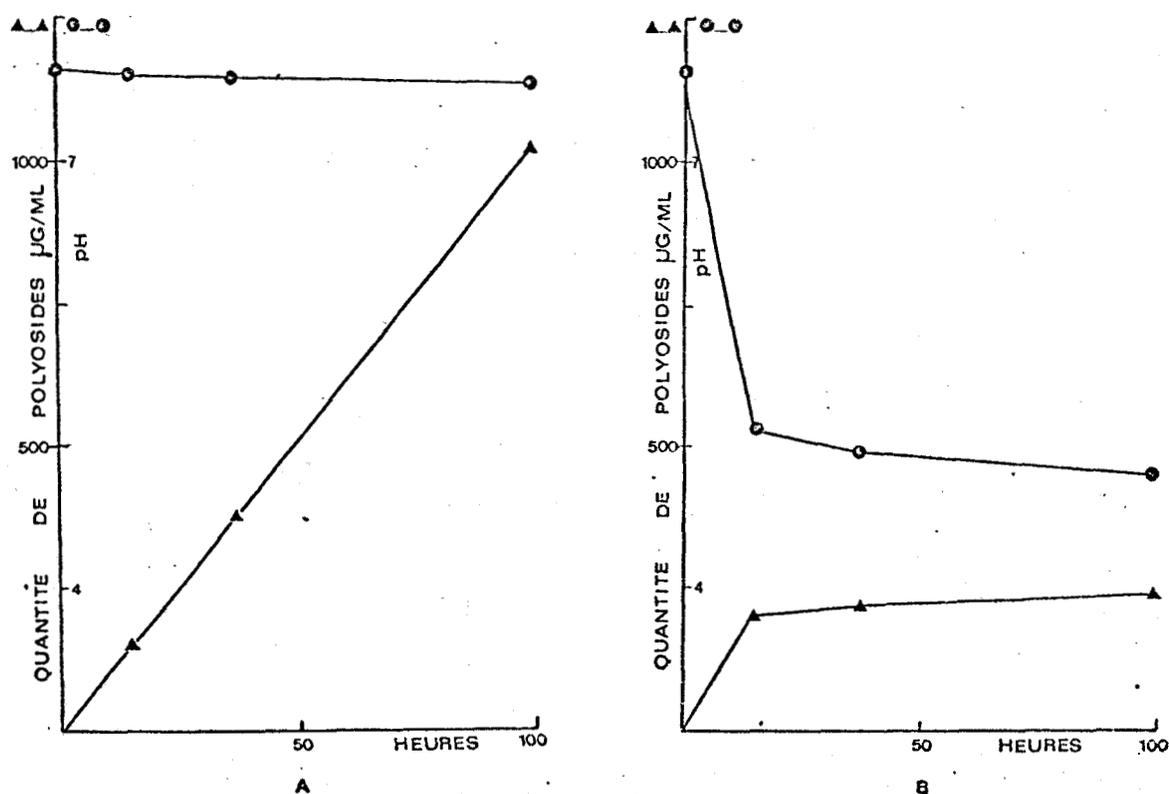


Figure 5

Biosynthèse d'exopolysides par des cellules de *Rhizobium meliloti* (M5N1) suspendues dans un milieu de non prolifération additionné de Fructose à 1 % (A) ou de glucose à 1 % (B) et variations du pH des milieux au cours de l'incubation à 30°C sous agitation moyenne.

Nous observons que lorsque, sur le milieu contenant du glucose, le pH atteint 5 la synthèse du polyoside cesse, alors qu'elle se poursuit linéairement sur fructose, le pH restant neutre.

C CONCLUSION ET PLAN DU TRAVAIL

=====

Des résultats exposés ci-dessus, il ressort que pour une souche de Rhizobium meliloti, la synthèse des exopolyosides est différente en fonction de la nature de la source de carbone étudiée.

Le fructose et le mannitol sont dans cette optique de très bons substrats mais le glucose est très médiocre alors que nous avons démontré qu'il entre pour 80 % dans la composition du biopolymère.

Par ailleurs, cette notion de pouvoir de synthèse des exopolyosides semble liée aux modifications du pH des milieux réactionnels. Toute accumulation de ces macromolécules est synonyme d'un maintien du pH aux environs de la neutralité. COURTOIS a d'ailleurs démontré [19] que cette condition était nécessaire au bon fonctionnement du complexe enzymatique responsable de la synthèse.

Nous avons donc choisi d'étudier le problème particulier de l'assimilation du glucose et du fructose chez Rhizobium meliloti.

- Dans un premier temps, nous avons vérifié que le phénomène observé au départ sur une seule souche du genre (M5N1) se renouvelait pour toutes les souches représentant le groupe d'inoculation de la luzerne (Rhizobium meliloti).

- Ensuite, la mise en évidence de l'inexistence de fermentation chez Rhizobium meliloti et du bon fonctionnement du cycle de Krebs nous indiquent que l'acidification constatée pour les milieux à base de glucose ne peut être due qu'à l'accumulation d'un ou de plusieurs intermédiaires d'une voie de dégradation oxydative de ce substrat.

- Dans un troisième temps, nous avons recherché la nature chimique de cette fraction acide.

Enfin, dans un dernier temps, des travaux particuliers à l'étude de l'utilisation du glucose et du fructose nous permettent de proposer un schéma métabolique illustrant la dégradation de ces deux substrats carbonés par Rhizobium meliloti.

II

ETUDE METABOLIQUE DE RHIZOBIUM MELILOTI
EN PRESENCE DE DIFFERENTS SUBSTRATS
CARBONES

I I E T U D E M E T A B O L I Q U E D E R H I Z O B I U M

M E L I L O T I E N P R E S E N C E D E D I F F E R E N T S

S U B S T R A T S C A R B O N E S

L'observation faite au laboratoire du comportement de la souche M5N1 en présence du glucose ou du fructose est vérifiée sur un échantillon de onze souches du même groupe d'inoculation de notre collection.

L'emploi de "bons substrats" et de "substrats médiocres", (selon la nomenclature définie précédemment et basée sur le taux d'accumulation de polyosides), nous permet de faire à nouveau la liaison entre le pouvoir de synthèse des souches et l'évolution du pH des milieux réactionnels, donc de mettre en évidence des différences métaboliques selon la nature de l'hydrate de carbone.

A_ MATERIEL ET METHODES

=====

1) Les milieux de culture

a. le milieu de Wright

Les souches de Rhizobium sont conservées sous forme de culture sur la tranche de tubes inclinés contenant le milieu de Wright gélosé [132].

Milieu de Wright à l'extrait de levure fraîche (W)

K_2HPO_4	0,5 g	} pH 7,5
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g	
NaCl	0,2 g	
$CaSO_4, 2 H_2O$	0,1 g	
$CaCO_3$	0,1 g	
Mannitol	10 g	
Extrait de levure fraîche	100 ml	
Eau distillée	900 ml	}
(Agar	15 g)	

L'extrait de levure fraîche est obtenu à partir de 100 g de levure de boulangerie autoclavée à 120°C pendant 20 mn dans un litre d'eau distillée. La suspension autoclavée est filtrée à chaud sur papier filtre jusqu'à colmatage de ce dernier. Le filtrat obtenu est jaune limpide et est conservé à la température du laboratoire après avoir été autoclavé une seconde fois dans les mêmes conditions.

b. le milieu RC

Les cultures des souches utilisant les différents hydrates de carbone sont réalisées sur le milieu de LAIRD [78] modifié par DELATTRE [26]: ce milieu est baptisé RC.

Milieu RC

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g	} pH 7,5
KH ₂ PO ₄	0,5 g	
Yeast extract	1 g	
(Ose	10 g)	
Eau distillée	1000 ml	

Les oses sont préparés séparément en flacons de 50 ml à une concentration égale à 20 %. Autoclavés durant 20 mn à 105°C, ils ne sont ajoutés stérilement au milieu RC qu'extemporanément.

c. le tampon RN⁻

Lors de certaines manipulations, nous utilisons des suspensions de cellules dans un système tampon exempt d'azote : tampon RN⁻ [26].

Tampon RN⁻

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g	} pH 7,5
KH ₂ PO ₄	0,5 g	
Eau distillée	1000 ml	

Ce tampon sert aussi au lavage des cellules recueillies après centrifugation des cultures.

2) Les souches utilisées :

Les souches utilisées sont choisies dans la collection du laboratoire parmi celles représentant le groupe d'inoculation de la luzerne. La plupart sont isolées par nos soins à partir de nodules de légumineuses recueillis dans des terrains très variés.

Leur appartenance au genre *Rhizobium* est vérifiée par la nodulation *in vitro* de la légumineuse adéquate : ce test reste encore actuellement le seul critère réel de classification. Cette nodulation doit se faire dans des conditions aseptiques. Dans notre cas précis, des graines de luzerne sont d'abord désinfectées, mises à germer sur un milieu nutritif gélosé [103] et placées dans des conditions nutritives et stériles convenables pour engendrer des plantules aseptiques. Dès l'apparition des racines secondaires, on inocule par une suspension de 10^8 cellules bactériennes lavées par le tampon RN^- . L'apparition en quelques jours de nodules sur les racines prouvent l'appartenance de la souche testée au genre *Rhizobium*.

Douze souches de *Rhizobium meliloti*, différentes par leur origine sont choisies après vérification par test positif de leur nodulation *in vitro* sur la luzerne, ce sont :

{	M3S	{	M11S	{	M17S
{	M5S	{	M12S	{	M20S
{	M5SN	{	M13S	{	M29S (b)
{	M5N1 (a)	{	M14S	{	M2011 (c)

(a) M5N1 = mutant naturel spontané de M5S

(b) Nous remercions Monsieur le Recteur BONNIER de son aimable envoi de la souche 1-5 que nous avons inclus dans notre collection sous le sigle M29S.

(c) Nous remercions Monsieur DENARIE de nous avoir fourni aimablement la souche M2011.

La conservation de ces souches se fait, comme nous l'avons dit, en tube contenant le milieu de Wright gélosé. Elles survivent ainsi sans être repiquées pendant des temps très longs, voisins d'une année. D'autres techniques sont également utilisées au laboratoire, notamment :

- la congélation à -15°C d'une suspension cellulaire en milieu RC glucosé ou mannité renfermant du glycérol à 20 %.

- la lyophilisation sur lait cystéiné à 0,8‰.

3) Les conditions de culture et les contrôles physiques

A partir de la collection, toutes les souches sont réisolées en boîte de Pétri sur RC glucosé gélosé. Chacune d'entre-elles est relancée sur 10 ml de RC glucosé et sur 10 ml de RC fructosé en tube cotonnés durant 24 h à 30°C en agitation moyenne.

On inocule enfin des erlenmeyers de 300 ml cotonnés contenant 100 ml de milieu RC glucosé ou fructosé par 1 ml de ces précultures. L'ensemble est placé sur table d'agitation rotative à 30°C . Des échantillons sont prélevés régulièrement, sur lesquels deux types de mesures sont réalisés :

- l'absorbance par lecture de la densité optique au spectrophotomètre à 600 nm.

- le pH par immersion d'une électrode de verre.

4) Conditions d'incubation en non prolifération

Les cellules sont préparées par culture de la souche sur milieu RC glucosé à 1 % durant 16 h en agitation rotative moyenne à 30°C . Ce temps d'incubation est choisi de façon à obtenir des cellules en fin de phase exponentielle de croissance (Figure 7). Centrifugées durant 20 mn à

à 16 300 g, elles sont récupérées et lavées deux fois dans le système tampon RN⁻. Elles sont remises en suspension dans ce même tampon de façon à obtenir une densité optique de 10. Conservées dans ces conditions à + 4°C, elles restent viables au moins 4 jours.

Durant ce temps, aucune lyse significative n'est observée par numérations (Tableau 3).

Temps de stockage en heures	Nombre de germes viables par ml
0	98 x 10 ⁷
7	98 x 10 ⁷
29	97 x 10 ⁷
53	1 x 10 ⁹
100	1,01 x 10 ⁹

TABLEAU 3 : Evolution de la viabilité des cellules de Rhizobium meliloti (M5N1) conservées à + 4°C dans le système tampon RN⁻

Ces cellules ainsi préparées sont utilisées pour l'étude de leur respiration sur différents substrats ou l'étude de la dégradation des oses en fonction du temps.

Elles sont lavées à nouveau extemporanément et suspendues dans le système tampon RN⁻ additionné d'un substrat à une concentration donnée, pouvant varier. Ce milieu, dépourvu de source d'azote minérale ou organique, permet d'assurer les conditions de non prolifération ; les cellules incapables de fixer seules l'azote atmosphérique respirent mais ne peuvent en aucun cas se diviser.

B_ RESULTATS

=====

1) Evolution de la croissance et du pH lors de la culture de la souche M5N1 en présence de différents hydrates de carbone

a. choix du milieu RC

Le milieu de Wright assure une bonne conservation de toutes les souches de Rhizobium. Par rapport au milieu RC il permet une meilleure croissance des différentes souches excepté celles du groupe d'inoculation de la luzerne. Dans ce dernier cas le milieu RC est préféré (Figure 6) et de plus, sa préparation à partir d'extrait de levure atomisé lui assure une qualité plus constante.

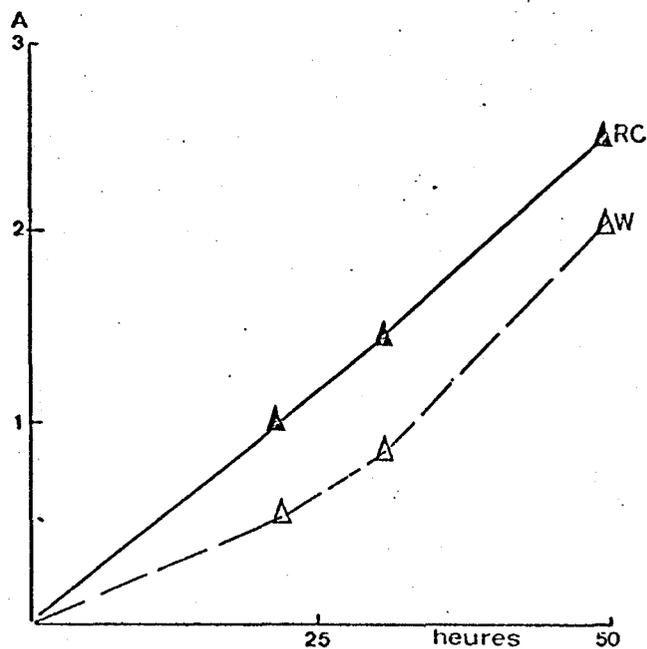


Figure 6

Croissance de Rhizobium meliloti (M5N1) sur RC mannité à 1 % (trait plein) et W mannité à 1 % (en pointillé). L'absorbance est lue à 600 nm.

Nous utiliserons donc le milieu RC pour toute la suite de nos études de souches en culture, après addition d'hydrates de carbone.

b. croissance comparée en présence de glucose ou de fructose

La détermination du nombre de cellules viables au cours du temps pour la souche M5N1 en culture sur milieu RC glucosé à 1 % ou fructosé à 1 % permet de constater que la croissance bactérienne est légèrement plus rapide avec le fructose qu'avec le glucose (Figure 7).

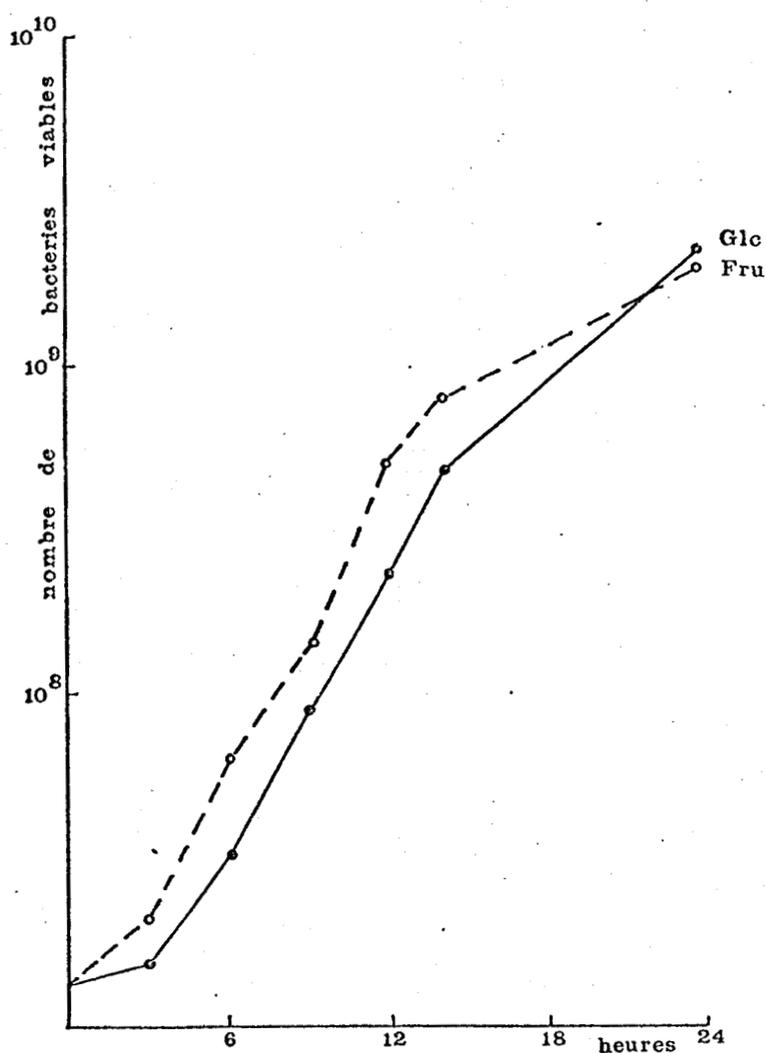


Figure 7

Courbes de croissance de Rhizobium meliloti (M5N1) sur milieu RC glucosé (trait plein) et RC fructosé (en pointillé) à 30°C sous agitation moyenne.

Malgré cette légère différence, on peut considérer que la croissance est pratiquement identique sur les deux substrats carbonés.

c. évolution du pH lors de la croissance en présence de glucose, mannose, fructose ou mannitol

Si nous suivons l'évolution du pH lors des cultures de la souche M5N1 sur des substrats voisins tels que le glucose, le mannose, le fructose ou le mannitol, on s'aperçoit par contre que l'on peut classer ces substances hydrocarbonées en deux catégories :

- celles dont l'utilisation s'accompagne d'une forte baisse de pH et qui donnent en fin de manipulation des cultures denses et limpides.

- celles dont l'utilisation s'accompagne d'un maintien du pH aux environs de la neutralité et qui donnent en fin de manipulation des cultures denses et de viscosité importante (Tableau 4).

Temps en heures	Glucose	Mannose	Fructose	Mannitol
0	7,3	7,4	7,5	7,5
21	7,25	7,1	7,5	7,45
43	6,85	6,2	7,45	7,4
50	6,6	4,85	7,45	7,35
120	5,5	4,5	7,4	7,25
147	5,40	4,4	7,45	6,95
210	5,0	4,4	7,4	6,7

Tableau 4 : Evolution du pH lors de la culture de *Rhizobium mēliloti* (M5N1) sur milieu RC additionné de différentes sources de carbone à concentration de 1 %.

Pour des raisons de simplicité et aussi parce qu'il est démontré chez Rhizobium méliiloti que le catabolisme du mannitol rejoint celui du fructose [94] et que chez de nombreuses autres souches bactériennes, le catabolisme du mannose rejoint celui du glucose, nous avons limité l'étude de l'ensemble du genre représentant le groupe d'inoculation de la luzerne à deux oses caractéristiques : glucose et fructose.

2) Evolution de la croissance et du pH des souches de Rhizobium méliiloti cultivées en présence de glucose ou de fructose

L'étude complète est faite en trois manipulations différentes A, B, C. Les résultats sont rapportés dans les Tableaux 5 et 6.

Les variations de densité optique après environ 30 h de culture (manipulation A) peuvent être expliquées par les différentes qualités des inoculums. En effet, la phase de latence précédant la phase exponentielle de croissance des souchesensemencées à partir de tubes de collection dure un temps variable. C'est ainsi, qu'après 24 h d'agitation à 30°C, ces précultures ne sont pas comparables du point de vue densité cellulaire et état physiologique des individus qui les composent. La souche M29S (obtenue de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux) donne des valeurs de densité optique en fin de manipulation nettement inférieures à celles des autres souches. Elle seule, n'a pas été entraînée à croître sur milieu RC. Malgré cela, sa réponse vis-à-vis des variations de pH par rapport à la nature de la source de carbone est commune à celle des autres souches.

D'une façon générale, nous constatons que la croissance des douze souches étudiées, y compris la M5N1, est pratiquement équivalente quelle que soit la nature de la source de carbone du milieu d'incubation :

A

souches Temps en h.	M 5 S		M 5 S N		M 11 S		M 13 S		M 14 S		M 17 S		M 29 S	
	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH
30	0,115	7,55	0,56	7,25	0,25	7,55	0,62	7,35	0,73	7,4	0,18	7,3	0,16	7,0
54		5,9		5,7		6,8		5,0		5,2		5,2		5,6
102		5,5		5,2		6,3		5,1		5,2		4,5		4,9
126	2,35	5,3	2,32	5,0	2,58	6,0	2,14	4,9	2,23	5,3	2,05	4,2	0,86	4,5

B

Souches Temps en h	M 3 S M		M 5 N 1	
	DO	pH	DO	pH
6,5	6,2	7,8	10,7	7,75
18	78	7,45	104	7,35
22,5	86,7	7,05	125,8	7,0
43	74	4,9	150	5,0
56	80,5	4,75	146,5	4,80
66	177,5	5,1	177	5,0

C

souches Temps en h.	M 12 S	M 20 S	M 20 11
	pH	pH	pH
2	7,7	7,6	7,6
21	6,85	6,95	7,5
93	5,85	6,2	5,8
117	5,35	6,15	5,6
141	5,4	6,15	5,6
165	5,35	6,1	5,55
189	5,35	6,0	5,7



Tableau 5 : Evolution de la croissance et du pH lors des cultures des souches de *Rhizobium meliloti* sur milieu RC glucosé à 1 p. 100 sous agitation moyenne à 30°C.

souches Temps en h.	M 5 S		M 5 S N		M 11 S		M 13 S		M 14 S		M 17 S		M 29 S	
	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH
30	0,02	7,6	0,04	7,6	0,79	7,1	0,85	7,15	0,27	7,4	0,17	7,4	0,17	7,1
54		7,1	1,88	7,15		6,8	1,64	7,1	1,23	6,2		7,1		7
102		6,5	2,26	7,2		6,6	1,89	7,2	1,50	5,9		6,8		6,8
126	1,67	6,0	2,40	7,0	2,37	6,5	2,08	6,9	1,56	6,0	2,38	6,8	1,70	6,8

A

Souches	M 3 S M		M 5 N 1	
Temps en h	DO	pH	DO	pH
6,5	0,06	7,85	0,09	7,75
18	0,81	7,55	1,10	7,45
22,5	0,92	7,6	1,20	7,35
43	1,10	7,6	1,80	7,45
56	2,35	7,45	2,40	7,1
66	2,72	7,45	2,92	7,15

B

souches Temps en h.	M 12 S	M 20 S	M 20 11
	pH	pH	pH
2	7,75	7,65	7,6
21	7,7	7,30	7,3
93	7,25	7,2	7,2
117	7	7,2	7,4
141	6,9	7,1	7,4
165	6,5	7,0	7,3
189	6,1	6,95	7,3

C



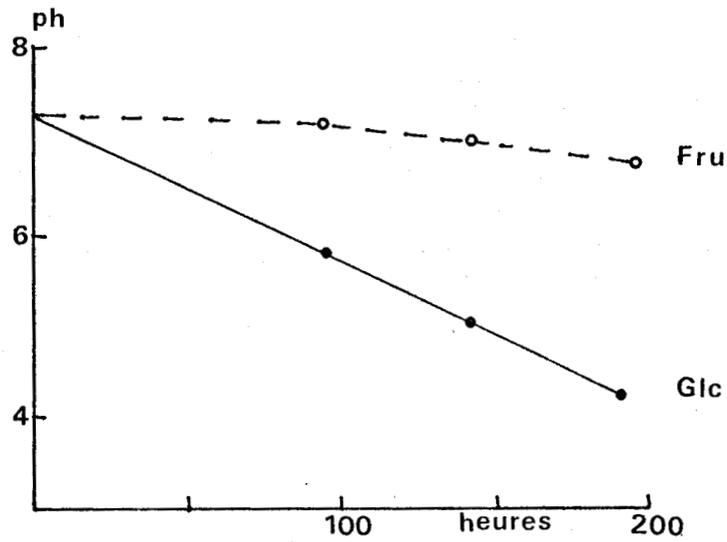
Tableau 6 : Evolution de la croissance et du pH lors des cultures des souches de *Rhizobium meliloti* sur milieu RC fructosé à 1 p. 100 sous agitation moyenne à 30°C.

glucose ou fructose. Par contre, la variation du pH de ces milieux est telle qu'en présence de glucose, les valeurs mesurées accusent une nette diminution par comparaison à celles du pH des milieux fructosés.

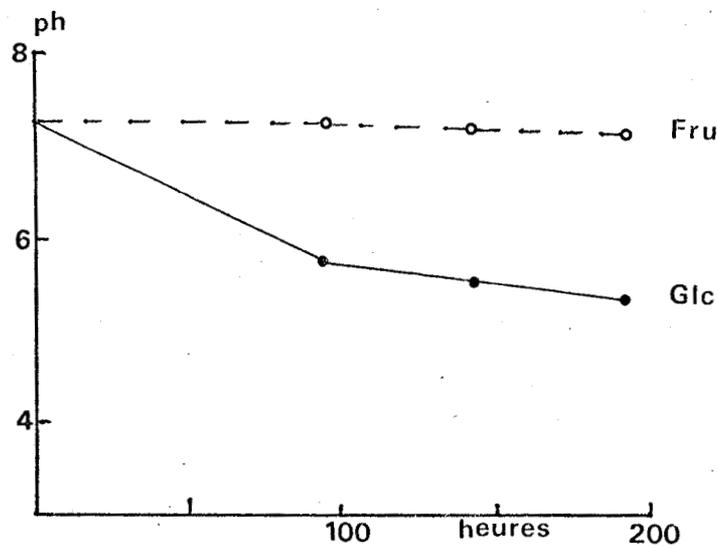
3) Evolution du pH des souches de Rhizobium meliloti mises en condition de non prolifération en présence de glucose ou de fructose

Nous vérifions que ce phénomène est indépendant de la croissance des souches aux dépens des facteurs nutritifs azotés et carbonés en testant trois de leurs représentants en condition de non prolifération sur glucose et fructose (Figure 8).

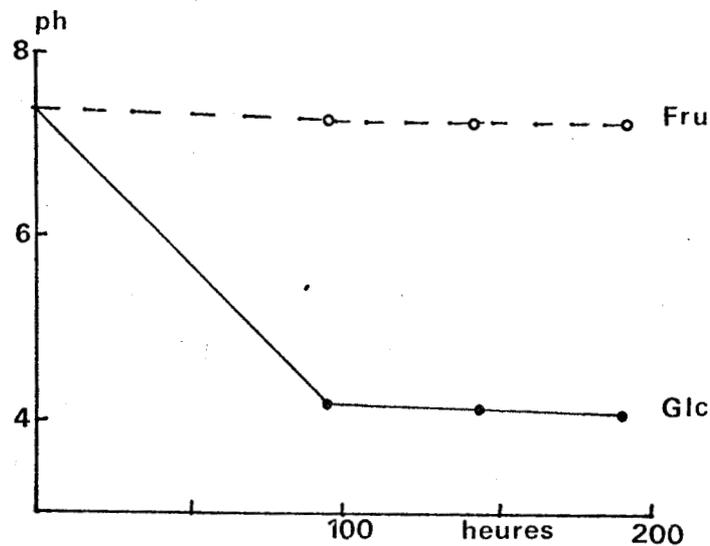
Dans ces conditions, le phénomène d'abaissement de pH semble encore s'accroître par rapport à celui accompagnant la croissance bactérienne. L'accumulation de produits acides est donc liée à l'utilisation métabolique du glucose par les différentes souches.



M12S



M20S



M2011

Figure 8

Evolution du pH lors d'une incubation à 30°C sous agitation moyenne de suspensions cellulaires de trois souches de *Rhizobium meliloti* (M 1 2 S, M 2 0 S, M 2 0 II) dans le système tampon RN⁻ glucosé à 1 p. 100 (Glc) ou fructosé à 1 p. 100 (Fru).



C_ CONCLUSION

=====

L'utilisation de la souche M5N1 nous a permis de définir deux types de substrats carbonés : ceux acidifiant le milieu au cours de la croissance et ceux le conservant aux environs de la neutralité. Les conséquences de la dégradation d'un représentant de chacun de ces deux types, glucose et fructose, sont observées pour douze souches différentes. Il s'avère que d'une façon générale, lors de la croissance bactérienne, la tendance est à l'acidification sur glucose et au maintien du pH à des valeurs proches de celles du départ sur fructose. Ce phénomène est encore plus marqué pour des suspensions cellulaires incubées en condition de non prolifération en présence de glucose.

Ce comportement différentiel en fonction de la source de carbone du milieu de croissance, d'abord mis à jour sur la souche M 5 N 1, semble être commun à toutes les souches représentantes du groupe d'inoculation de la luzerne, souches de Rhizobium meliloti.

III

MISE EN EVIDENCE D'UN CYCLE DE KREBS ACTIF

CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI

III M I S E E N E V I D E N C E D ' U N C Y C L E D E
 K R E B S A C T I F C H E Z R H I Z O B I U M
M E L I L O T I

Les taux de croissance de Rhizobium meliloti cultivé sur RC glucosé ou fructosé sont pratiquement identiques. Les deux substrats sont donc métabolisés mais la variation du pH qui accompagne la dégradation du glucose traduit l'apparition et l'accumulation d'un ou de plusieurs produits acides.

Nous pouvons énoncer deux hypothèses d'explication d'une telle observation :

- le glucose est métabolisé par voie fermentative et dans ce cas, l'acidification doit apparaître lors de l'incubation de la souche en absence d'oxygène.

- le glucose est dégradé selon des voies oxydatives et pour des raisons qui restent à définir, un dérivé acide du métabolisme intermédiaire s'accumule.

L'incubation en aérobiose de nos cellules bactériennes en présence de glucose ou de fructose, la mesure de leur respiration sur différents composants du cycle des acides tricarboxyliques et leur croissance sur ces substrats nous permettent de préciser l'origine de l'acidification des milieux réactionnels en présence de glucose.

A - M A T E R I E L E T M E T H O D E S

=====

I) Conditions d'aérobiose et d'anaérobiose lors d'incubation en non prolifération

L'étude de l'existence d'un métabolisme fermentatif est réalisée par l'observation de l'évolution du pH de suspensions

cellulaires en milieu RN⁻ glucosé à 1 % et en milieu RN⁻ fructosé à 1 %, à la fois en aérobiose et en anaérobiose.

Pour cela, nous utilisons des tubes cotonnés contenant 2,7 ml de milieu RN⁻ additionné de l'ose étudié à la concentration de 1 %. Nous ajoutons 0,3 ml d'une suspension de cellules à DO 10 (cf IIA4) pour obtenir finalement une DO de 1 correspondant à une densité cellulaire de fin de croissance exponentielle sur milieu complet. L'huile de paraffine stérile est coulée à raison de 1 ml par tube en surface de chaque tube destiné à la respiration anaérobie.

L'évolution du pH des solutions incubées à 30°C est contrôlée par immersion de l'électrode en verre préalablement passée à l'éthanol. La densité cellulaire au départ ainsi que les précautions prises lors de la manipulation permettent d'éviter toute contamination importante pendant au moins 150 h.

2) Mesure des échanges gazeux respiratoires

a. principes généraux

La mesure des échanges gazeux respiratoires est effectuée par l'emploi du respiromètre de Warburg. Les principes généraux sont ceux énoncés par UMBREIT, BURRIS et STAUFFER [123].

L'étude de la respiration sur différents intermédiaires du cycle de Krebs nous oblige à mesurer à la fois la quantité d'oxygène consommé mais aussi la quantité de dioxyde de carbone dégagé. En effet la comparaison des valeurs des quotients respiratoires ainsi déterminés $\frac{QO_2}{QCO_2}$ et des valeurs théoriques peut nous permettre de préciser si la dégradation oxydative du substrat carboné en dioxyde de carbone et en eau est complète.

b. conditions expérimentales

Rhizobium meliloti est cultivé sur milieu RC glucosé à 1 % durant 16 h à 30°C sous agitation moyenne. Les cellules sont récupérées par centrifugation, lavées deux fois par le tampon RN⁻ et remises en suspension dans ce même tampon de façon à obtenir une densité optique égale à 9.

Une manipulation type comprend 5 ensembles fioles + manomètres. Les réactifs sont répartis dans les fioles comme suit :

Tableau 7.

Ensemble Fiole + manomètre	Compartiment principal	Puits central	Anse latérale 1	Anse latérale 2
1	3 ml tampon RN ⁻	-	-	-
2	2,5ml susp. cell.	0,5 ml KOH 20 %	0,5 ml tampon RN ⁻	-
3	2,5ml "	-	0,5 ml tampon RN ⁻	0,3 ml H ₂ SO ₄ 2 N
4	2,5ml "	0,5 ml KOH 20 %	0,5 ml substrat	-
5	2,5ml "	-	0,5 ml substrat	0,3 ml H ₂ SO ₄ 2 N

Tableau 7 : *Modèle de répartition des différents éléments lors d'une manipulation type en appareil de Warburg.*

La manipulation se fait à 30°C sous agitation douce. Le temps zéro est compté à partir du moment où on ajoute le substrat à la suspension cellulaire, après stabilisation des ensembles durant 30 mn. Les mesures sont faites toutes les 20 mn.

Rôle de chacun de ces ensembles :

- ensemble I : thermobaromètre. Il sert à corriger d'éventuelles variations de température ou de pression qui peuvent se produire au cours de la manipulation. Il convient de retrancher

ou d'ajouter la lecture faite sur le thermobaromètre des lectures effectuées sur les manomètres des autres fioles (2-3-4-5).

- ensemble 2 : mesure de la quantité d'oxygène consommé lors de la respiration endogène des cellules.

Les bactéries sont suspendues dans le système tampon RN^- sans substrat. Elles respirent donc en dégradant leurs propres réserves énergétiques endocellulaires. On ne lit sur le manomètre 2 que l'oxygène consommé car le dioxyde de carbone dégagé est absorbé par 0,5 ml de potasse à 20 % imbibant une bande de papier Whatman 3, roulée, pour augmenter la surface d'échange gaz-liquide et permettre ainsi une absorption totale du dioxyde de carbone.

- ensemble 3 : mesure de la quantité de dioxyde de carbone dégagé lors de la respiration endogène des cellules.

Une seule lecture est faite en fin de manipulation, 30 mn après l'addition de 0,3 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique 2N. En effet, pour éviter toute erreur dans la lecture de la quantité de dioxyde de carbone produite par les cellules, il est nécessaire de libérer ce produit final d'oxydation de la phase liquide où il se trouve en solution sous forme de carbonate de potassium.

Ces deux premières mesures nous permettent de calculer le quotient respiratoire endogène de la suspension cellulaire.

- ensemble 4 : mesure de la quantité d'oxygène consommé en présence d'un substrat donné.

- ensemble 5 : mesure de la quantité de dioxyde de carbone dégagé en présence d'un substrat donné.

La connaissance des valeurs des échanges gazeux de la suspension cellulaire respirant sur le substrat nous permet de savoir si ce dernier est utilisé totalement ou partiellement oxydé.

3) Mesure de la croissance bactérienne au biophotomètre

Nous utilisons l'appareil de Bonet-Maury et Jouan.

A partir d'un tube de collection, Rhizobium meliloti est cultivé 16 h à 37°C sous agitation moyenne sur milieu complet RC glucosé à 1 %. Les cellules bactériennes récupérées par centrifugation sont suspendues dans le tampon RN⁻. Elles servent d'inoculum pour les six milieux différents préparés :

- { RC (ou R) + pyruvate de sodium à 1 %
- { RC (ou R) + succinate de sodium à 1 %
- { RC (ou R) + citrate de sodium à 1 %

Lors de l'expérimentation, nous avons testé un milieu minimal, milieu R, ne contenant pas d'extrait de levure et additionné de substrats carbonés à 1 % [26]

Milieu R

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g	} pH 7,5
K ₂ HPO ₄	0,5 g	
NH ₄ NO ₃	0,5 g	
Biotine	10 µg	
Thiamine	500 µg	
Substrat carboné	10 g	
Eau distillée	1000 ml	

Ces milieux inoculés sont répartis dans de petites cellules en verre à raison de 7 ml par cellule et placées dans l'enceinte du biophotomètre réglé à 30°C. L'agitation est assurée par barreau magnétique. Le contrôle de la croissance bactérienne se fait par mesures successives automatiques de la transmission de lumière. Ces mesures sont reportées immédiatement sur papier enregistreur et les différentes courbes de croissance apparaissent ainsi simultanément point par point.

B - RESULTATS

=====

I) Absence d'un métabolisme fermentatif

Nous suivons à la fois en aérobiose et en anaérobiose l'évolution du pH au cours du temps d'une suspension cellulaire incubée en condition de non prolifération, en présence de glucose ou de fructose. Les résultats sont rapportés sur la figure 9.

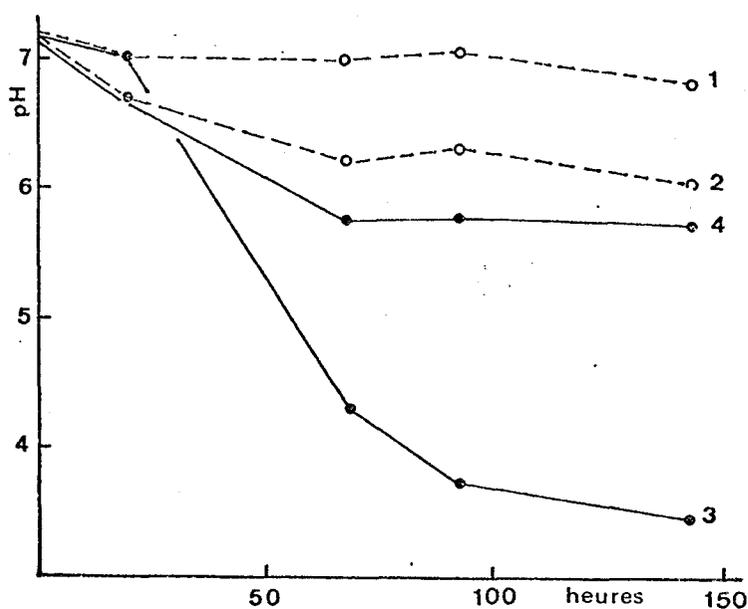


Figure 9

Evolution du pH d'une suspension cellulaire de *Rhizobium meliloti*

respirant sur :

- 1 RN^- fructosé à 1 % en aérobiose
- 2 RN^- fructosé à 1 % en anaérobiose
- 3 RN^- glucosé à 1 % en aérobiose
- 4 RN^- glucosé à 1 % en anaérobiose.

Comme nous l'avons déjà remarqué, en présence d'oxygène, nous observons que sur fructose le milieu devient très dense avec maintien du pH aux environs de la neutralité alors que sur glucose, le milieu reste très limpide et s'acidifie rapidement.

Par contre, en anaérobiose, les suspensions demeurent très limpides à la fois sur glucose et sur fructose et le pH bais-

se très peu. Cette diminution est en fait un artefact. En effet lorsqu'on mesure le pH des suspensions sous paraffine, un film d'huile reste à la surface de l'électrode et ne s'élimine que très difficilement. Il faut attendre quelques minutes avant d'avoir une stabilité du galvanomètre. Le pH de l'huile de paraffine n'étant que de 5,2, ceci peut expliquer ces valeurs un peu faibles rencontrées en anaérobiose.

Malgré cela, les écarts sont suffisamment importants pour affirmer que Rhizobium meliloti ne possède pas la faculté d'assurer la fermentation acide du glucose ou du fructose : il utilise une voie oxydative de dégradation des oses.

2) Mesures de l'oxydation du glucose et du fructose en appareil de Warburg

Les cellules de Rhizobium meliloti sont suspendues dans le système tampon RN^- additionné de glucose et de fructose à raison de 0,5 mg/fiole. Au cours d'une incubation de 240 mn à 30°C sous agitation douce, nous mesurons la quantité d'oxygène consommé par lecture manométrique directe corrigée par la constante de fiole ; le dioxyde de carbone dégagé est dans ce cas totalement absorbé par une solution de potasse à 20 %. Les résultats sont rapportés dans la figure 10.

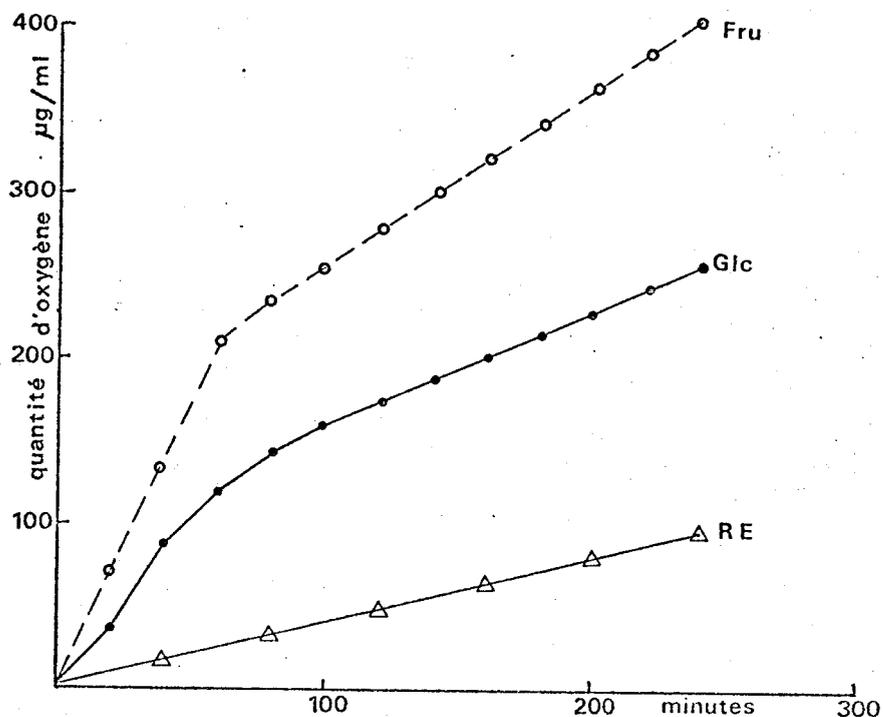


Figure 10

Courbes de consommation d'oxygène par *Rhizobium meliloti* en présence de 0,5 mg par fiole de glucose (Glc) ou de fructose (Fru). RE = Courbe de consommation d'oxygène en absence de substrat (respiration endogène).

Rhizobium meliloti consomme une importante quantité d'oxygène en présence de chacun de ces deux substrats. Si l'on considère que la quantité de gaz absorbé est utilisée à l'oxydation totale des hydrates de carbone en dioxyde de carbone et en eau, on peut préciser qu'au point d'inflexion des courbes, environ 60 % du fructose est dégradé (après 80 mn d'incubation) contre environ 45 % de glucose (après 100 mn d'incubation).

Ces résultats seront précisés et discutés ultérieurement. (chapitre V)

3) Problèmes liés à la respiration endogène de *Rhizobium meliloti*

Avant d'aborder la respiration des suspensions cellulaires en présence de certains intermédiaires du cycle de Krebs, nous devons signaler quelques particularités de comportement respira-

toire de Rhizobium meliloti.

Plusieurs faits sont à noter : consommation d'oxygène très importante sans substrat particulier, évolution de cette consommation en fonction du temps de conservation des cellules et modification des quotients respiratoires selon les lots de fabrication.

a. consommation d'oxygène lors de la respiration endogène

En mesurant la consommation d'oxygène de 3 ml de suspension bactérienne à une densité optique de 7,5 (0,5 ml de D0 9 dans 2,5 ml de tampon RN⁻) on s'aperçoit que cette absorption d'oxygène est constante au cours du temps mais est très importante alors qu'aucun substrat n'est énergétiquement consommable dans le milieu d'incubation (Tableau 8).

Temps en minutes	30	60	90	120	150	180
Quantité d'O ₂ consommé en µl	38	76	111	148	181	208

Tableau 8 : *consommation d'oxygène lors de la respiration endogène de Rhizobium meliloti.*

Deux inconvénients majeurs sont liés à ce comportement : les taux très élevés d'oxygène consommé dans ces conditions vont masquer en partie la quantité de gaz nécessaire à l'oxydation de substrats exogènes et risquent de fausser les résultats. De plus il faudra ramener très souvent les manomètres au point de départ, manipulation qui peut s'accompagner d'erreurs.

Pour ces différentes raisons, il est plus aisé de travailler avec un matériel biologique dont la respiration endogène est la plus faible possible. D'autant plus que nous ne pouvons pas connaître les modifications intervenant au niveau de cette respiration lorsque les cellules se trouvent en présence d'un substrat énergétique exogène. Plus la respiration endogène sera faible, moins ces modifications n'interféreront avec la mesure des volumes gazeux échangés lors de la dégradation de substances exogènes. Comment donc modifier cette respiration endogène sachant qu'elle correspond à l'échange des gaz résultant de l'utilisation de substances de réserves intracytoplasmiques (polyhydroxybutyrate [130,39]) nécessaires à la survie de la cellule? Compte-tenu de la facilité de conservation de Rhizobium meliloti sur des milieux très pauvres, il semble que ces souches contiennent ces substances en grandes quantités. Cette observation nous a permis de minimiser le taux de respiration endogène des suspensions bactériennes en les incubant avant utilisation à 30°C sur tampon RN⁻ en agitation moyenne durant 16 h. Les cellules sont ensuite lavées et comptées : taux de survie à cette opération 100 %.

La différence des taux de consommation d'oxygène d'un même lot de cellules, l'un conservé à + 4°C et l'autre agité 16 h à 30°C, est importante : ainsi en 165 mn les cellules agitées consomment presque 6 fois moins d'oxygène que les cellules placées à + 4°C (Figure II).

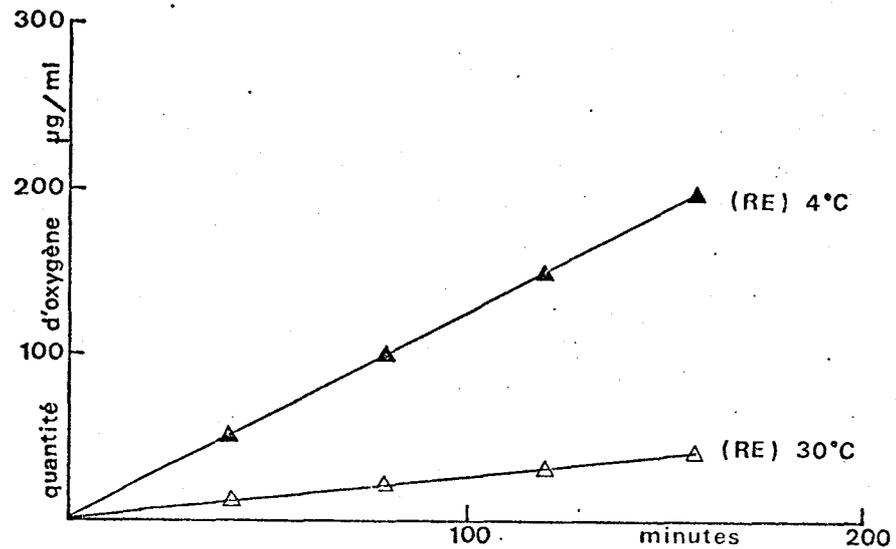


Figure II

Consommation d'oxygène durant la respiration endogène (RE) de suspensions de cellules de Rhizobium meliloti :

(RE) 4°C : cellules conservées à 4°C après culture

(RE) 30°C : cellules agitées à 30°C durant 16 h.

b. évolution du taux de consommation d'oxygène en fonction du temps de conservation des cellules

Les temps de conservation des suspensions bactériennes à 4°C en tampon RN⁻ étant au moins de 4 jours sans lésions importantes, nous utilisons les mêmes lots de cellules lors de plusieurs manipulations. Nous remarquons que les taux de consommation d'oxygène correspondant à la respiration endogène augmentent avec les temps de conservation à 4°C (Tableau 9). Cette constatation est faite pour les cellules préparées aussi bien par culture sur glucose (Rhizobium meliloti G) que sur fructose (Rhizobium meliloti F

Temps de conservation à 4° C (en jours)		Rm G QO ₂ en µl	Rm F QO ₂ en µl
Série 1	I	15,46	41,73
	I6	65,69	109,63
Série 2	I	67,7	—
	I5	97,9	—

Tableau 9 : Evolution de la quantité d'oxygène consommé (QO₂) en 180 mn lors de la respiration endogène de *Rhizobium meliloti* G et (Rm G et Rm F) conservé de I à I6 jours à + 4°C.

Ce phénomène reste encore inexpliqué.

c. Variabilité des coefficients respiratoires selon les lots de fabrication

Le coefficient respiratoire est fonction de la nature du ou des substrats dégradés. Les conditions de préparation des cellules étant standardisées, on pourrait s'attendre à avoir des valeurs de coefficients respiratoires stables. Or celles-ci varient assez largement en fonction des lots de fabrication (Tableau 10).

Lots de fabrication	QO ₂ /QCO ₂	
	Rhizobium G	Rhizobium F
1	1,14	—
2	0,99	0,96
3	0,78	—
4	0,79	1,01
5	0,79	—
6	0,92	—
7	0,65	0,81

Tableau 10 : Valeurs des coefficients respiratoires lors de la respiration endogène de *Rhizobium meliloti* G et F en fonction des lots de fabrication.

La diversité de ces coefficients est en faveur de l'existence de plusieurs substances de réserve en quantité relative variable au sein du cytoplasme des cellules.

4) Respiration de *Rhizobium meliloti* à partir de différents intermédiaires du cycle de Krebs

a. respiration sur pyruvate de sodium

Les essais sont réalisés sur 1 mg de pyruvate de sodium (en équivalent acide) dans les 3 ml du contenu de la fiole (333 μ g/ml). On mesure en parallèle la consommation d'oxygène due à la respiration endogène et la consommation d'oxygène en présence du substrat (Figure I2).

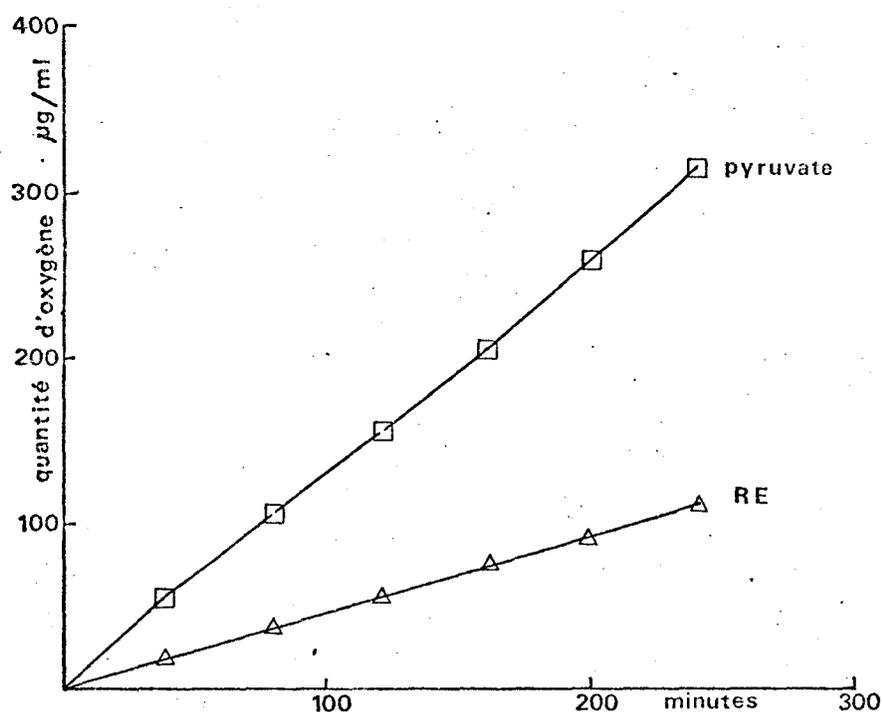
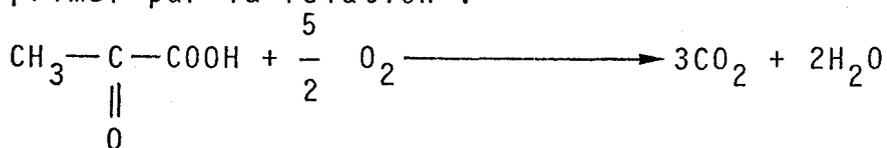


Figure I2

Respiration de *Rhizobium meliloti* en présence de pyruvate de sodium (333 μ g/ml).

L'acidification du milieu réactionnel en fin de manipulation permet le dégagement de 372 μ l de dioxyde de carbone, ce qui nous donne un quotient respiratoire $Q_R = 0,84$.

Théoriquement, l'oxydation totale du pyruvate peut s'exprimer par la relation :



Ceci correspond à un quotient théorique de 0,83.

Q_R expérimental = 0,84

Q_R théorique = 0,83

On peut donc penser que le pyruvate de sodium est totalement oxydé en eau et en dioxyde de carbone. Mais sa vitesse de dégradation, quoique constante, reste très faible : 49,4 % seulement du substrat est dégradé en 4 h d'incubation. Plusieurs raisons peuvent être invoquées :

- le système perméasique d'entrée du pyruvate de sodium dans la cellule fonctionne mal.
- l'utilisation du pyruvate de sodium libère une base forte qui augmente le pH du milieu réactionnel et inhibe certaines activités enzymatiques.
- le cycle de Krebs tourne lentement à cause d'une arrivée massive de pyruvate de sodium par rapport aux composés accepteurs en C₄.

Chacune de ces hypothèses est vérifiée :

- lors de la respiration sur 1 mg de substrat, le pH varie de 6,95 au départ à 7,6 après 240 mn d'incubation. Ces valeurs restent très proches de la neutralité et ne doivent pas influencer le métabolisme cellulaire global.
- nous avons suivi la consommation d'oxygène sur 0,5 mg de pyruvate seul et sur un mélange de 0,5 mg de pyruvate et 0,05mg de malate de sodium par fiole.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 11.

Temps en mn	20	40	60	80	100	120	140	160
R.E. (QO_2 en μl)	14,8	30,2	50,8	66,3	81,7	99,8	113,9	130,7
R. sur 0,5 mg de pyruvate (QO_2 en μl)	25,7	46,5	66,3	85,1	101,9	117,8	134,6	153,4
R. sur 0,5 mg de pyruvate et 0,05 mg de malate (QO_2 en μl)	27,3	53,4	80,7	110,4	128,2	146	161,6	180,4

Tableau 11 : quantité d'oxygène consommé par *Rhizobium meliloti* sur pyruvate de sodium et sur un mélange pyruvate de sodium-malate de sodium.

Nous constatons :

- que sur 0,5 mg de pyruvate la respiration suit exactement celle qui est endogène. Or *Rhizobium meliloti* est capable d'oxyder ce substrat. Donc à cette concentration (166 $\mu g/ml$), le pyruvate de sodium passe mal la barrière membranaire.

- qu'en présence de malate de sodium, une légère différence de consommation d'oxygène durant les 80 premières minutes est suivie d'une consommation normale correspondant à la respiration endogène (Figure I3).

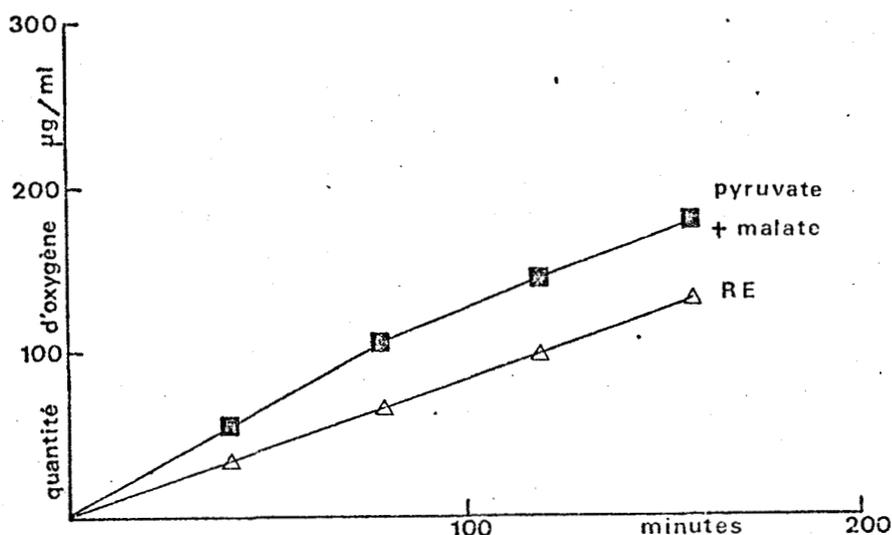


Figure I3

Respiration de *Rhizobium meliloti* en présence d'un mélange de pyruvate de sodium (166 $\mu g/ml$) et de malate de sodium (16,6 $\mu g/ml$)

L'oxydation totale de l'acide malique peut s'écrire :

$$\text{COOH} - \text{CHOH} - \text{CH}_2 - \text{COOH} + 3\text{O}_2 \longrightarrow 4\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}.$$

L'oxydation totale de 0,05 mg d'acide malique consommerait théoriquement 25,2 μl d'oxygène. Or, au point d'inflexion de la courbe de respiration (après 80 mn d'incubation), nous observons une différence de consommation d'oxygène de 25,3 μl avec celle correspondant à la respiration en présence de pyruvate à ce même temps.

Nous pouvons donc conclure que :

- l'acide pyruvique pénètre mal dans la cellule à des concentrations de 166 $\mu\text{g/ml}$ (0,5 mg/3 ml de milieu réactionnel) mais le système perméasique fonctionne à des concentrations de 330 $\mu\text{g/ml}$.

- le quotient respiratoire mesuré sur substrat pyruvique nous démontre que la molécule est totalement oxydée en eau et en dioxyde de carbone.

- de même la consommation d'oxygène mesurée en présence d'acide malique rejoignant exactement la valeur théorique, nous pouvons affirmer que cet intermédiaire est totalement oxydé.

b. respiration sur succinate de sodium

Les essais sont tout d'abord réalisés sur 1 mg de succinate de sodium (en équivalent acide) dans les 3 ml du contenu de la fiole (333 $\mu\text{g/ml}$). On mesure parallèlement la consommation d'oxygène due à la respiration endogène et la consommation d'oxygène en présence du substrat (figure I4).

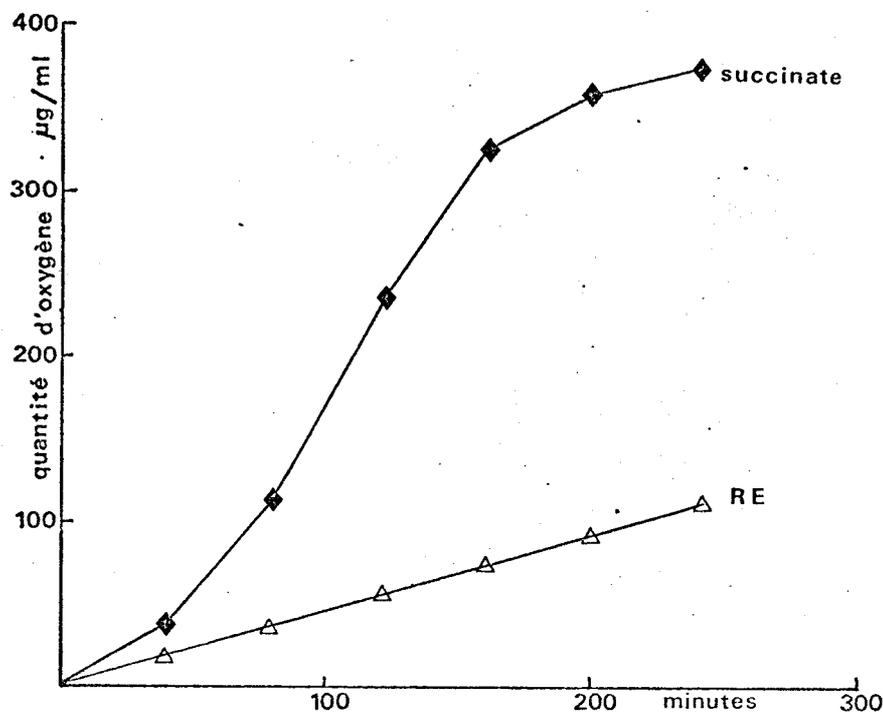


Figure I4

Respiration de *Rhizobium meliloti* en présence de succinate de sodium (333 µg/ml).

La courbe de consommation d'oxygène n'est linéaire qu'entre 60 et 140 mn. Le substrat n'est pas oxydé immédiatement, ce qui est en faveur de l'induction d'un système enzymatique, soit de pénétration dans le cytoplasme (perméases), soit de dégradation ou les deux à la fois.

La vitesse d'oxydation régulièrement décroissante à partir de 140 mn de contact traduit une inhibition du système de dégradation. Or le pH du milieu réactionnel, ajusté au départ à 7,1 est passé en 240 mn à 9,2. Nous pouvons donc espérer obtenir une courbe de respiration plus régulière en limitant la quantité de substrat carboné à 166 µg/ml et en augmentant le pouvoir tampon du milieu RN^- .

Nous avons au préalable vérifié que la force ionique du système tampon RN^- ne modifiait pas trop le métabolisme de *Rhizobium meliloti* en utilisant comme source de carbone le glucose (figure I5).

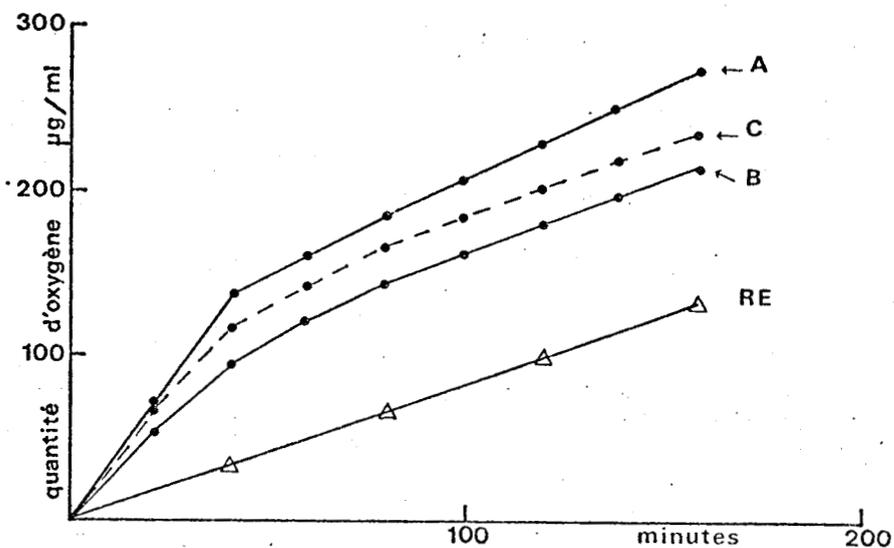


Figure I5

Respiration de Rhizobium meliloti sur des quantités identiques de glucose (166 µg/ml) en solution dans :

- A : tampon RN^-
- B : tampon RN^- concentré 1,5 fois
- C : tampon RN^- concentré 2 fois.

Nous avons donc pu concentrer deux fois le système tampon RN^- pour l'étude de la respiration de Rhizobium meliloti aux dépens du succinate de sodium. La courbe de consommation d'oxygène obtenue est nettement plus régulière (figure I6).

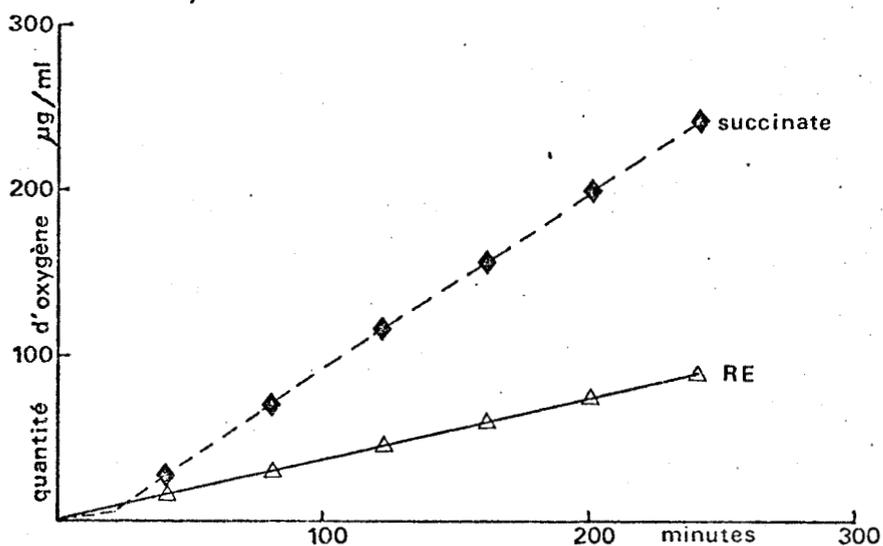
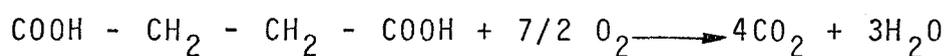


Figure I6

Respiration de Rhizobium meliloti sur succinate de sodium (166 µg/ml) dans le tampon RN^- concentré deux fois.

Le pH du milieu réactionnel ajusté à 7 au départ n'est que de 8,3 en fin de manipulation. Dans ces conditions la vitesse d'oxydation reste constante au cours du temps jusqu'au temps 260 mn, après lequel elle rejoint presque la respiration endogène. Le quotient respiratoire, calculé d'après les valeurs d'oxygène consommé et de dioxyde de carbone dégagé est de 0,879.

Théoriquement, l'oxydation totale de l'acide succinique peut s'exprimer par la relation :



soit un quotient respiratoire théorique de 0,875.

$$Q_R \text{ expérimental} = 0,879$$

$$Q_R \text{ théorique} = 0,875$$

Si l'on considère que jusqu'au point d'inflexion de la courbe, tout l'oxygène consommé est utilisé à l'oxydation totale du substrat, on peut déduire qu'au temps $t = 260$ mn, 81 % de l'acide succinique est totalement oxydé.

En conclusion, nous pouvons dire que le succinate est un bon substrat pour Rhizobium meliloti. Son utilisation aboutit à son oxydation complète en dioxyde de carbone et en eau.

c. respiration sur α -céto-glutarate de sodium

Ce substrat est essayé à une concentration de 333 $\mu\text{g/ml}$. De la même façon que précédemment, on mesure parallèlement la consommation d'oxygène due à la respiration endogène des cellules en suspension dans le tampon RN^- et la consommation d'oxygène en présence du substrat (Tableau 12).

Temps en mn	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
Respiration endogène	23	32	44	53	62	69	77	86	98	113	120	129
Respiration sur α céto-glutarate	16	28	45	53	64	74	83	95	106	115	124	135

Tableau 12 : quantité d'oxygène, en μl , consommé par *Rhizobium meliloti* en présence d' α céto-glutarate de sodium (333 $\mu\text{g/ml}$).

Le pH ajusté à 7,2 au départ est de 7,35 après 240 mn. Les taux de consommation sont pratiquement identiques en présence ou en absence de substrat. Pour les mêmes raisons que pour le pyruvate, nous avons testé la respiration sur α céto-glutarate de sodium en présence de malate de sodium en quantité dix fois moindre que le substrat principal (Tableau 13).

Temps en mn	20	40	60	80	100	120	140	160
R:E	14,8	30,2	50,8	66,3	81,7	99,8	113,9	130,7
Respiration sur α céto-glutarate	24,4	44,1	66,1	82,4	97,5	107,9	121,8	138,1
Respiration sur α céto + malate	24	48	68,4	93,6	110,4	123,6	140,4	158,4

Tableau 13 : quantité d'oxygène consommé par *Rhizobium meliloti* sur α céto-glutarate de sodium (333 $\mu\text{g/ml}$) et d'un mélange d' α céto-glutarate de sodium (333 $\mu\text{g/ml}$) et de malate de sodium (33,3 $\mu\text{g/ml}$).

Dans le cas de la respiration en présence d'un composé en C_4 nous avons une consommation d'oxygène plus importante. Au temps $t = 160$ mn, l'écart est de $20,3 \mu\text{l}$. Il pourrait correspondre à l'oxydation du malate ajouté.

En conclusion, nous pouvons dire que l'acide α céto-glutarique n'est pas utilisé par Rhizobium meliloti. Or cette molécule est décrite comme étant l'accepteur [4,71,100] de l'azote gazeux préalablement réduit en ammoniac par la nitrogénase [7, 69,70] dans les bactéroïdes issus des formes bacillaires. Les souches de Rhizobium doivent être en mesure de synthétiser à partir d'autres intermédiaires cet acide α cétonique mais ne possédant le système perméasique adéquat, elles sont incapables de l'intégrer lorsqu'il est présent dans le milieu ambiant.

d. respiration sur glyoxylate de sodium

Ce substrat est testé à la concentration de $333 \mu\text{g/ml}$. La mesure de la consommation d'oxygène lors de la respiration endogène de la souche et de la consommation d'oxygène lors de l'oxydation du substrat permet l'établissement des courbes de la figure 17.

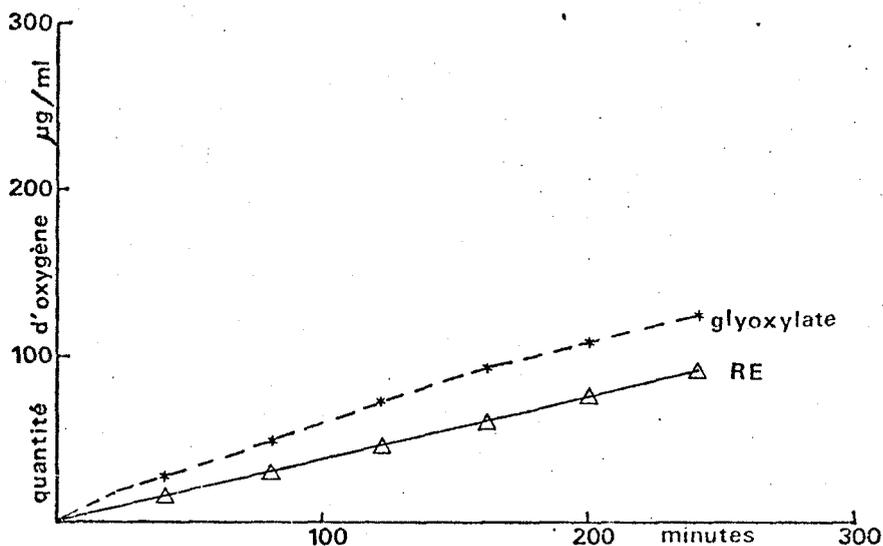
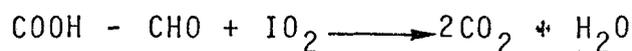


Figure 17

Respiration de Rhizobium meliloti sur glyoxylate de sodium

($333 \mu\text{g/ml}$) dans le tampon $\text{pH} = 7,2$

L'oxydation totale du glyoxylate nécessite une molécule d'oxygène par molécule de substrat :



ce qui donne un quotient respiratoire théorique de 0,5.

Or notre quotient respiratoire expérimental est de 0,72

$$Q_R \text{ expérimental} = 0,72$$

$$Q_R \text{ théorique} = 0,5$$

On peut en conclure que le glyoxylate est oxydé pour le Rhizobium meliloti mais sa dégradation n'est pas complète pendant les temps d'incubation choisis.

e. conclusion

Rhizobium meliloti possède un potentiel enzymatique suffisant pour oxyder les sels de sodium des acides pyruvique, malique, succinique et glyoxalique. Nous pouvons conclure que le cycle de Krebs fonctionne très bien sans pouvoir affirmer que le by-pass du glyoxylate est complet.

5) Croissance sur différents intermédiaires du cycle de Krebs :

Les enregistrements de la croissance au biophotomètre de Bonet, Maury et Jouan sont exprimés en pourcentage de lumière transmise par les suspensions bactériennes, le 100 % de transmission étant réglé sur chaque milieu au temps $t = 0$ de la culture.

Ces enregistrements permettent de visualiser, plus facilement qu'en densité optique, les phases de latence et les phases d'accélération précédant les phases exponentielles de croissance.

a. croissance sur milieu complet

Nous constatons sur la figure I8 que la phase de latence est très courte en présence de succinate ou de pyruvate de sodium alors qu'en présence de citrate de sodium, elle dure environ 12 h. Les phases d'accélération sont respectivement plus rapides sur citrate, succinate et pyruvate.

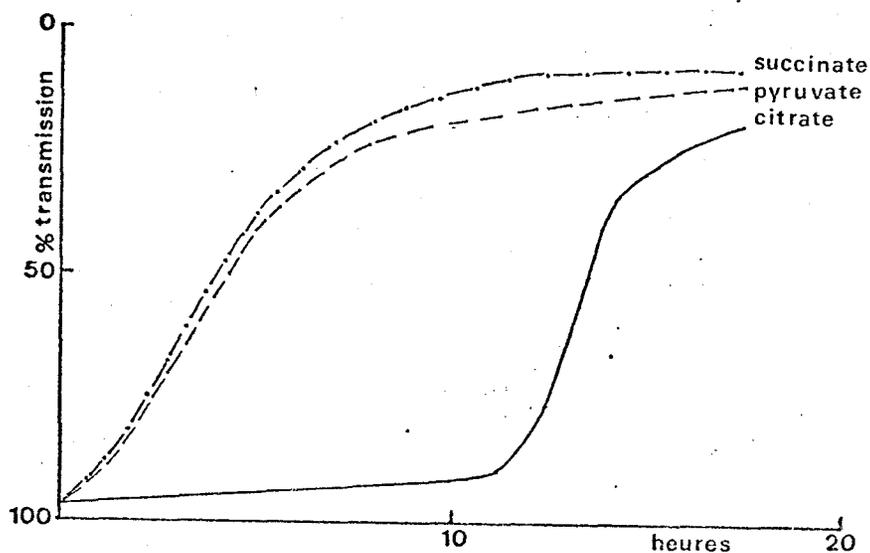


Figure I8

Croissance de Rhizobium meliloti sur milieu RC additionné d'un substrat carboné à la concentration de 1 %.

On peut se demander si la phase de latence en présence de citrate de sodium correspond à l'induction d'une perméase ou à l'induction d'un système enzymatique permettant la dégradation et l'utilisation des mannanes de l'extrait de levure contenu dans le milieu RC. Nous avons donc réalisé la même expérience sur le milieu minimum R.

b. croissance sur milieu minimum

Dans ce milieu la source d'azote n'est constituée que de nitrate d'ammonium. Les résultats sont représentés sur la figure I9.

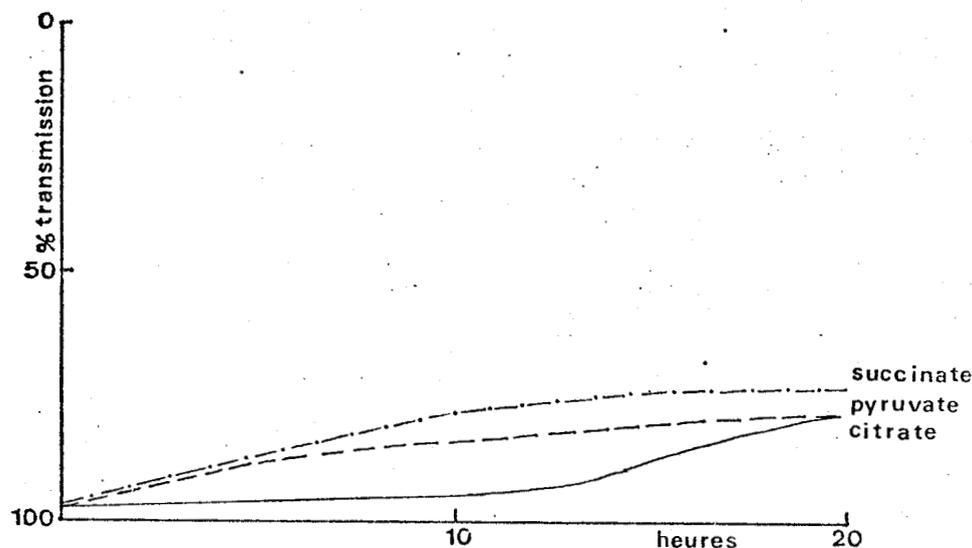


Figure 19

Croissance de Rhizobium meliloti sur milieu minimum R additionné d'un substrat carboné à la concentration de 1 %.

Nous obtenons la même image d'ensemble. La phase de latence en présence de citrate de sodium correspond donc à l'induction d'un système de pénétration ou de dégradation de cette molécule.

Les trois substrats, choisis parmi les intermédiaires du cycle de Krebs peuvent donc être utilisés pour la croissance de Rhizobium meliloti.

C - CONCLUSION

=====

Nous constatons que :

- d'une part, Rhizobium meliloti est incapable de réaliser la fermentation acide d'oses simples, tels le glucose et le fructose. L'acidification des milieux réactionnels lors de sa culture ou de sa respiration en systèmes non proliférants à partir de glucose est dépendante de la présence d'oxygène.

- d'autre part, Rhizobium meliloti possède tout le potentiel enzymatique nécessaire à la dégradation des substrats du métabolisme intermédiaire oxydatif. Il n'est déficient qu'au niveau de certaines perméases.

Le cycle de Krebs peut donc fonctionner normalement chez Rhizobium meliloti, complété peut-être par le by-pass du glyoxylate.

IV

I D E N T I F I C A T I O N D E L A F R A C T I O N A C I D E
S ' A C C U M U L A N T E N P R E S E N C E D E G L U C O S E

I V I D E N T I F I C A T I O N D E L A F R A C T I O N
A C I D E S ' A C C U M U L A N T E N P R E S E N C E D E
G L U C O S E

Rhizobium meliloti possède donc un cycle de Krebs fonctionnel. Or en présence de glucose, il accumule dans son milieu de suspension un ou plusieurs acides, dont la présence se traduit par une baisse de pH. Celle-ci est néfaste à l'activité du complexe enzymatique nécessaire à la synthèse du polyside [19]. Ainsi le glucose inhiberait la formation du mucus non pas par sa seule présence mais par l'accumulation d'un de ses produits de dégradation. Il semble à priori que ce ou ces produits soient des intermédiaires se trouvant en aval du cycle de Krebs, donc du pyruvate, et dont l'apparition résulterait soit de l'inexistence d'un enzyme sur la chaîne métabolique, soit de son mauvais fonctionnement.

Il convient donc d'identifier cette fraction acide pour mieux comprendre le mécanisme d'utilisation du glucose par Rhizobium meliloti.

A - MATERIEL ET METHODES

=====

1) Préparation et Purification de la fraction acide

a. préparation de la fraction acide :

Nous remarquons que le pH descend plus rapidement dans les systèmes cellulaires non proliférants comparés aux cultures sur milieu complet. La libération de produits acides y est donc plus rapide, vraisemblablement à cause de la densité importante de cellules dès le début d'incubation.

Nous réalisons donc une culture de Rhizobium meliloti sur deux litres de milieu RC glucosé à 1 % durant 16 heures à 30° C sous agitation moyenne. Les cellules, centrifugées et lavées deux fois dans le tampon RN⁻, sont mises

à nouveau en suspension dans un litre de milieu RN⁻ glucosé à 1 %. La concentration cellulaire est de 3.10^9 bactéries/ml. Ces cellules étant incubées à 30° C sous agitation moyenne, nous contrôlons la libération de produits acides par la mesure régulière du pH du milieu (tableau 14).

Temps d'incubation en heures	pH
0	7,1
50	5,4
92	4,2
116	3,9

TABLEAU 14 : Evolution du pH d'une suspension cellulaire de 3.10^9 bactéries/ml sur milieu RN⁻ glucosé à 1 %, et incubé à 30° C sous agitation moyenne.

Après 116 heures d'incubation, les cellules sont éliminées par centrifugation à 16 300 g pendant 20 minutes. Le surnageant limpide contient la totalité de la fraction acide.

b. purification de la fraction acide :

Le surnageant contient alors en solution :

- les composants du tampon RN⁻ : $\left\{ \begin{array}{l} \text{KH}_2\text{PO}_4 \\ \text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O} \end{array} \right.$
- le polyoside synthétisé aux dépens de la source de carbone
- le glucose en excès
- les produits de catabolisme dont la fraction acide.

α. Elimination du polyoside

Le polyoside est relargué par l'addition de 3 volumes d'éthanol et une pincée d'acétate de sodium. La précipitation est poursuivie une nuit à

+ 4° C. La majorité des fibres formées est éliminée à la baguette de verre, le reste l'étant par filtration sur papier. L'ensemble du précipité est regroupé et dissout dans l'eau distillée.

. pH eau distillée : 5,7

. pH solution aqueuse polyoside : 5,45

La précipitation alcoolique des polyosides n'a donc pas entraîné de produits acides.

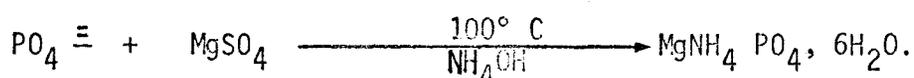
L'ensemble de la phase liquide est concentré 12 fois à l'évaporateur rotatif sous vide, type Büchi à 30° C.

L'alcool éthylique est ainsi totalement éliminé ainsi qu'une partie de la phase aqueuse.

3. Elimination des ions phosphates

L'étude de la nature des produits acides libérés faisant appel à des techniques de chromatographie sur papier, la suppression des ions phosphates est nécessaire pour éviter les phénomènes de trainées.

Les ions phosphates sont éliminés de la phase liquide sous forme de sels ammoniacaux magnésiens qui précipitent à chaud :



Pour ne pas se trouver en excès d'ions magnésium nous tenons compte de ceux déjà présents dans le milieu au départ. Nous obtenons finalement une solution purifiée ne contenant plus que le glucose en excès et les produits de catabolisme.

2) Méthodes d'identification :

L'emploi des techniques de séparations électrophorétique et chromatographique des composés de cette solution a abouti à l'identification d'une substance dont le comportement est identique à celui de l'acide 2 ceto-gluconique. Nous avons vérifié l'identité de cette substance par la fabrication des

dérivés du type hydrazones, méthylesters et quinoxalinols.

a. séparation électrophorétique :

Nous avons utilisé l'électrophorèse de zone à basse tension (400 Volts) dans un appareil en toit du type DURRUM [33]. Le papier Whatman 3 est choisi pour sa résistance mécanique.

L'identification de la fraction acide s'accumulant lors du métabolisme intermédiaire est réalisée dans différents systèmes tampons :

- tampon de Michl [96]

Pyridine	3	ml	} pH 3,9
Acide acétique	10	ml	
Eau distillée	400	ml	

- tampon de Haugh et Larsen [51]

Borate de sodium (Borax)	0,01	M	} pH 9,2
CaCl ₂	0,005	M	

- tampon Véronal/EDTA

Véronal de sodium	12,37	g	} pH 8,6
EDTA, sel de sodium	2,6	g	
Eau distillée	QSP 1 000	ml	

Les temps de migration sont variables et sont respectivement de 15 heures, 7 heures 30 et 6 heures.

Deux types de révélateurs sont employés :

- le vert de bromocrésol dont la zone de virage du jaune au bleu se situe de pH 3,8 à 5,4. Bien connu des auteurs pour la révélation des acides [28, 87, 97, 98], il est solubilisé dans l'éthanol à 95° à la concentration de 0,1 %. Sa pulvérisation sur les électrophorégrammes séchés à la température ambiante sous hotte ventilée laisse apparaître les acides en jaune sur fond vert. Le contraste peut être amélioré selon BRYANT et OVERELL [14] en ajoutant au réactif un peu d'ammoniaque concentrée. Nous avons préféré comme LATURAZE [81] placer nos feuilles quelques secondes dans les vapeurs d'ammoniac. Les

acides apparaissent alors jaune sur fond bleu intense.

- l'oxalate d'aniline [107] pour mettre en évidence les acides 2 céto-gluconique et 5 céto-gluconique. Après pulvérisation du réactif, le passage de la feuille à l'étuve à 105° C durant 20 mn les fait apparaître respectivement rose et jaune sur fond blanc. Pour cette révélation, l'élimination des ions boratés du tampon de Haugh et Larsen [51] est nécessaire ; elle est effectuée par pulvérisation de méthanol acétique [99].

b. séparation chromatographique :

Nous faisons appel à deux types de séparation chromatographique

- chromatographie de partage descendante sur papier
- chromatographie d'adsorption ascendante sur gel de silice.

α. la chromatographie de partage sur papier

Notre choix du papier Whatman n° 3 est basé sur la qualité de sa texture, granuleuse et à fibres peu serrées, qui permet une vitesse rapide d'écoulement du solvant tout en conservant un taux de résolution suffisant.

Trois systèmes solvants organiques acides sont employés :

- | | | |
|--|---------|----|
| [107] (1) - Butanol / Acide Acétique / Eau | 4/1/5 | v/ |
| [81] (2) - Butanol / Acide Formique / Eau | 7/3/12 | v/ |
| [92] (3) - Propanol / Methyl benzoate / Acide formique / Eau | 7/3/2/5 | v/ |

La préparation des solvants se fait dans une ampoule de décantation. Vingt quatre heures de repos aux mélanges (1) et (2) sont nécessaires à la séparation nette des phases aqueuses inférieures servant à saturer l'atmosphère de la cuve et des phases organiques supérieures utilisées à la séparation des constituants de notre solution purifiée. Pour le mélange (3) il faut attendre au minimum 4 jours pour avoir une séparation nette des deux phases.

Les migrations se poursuivent respectivement durant 15 heures 30 et 17 heures et 15 heures. Les révélations se font par l'oxalate d'aniline sur les feuilles préalablement séchées sous hotte ventilée. Nous remarquons à ce

propos que l'élimination de l'acide formique est plus aisée que celle de l'acide acétique.

β. la chromatographie d'adsorption sur gel de silice

Le gel de silice est coulé en couche mince (0,25 mm d'épaisseur) sur plaque de verre 20 x 20 cm.

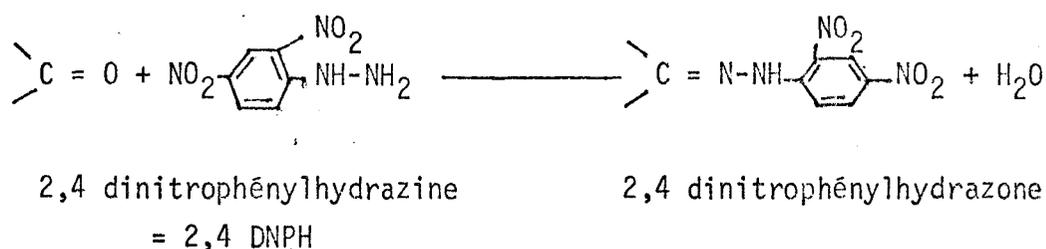
La séparation se réalise en chambre saturée durant 4 heures 30 au cours de la migration du solvant préconisé par CHEFTEL et coll. [18] :

Ethanol / Ammoniaque / Eau 80/5/15 v/v

La révélation est faite par l'oxalate d'aniline après séchage de la plaque sous courant d'air froid.

c. fabrication des dérivés 2,4 dinitrophénylhydrazones :

Les méthodes précédentes nous laissent supposer la présence d'acide carboxylique α-cétonique dans notre solution purifiée. Or la caractérisation des composés carbonylés, aldéhydes ou cétones, peut être résolue par l'identification des hydrazones qui leur correspondent.



Nous avons utilisé la 2,4 dinitrophénylhydrazine en solution dans l'acide chlorhydrique comme le conseille ALLEN [1].

La technique classique de condensation à chaud ne peut pas être employée afin d'éviter l'oxydation éventuelle des α-hydroxycétones. De ce fait nous avons préféré la méthode à froid décrite par SELIGSON et SHAPIRO [114] pour l'identification des acides α-cétoniques dans les liquides biologiques : urine et sang.

La condensation du réactif et du substrat se fait par contact à la température ambiante durant 30 mn. Le dérivé 2-4 dinitrophénylhydrazone formé est purifié par extractions successives dans les solutions chloroforme /

Ethanol (C_2H_5OH à 20 % dans $CHCl_3$) et carbonate de sodium (solution aqueuse Na_2CO_3 1,0N). Il est obtenu finalement sous forme de précipité après avoir été séché en courant d'air sec filtré.

Dissout à nouveau dans un tampon glycolle / NaOH 0,1M à pH 7,4, il est chromatographié sur papier Whatman 3 traité au préalable par ce même tampon pulvérisé. Le système solvant de CAVELLINI [17] donne des spots qui ne sont pas toujours nets. Aussi nous lui préférons le système de HARWARY et THOMPSON [50] : Butanol / Ethanol / Ammoniaque 0,5N 7/1/2 v/v.

Nous avons traité de cette manière l'acide pyruvique, l'acide 2 céto-gluconique, l'acide 5 céto-gluconique, l'acide α -cétoglutarique et notre solution purifiée.

d. fabrication des dérivés méthyl-esters :

L'estérification des fonctions hydroxy- par un groupement méthyl est l'un des moyens utilisés pour stabiliser les molécules d'acides organiques hydroxylés et permet ainsi la mesure de leurs points de fusion. Nous en devons le mode opératoire à FOURNET.*

Le réactif d'estérification est le méthanol anhydre (récemment distillé) dans lequel on fait buller l'acide chlorhydrique gazeux jusqu'à la concentration finale de 0,5N.

La réaction se fait en tube fermé hermétiquement à 80° C durant 2 heures, à raison de 10 mg de produit à méthyler pour 5 ml de méthanol chlorhydrique. La solution est ensuite évaporée à sec sous courant d'air filtré.

Le résidu est lavé par 5 ml d'un mélange méthanol / acétone 50/50 et à nouveau séché. La cristallisation se poursuit pendant 48 heures à partir du dioxanne [110].

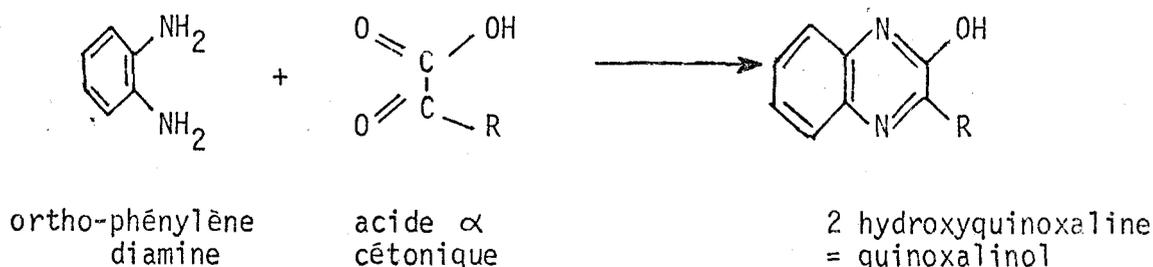
La réaction est faite sur un témoin 2 cétogluconate de calcium et sur

Nous remercions vivement M. FOURNET, Maître de Conférences, Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et des Techniques de LILLE I.

la fraction acide, préparée à partir de notre solution purifiée par électrophorèse préparative en tampon de MICHL. La bande de papier correspondant à la fraction acide est éluée par l'eau distillée et concentrée par évaporation sous vide.

e. formation de dérivés quinoxalins :

L'orthophénylène diamine (1,2 diamino benzène) réagit avec les acides α -cétoniques pour former des quinoxalins [54,55,101,115] :



Les avantages de ces dérivés comparés à ceux des 2,4 dinitrophenylhydrazones sont leur plus haute spécificité pour la fonction α -cétonique et leur stabilité plus grande.

Nous avons utilisé la méthode décrite par LANNING et COHEN [80] pour la détection et le dosage des acides 2 céto-hexoniques :

- 1 ml d'orthophénylène-diamine, préparée extemporanément à raison de 15 mg/ml en solution aqueuse d'HCl 0,25 N, est ajoutée à une solution contenant de 10 à 100 μ g d'acide 2 céto-hexonique.

- porté au bain-marie bouillant durant 30 minutes, le mélange est refroidi lentement à la température du laboratoire.

- la densité optique est mesurée en cuve de quartz dans l'U.V. proche : 330 et 360 nm.

Le rapport de la densité optique à 330 nm et de celle lue à 360 nm est de $1,51 \pm 0,07$ pour les solutions contenant des acides 2 céto-hexoniques [80].

Les spectres d'absorption de l'orthophénylène diamine et des dérivés quinoxalins sont vérifiés sur spectrophotomètre U.V. Unicam SP 800 à défilement automatique des longueurs d'onde.

Comme pour la fabrication des dérivés méthyls-esters la réaction est faite sur un échantillon d'acide 2 céto-gluconique commercial et sur notre fraction-acide préparée comme il est décrit précédemment pour la fabrication des dérivés méthyl-esters.

B - RESULTATS

=====

1) Mise en évidence d'une substance à comportement électrophorétique et chromatographique identique à celui de l'acide 2 céto-gluconique

a. électrophorèses:

Nous avons tout d'abord comparé, dans le tampon de MICHL, la mobilité des constituants séparés à partir de notre solution purifiée par rapport à toute une série d'acides du métabolisme intermédiaire. Les coefficients de migration de chacun d'entre eux sont calculés pour chaque système de séparation en fonction de la substance la plus mobile dans le système (tableau 15).

Intermédiaires témoins	Coefficients de migration
Ac. pyruvique	1
Ac. α céto-glutarique	0,88
Ac. glyoxalique	0,85
Ac. citrique	0,74
Ac. 2 céto-gluconique	0,66
Ac. 5 céto-gluconique	0,60
Ac. gluconique	0,56
Ac. succinique	0,54
Ac. ascorbique	0,45
Glucose	0,28

TABLEAU 15 : Coefficients de migration de différents intermédiaires lors de l'électrophorèse en tampon de MICHL (400 Volts, 15 heures).

La solution purifiée se sépare en deux constituants seulement :

- l'un possède un coefficient de migration de 0,28, identique à celui du glucose témoin et qui ne se révèle qu'à l'oxalate d'aniline. Il s'agit du glucose en excès dans le milieu de non prolifération que nous retrouverons à chaque fois.

- l'autre beaucoup plus acide possède un coefficient de migration par rapport à l'acide pyruvique de 0,66, coefficient correspondant à l'acide 2 céto-gluconique. Ce constituant est appelé fraction acide (F.A.) de notre solution purifiée et ce pour toute la suite de nos manipulations.

Nous avons voulu vérifier l'identité des coefficients de migration de l'acide 2 céto-gluconique témoin et de notre fraction acide dans deux systèmes tampons basiques dont l'un à base de borate de sodium, peut modifier considérablement les caractères de mobilité des constituants possédant des fonctions hydroxy en α (tableau 16).

Substrats	Coefficients de migration en	
	tampon pH 8,6	tampon pH 9,2
Ac. 2 céto-gluconique	1	0,82
Ac. 5 céto-gluconique	0,97	1
Glucose	0,46	0,43
Fraction acide	1	0,82

TABLEAU 16 : Valeurs des coefficients de migration de la fraction acide et de différents témoins lors d'électrophorèses dans :

- le tampon de HAUGH et LARSEN pH 9,2 : 400 V 7,5 h
- le tampon Véronal/EDTA pH 8,6 : 400 V 6 h

Lors de l'utilisation du glucose par Rhizobium meliloti, la fraction acide qui s'accumule ne semble être constituée que d'un seul produit dont la mobilité dans un champ électrique est identique à celle de l'acide 2 cêto-gluconique.

b. chromatographies :

La présence soupçonnée d'acides organiques dans notre solution purifiée à analyser nous a amenés à éviter l'emploi de solvants organiques neutres. En effet, les acides organiques sont plus ou moins ionisés en fonction du pH. Dans les solvants neutres, ils se chromatographient mal car la forme ionisée a un Rf supérieur à celui de la molécule non dissociée. L'emploi de tels systèmes solvants fait migrer les acides sous forme de trainées, très gênantes, ainsi que l'ont montré LUGG et OVERELL [86].

Nous avons donc utilisé des solvants organiques acides qui permettent non seulement la migration régulière des constituants acides mais aussi suppriment les effets d'adsorption sur le papier. Pour la chromatographie sur couche mince nous avons choisi un système solvant basique (tableau 17)

Substrats	Systèmes solvants		
	1 { BuOH AcOH Eau	2 { BuOH HCOOH Eau	3 { EtOH NH ₄ OH Eau
Ac. 2 cêto-gluconique	0,28	0,49	0,64
Ac. 5 cêto-gluconique	1	1	< 0,5 (trainée)
Glucose	0,70	0,34	1
Fraction acide	0,28	0,49	0,64

TABLEAU 17 : Valeurs des coefficients de migration relative lors des chromatographies descendante sur papier (1,2) et ascendante sur couche mince (3)

La chromatographie confirme l'identité de comportement de notre fraction acide avec le témoin 2 céto-gluconique. Or MACEK et coll.[92] ont publié la valeur des coefficients de migration d'un grand nombre d'acides organiques cétoniques obtenus lors de la séparation chromatographique sur papier dans le système solvant suivant :

Propanol / Méthyl benzoate / Acide Formique / Eau
7 / 3 / 2 / 5 v / v.

Nous avons renouvelé l'expérience et avons voulu comparer les valeurs des coefficients de migration de nos substances avec celles déjà connues (tableau 18).

Substrats	Coefficients de migration		
	publiés	expérimentaux	
		Manip. 1	Manip. 2
Ac. 5 céto-gluconique	1	1	1
Ac. 2 céto-gluconique	0,66	0,77	0,79
Fraction Acide	-	0,78	0,79

TABLEAU 18 : Valeurs des coefficients de migration d'acides cétoniques lors de leur chromatographie sur Whatman 3 dans le système solvant de MACEK et TADRA.

Nous remarquons que dans cet autre système solvant, notre fraction acide s'identifie à nouveau à l'acide 2 céto-gluconique mais les coefficients de migration mesurés ne correspondent pas à ceux précédemment décrits par MACEK et TADRA. Comment peut-on expliquer cet écart ? Il faut rappeler que lors de la préparation du système solvant en fiole à décantier, il faut attendre au minimum 4 jours pour avoir une séparation nette des deux phases. De plus la phase organique de migration se sépare très facilement. La température doit influencer considérablement sur la composition respective des

phases aqueuse et organique. Il est fort probable que nous n'avons pas travaillé dans les mêmes conditions que MACEK et TADRA, ce qui explique cette légère différence dans les résultats.

En conclusion, l'analyse de la mobilité de notre fraction acide dans différentes conditions de séparations chromatographique ou électrophorétique permet de l'identifier à celle de l'acide 2 céto-gluconique. Sa nature chimique ne peut être confirmée qu'en utilisant d'autres moyens d'identification beaucoup plus spécifiques choisis en fonction des propriétés de la molécule.

2) Identification de la 2-4 dinitrophénylhydrazone de l'acide 2 céto-gluconique

L'application de la technique de formation des 2-4 dinitrophénylhydrazones de SELIGSON et SHAPIRO à nos témoins céto-acides et à notre solution purifiée nous conduit à l'obtention de quantités plus ou moins importantes de résidus secs qui repris par un tampon glycolle / NaOH sont chromatographiés dans le système de HARWARY et THOMPSON (tableau 19).

2-4 dinitrophénylhydrazones des témoins	Systèmes solvants	
	1	2
Ac. pyruvique	0,50	0,21
Ac. α céto-glutarique	0,11	0,05

TABLEAU 19 : *R_f des dérivés 2-4 Dinitrophénylhydrazones dans les systèmes solvants de :*

- 1 - HARWARY et THOMPSON [50]: valeurs expérimentales.
- 2 - CAVALLINI et coll. [17] : valeurs publiées.

Le système solvant de CAVALLINI est très voisin dans sa composition de celui que nous avons utilisé. Nous constatons que le rapport des valeurs R_f des dérivés de l'acide pyruvique et de l'acide α céto-glutarique est du

même ordre que celui des Rf publiés par CAVALLINI.

Par contre l'observation directe de notre chromatogramme ne révèle pas l'existence de 2-4 dinitrophénylhydrazones des acides 2 et 5 céto-gluconique témoins et de la solution purifiée. Certains auteurs conseillent la pulvérisation directe sur le papier de soude normale qui donne aux tâches de 2-4 DN P-hydrazones une coloration rouge fugace. L'utilisation d'un tel procédé n'a pas donné de meilleurs résultats.

Or la structure même des molécules d'acide céto-gluconique nous assure de la possibilité de formation de dérivés 2-4 DN P-hydrazones. Nous pouvons penser que ceux-ci se forment lors du contact avec le réactif mais ne sont pas extraits par l'utilisation successive des solutions chloroforme / éthanol et carbonate de sodium. Le caractère hydrophile qui leur est donné par l'existence de nombreuses fonctions hydroxy- ne permet peut-être pas leur passage dans la phase organique.

Nous avons donc essayé de préparer nos dérivés de condensation en suivant la même méthode mais en augmentant le temps de contact avec le réactif (24 heures). Nous avons supprimé les étapes de purification en traitant directement le milieu réactionnel en chromatographie sur papier. Nous avons au préalable éliminé l'acide chlorhydrique qu'il contenait par sa distillation sous cloche à vide en présence de pastilles de soude puis décanté la phase solide constituée de réactif cristallisé.

Nous avons appliqué ce traitement non seulement à notre solution purifiée contenant encore des résidus de glucose non dégradés lors de l'incubation des cellules mais aussi à une solution d'acide 2 céto-gluconique témoin et à une solution de glucose témoin.

Si l'on prend arbitrairement égal à 1 le coefficient de migration de la substance la plus mobile dans le système (2-4 DN PH), on peut calculer les valeurs des coefficients de migration des autres dérivés (tableau 20).

Substances témoins	Coefficients de migration
2-4 DNPH (2 spots)	1
2-4 DNP-hydrazone du glucose	0,89
2-4 DNP-hydrazone de Ac. 2 céto-gluconique	0,57
	0,25

TABLEAU 20 : Valeurs des coefficients de migration de la 2-4 DNPH et des différentes 2-4 DNP hydrazones dans le système solvant de HARWARY et THOMPSON.

La chromatographie de la solution purifiée traitée avec la 2-4 DNPH donne lieu à la séparation de quatre tâches :

- deux correspondant à la 2-4 DNPH en excès.
- une dont le coefficient de migration de 0,57 l'identifie à la 2-4 DNPH du glucose.
- une autre dont le coefficient de migration de 0,26 l'identifie à la 2-4 DNPH de l'acide 2 céto-gluconique.

3) Points de fusion des dérivés méthyl-esters de l'acide 2 céto-gluconique et de notre fraction acide

La fabrication des dérivés méthyl-esters à partir du 2 céto-gluconate de calcium (MERCK) aboutit à la formation de petits cristaux blancs alors que pour notre fraction acide nous obtenons un résidu verdâtre.

Les points de fusion mesurés dans un tube capillaire immergé dans un bain d'huile thermorégulé (BUCHI) sont rapportés dans le tableau 21.

Dérivés méthyl-esters de	Valeur théorique	Valeurs expérimentales
Ac. 2 céto-gluconique	175-6	143-5
Fraction acide		162-5

TABLEAU 21 : Valeurs des points de fusion, en degré celsius, mesurés en tube capillaire immergé dans un bain d'huile thermorégulé.

Plusieurs observations sont à faire à propos de cette manipulation :

- la cristallisation à partir du dioxanne est difficile. Les résidus obtenus n'ont pas une structure régulière. Pour notre fraction acide, la couleur verdâtre traduit peut-être une décomposition partielle de la molécule. Il faut signaler que déjà au départ l'élution de la fraction acide à partir de l'électrophorèse préparative, concentrées sous vide, donne l'apparence d'un sirop brunâtre.

- les valeurs des points de fusion indiqués dans le tableau correspondent non pas à une liquéfaction rapide des résidus mais à leur changement d'état : en effet, dans les zones de température rapportées, nous observons un moussage du produit, dû peut-être à une ébullition, et un passage rapide à la couleur brune intense, dû peut-être à une cuisson.

Il ne semble donc pas que l'acide 2 céto-gluconique soit suffisamment stable pour subir un tel traitement. Il faut souligner que REGNA et CALDWELL [110] ont mesuré le point de fusion du dérivé méthyl-ester de l'acide 2 céto-gluconique après l'avoir fabriqué par déshydrogénation chimique de la D glucono- α lactone en présence de méthanol et d'acide phosphorique.

Cette méthode basée sur la mesure des points de fusion des dérivés méthyl-esters n'est donc pas utilisable pour identifier notre fraction acide.

4) Formation des quinoxalinols :

Nous avons d'abord vérifié les spectres d'adsorption de l'orthophénylène diamine dihydrochlorée et de son produit de condensation avec l'acide 2 céto-gluconique, sous forme de sel de calcium : le 2-hydroxy,3-tétrahydroxybutyl quinoxaline.

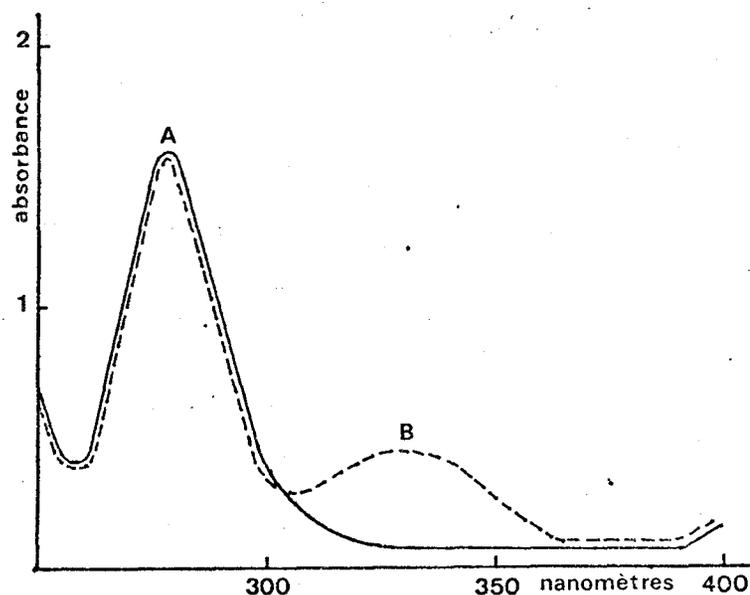
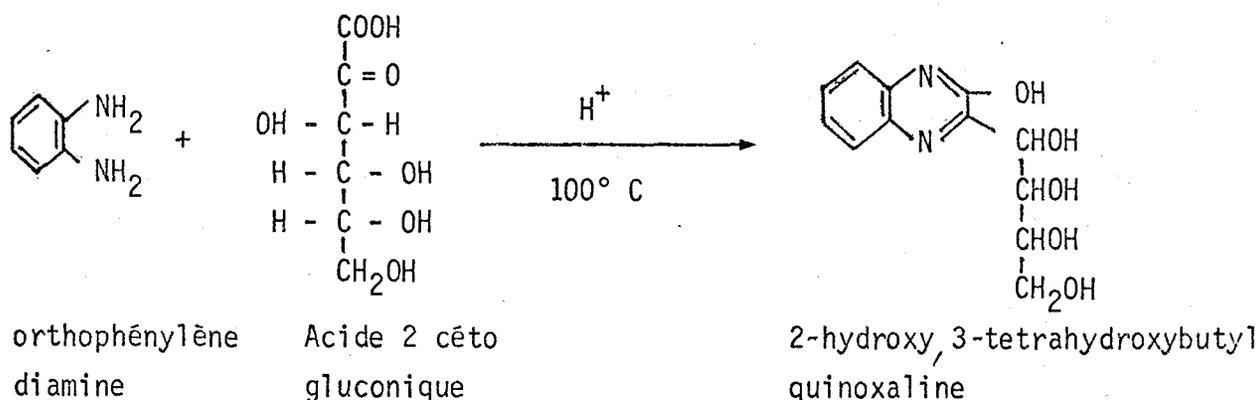


FIGURE 20

Spectres d'adsorption de l'orthophénylène diamine dihydrochlorée (A) et de son produit de condensation avec l'acide 2 céto-gluconique (B)

Le maximum d'adsorption du réactif se situe à 280 nm alors que pour les quinoxalins il est déplacé à 330 nm quelque soit la nature du résidu carboné substitué sur le noyau aromatique [80]. Ces résultats ont déjà été rapportés par KUHN et BÄR [77].

Les spectres ne se recouvrant nullement, il est donc possible de mesurer l'apparition du quinoxalinoï à 330 nm en présence d'un excès d'orthophénylène diamine sans recourir au préalable à leur séparation.

Les mesures d'adsorption à 330 nm et à 360 nm sont réalisées en même temps sur un échantillon de 2 céto-gluconate de calcium commercial et sur un échantillon de notre fraction acide traités tous deux par l'orthophénylène diamine (tableau 22).

Densité optique (DO)	Quinoxalines de	
	Acide 2 céto-gluconique témoin	Fraction acide
DO à 330 nm	0,425	0,557
DO à 360 nm	0,295	0,380
$\frac{DO\ 330}{DO\ 360}$	1,44	1,465

TABLEAU 22 : Densités optiques à 330 nm et 360 nm des dérivés de condensation de l'orthophénylène diamine avec l'acide 2 céto-gluconique (50 µg/ml) et la fraction acide.

Les rapports d'absorbance à 330 nm et 360 nm correspondent à la fourchette de $1,51 \pm 0,07$ précisée par LANNING et COHEN. Notre fraction acide est donc un représentant des acides α céto-hexoniques.

Il faut remarquer lors du passage au bain-marie bouillant de nos tubes réactionnels l'apparition d'une coloration jaunâtre s'accompagnant d'un précipité brun en présence d'un excès de substrat. Les spectres d'absorption obtenus par défilement des longueurs d'onde de 225 à 600 nm des quinoxalinoïls de l'acide 2 céto-gluconique et de la fraction acide sont directement superposables (figure 21).

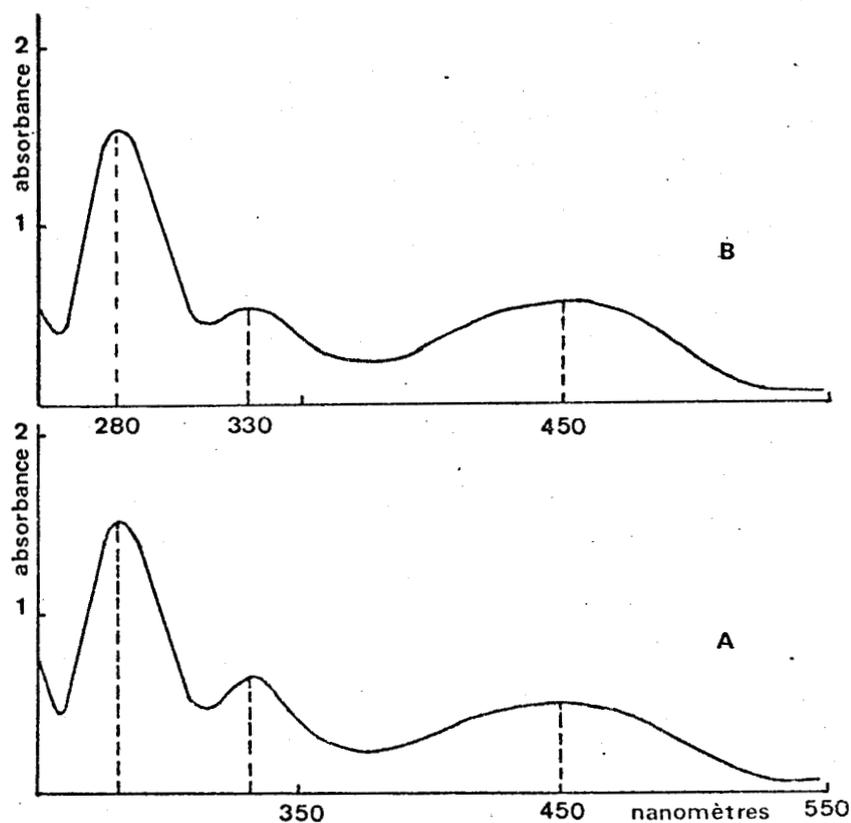


FIGURE 21

Spectres d'absorption dans l'ultra violet et le visible des quinoxalinols de l'acide 2 cêto-gluconique (A) et de la fraction acide (B).

L'apparition de la coloration jaunâtre, non signalée par LANNING et COHEN pourrait correspondre à des produits de dégradations. Son maximum d'absorption à 450 nm ne gêne en rien nos mesures de rapports d'absorbance à 330 nm et 360 nm. Par contre la formation de ces dérivés secondaires pourrait interférer lors d'un usage quantitatif de la méthode.

C - CONCLUSION

=====

Les méthodes de séparations chromatographiques et électrophorétiques permettent de dire que la fraction acide responsable de l'abaissement du pH

lors de l'incubation de Rhizobium meliloti sur glucose n'est composée que d'une seule substance dont le comportement est identique à celui de l'acide 2 céto-gluconique.

L'emploi des méthodes d'identification spécifiques de ce type de molécule par l'intermédiaire de la 2-4 dinitrophénylhydrazine et de l'ortho-phénylène-diamine confirme la nature chimique de cet intermédiaire.

V

ASPECTS PARTICULIERS DE L'UTILISATION
DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE CHEZ
RHIZOBIUM MELILOTI

V ASPECTS PARTICULIERS DE L'UTILISATION DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI

Comme nous l'avons vu précédemment Rhizobium mélioti possède le potentiel enzymatique nécessaire au bon fonctionnement du cycle de Krebs. Sa croissance en présence de glucose et de fructose est comparable. Il est donc capable d'assimiler ces deux hydrates de carbone pour en tirer l'énergie nécessaire à la division cellulaire.

Or nous constatons, en présence de glucose, une accumulation d'acide 2 céto-gluconique. Il semble donc que glucose et fructose n'empruntent pas exactement les mêmes voies de dégradation.

Afin de mieux comprendre l'utilisation particulière de ces deux oses par Rhizobium meliloti, nous avons, dans un premier temps, comparé sa croissance et l'évolution du pH des milieux de cultures en présence de concentration variable en hydrates de carbone. Dans un deuxième temps, la mesure de la quantité d'oxygène consommé, et de la vitesse d'oxydation des deux substrats nous a confirmé l'existence de deux modes différents de dégradation du glucose et du fructose.

Ensuite, nous avons tracé les courbes de disparition du glucose en fonction de sa concentration initiale et d'apparition de l'acide 2 céto-gluconique.

Enfin nous avons cherché à mettre en évidence une activité glucose-deshydrogénase et gluconate-deshydrogénase pouvant conduire à l'acide 2-céto-gluconique.

A - MATERIEL ET METHODES

=====

1) Utilisation des radioisotopes lors du bilan de la respiration en présence d'oses

Lors des bilans réalisés en appareil de Warburg sur l'utilisation du glucose et du fructose, nous avons employé des traceurs radiomarqués :

- | | | | |
|---|--|--|---|
| { | . glucose ^{14}C , U. (C.E.A.) | [act.spécif.: 190 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$] | 5 μCi pour 500 μg dose froi |
| | . fructose ^{14}C , U. (N.E.N.) | [act.spécif.: 196 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$] | 1 μCi pour 500 μg dose froi |

Après 4 heures d'incubation, en fin de manipulation, les cellules bactériennes sont éliminées par centrifugation 10 mn à 16 300 g. Le surnageant est passé en gel-filtration (Sephadex G 25) de façon à séparer le polyside synthétisé des molécules simples non polymérisées. [19]. Les parties aliquotes radioactives des fractions sont diluées à 20 % V/V dans le liquide scintillant au dioxanne. [19]. La radioactivité est mesurée dans le spectromètre à scintillation liquide intertechnique Abac S.L. 40.

2) Dosage du glucose par la glucose oxydase

Nous avons utilisé une technique basée sur les principes énoncés par BERGMAYER et BERNT. [12].

3) Dosage de l'acide 2 céto-gluconique

La méthode de WURTZ et JEHL [133] modifiée par BRISOU [13] est employée. Chaque valeur annoncée est corrigée de l'interférence donnée par le glucose.

4) Recherche d'activités enzymatiques.

a. préparation d'extraits cellulaires :

Rhizobium meliloti est d'abord cultivé sur milieu complet RC glucosé à 1 % à 30° C sous agitation moyenne durant 15 heures. Toutes les opérations suivantes sont réalisées à 4° C. Les cellules récupérées par centrifugation sont lavées deux fois dans le tampon RN⁻. Elles sont ensuite broyées à

l'alumine neutre dans un mortier, à raison de 2 g d'alumine par gramme de cellules en poids humide. L'ensemble est repris par 10 ml de tampon approprié et centrifugé 20 mn à 16 300 g. Le culot est éliminé et le surnageant conservé à + 4° C.

b. dosage des protéines totales :

Le dosage est fait par la méthode de LOWRY avec comme étalon la sérualbumine bovine à différentes concentrations.

c. recherche des activités deshydrogénases :

La recherche des activités glucose-deshydrogénase et gluconate-deshydrogénase est basée sur la mesure spectrophotométrique à 340 nm de la vitesse de réduction des NAD⁺ ou NADP⁺ en présence des substrats.

α.recherche de la glucose deshydrogénase :

Nous utilisons la méthode décrite par SADOFF [112] pour la mise en évidence de l'enzyme soluble de Bacillus cereus. Nous suivons le protocole expérimental préconisé par l'auteur, mis à part que l'extrait cellulaire n'est pas repris dans un tampon acétate 0,05 M pH 5 mais dans un tampon Tris/HCl 0,2 M pH 7.

β.recherche de la gluconate deshydrogénase :

Nous utilisons la méthode décrite par DE LEY [27] avec les modifications suivantes :

- nous travaillons en présence de 400 μM de NADP⁺
- l'extrait cellulaire est en solution dans un tampon glycolle/NaOH 0,5 M à pH 7.

B - RESULTATS

=====

1) Mesure de la croissance de Rhizobium meliloti en présence de glucose ou de fructose

a. mesure de la croissance en présence de glucose ou de fructose à la concentration de 1 % :

L'appareil utilisé est celui de Bonet-Maury et Jouan (Cf III A 3), les conditions expérimentales restent inchangées. Sur milieu RC additionné de l'ose à la concentration de 1 % les enregistrements obtenus sont à rapprocher des courbes établies par numération directe des cellules viables (figure 22)

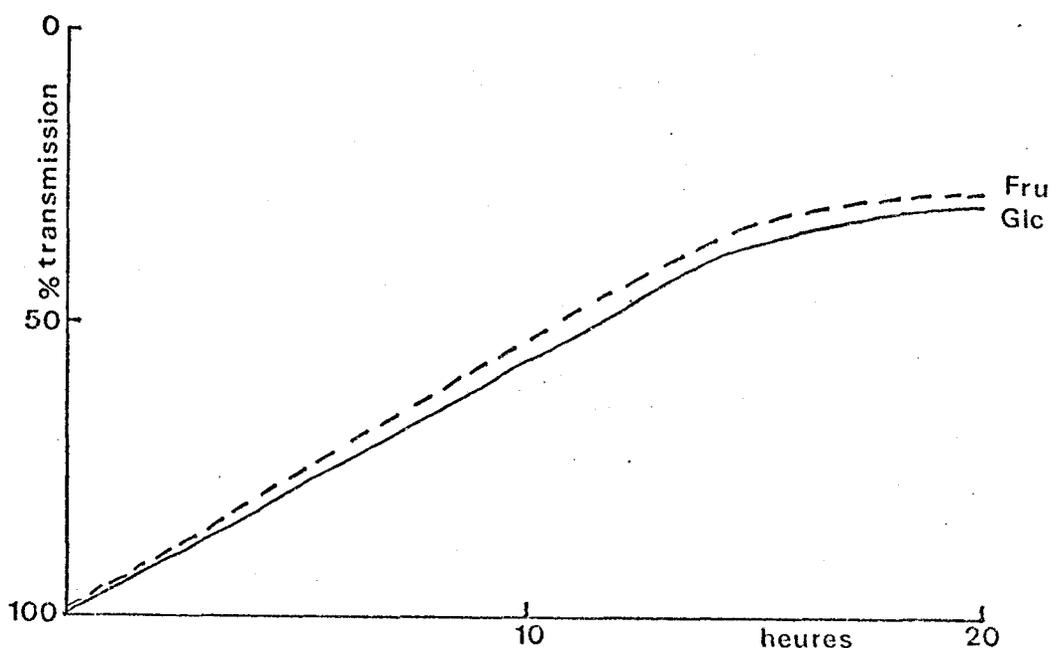


FIGURE 22

Courbes d'enregistrement au biophotomètre de la croissance de Rhizobium meliloti incubé à 30° C dans le milieu RC additionné de fructose ou de glucose à 1 %.

Nous constatons à nouveau le léger retard de croissance de Rhizobium meliloti en présence de glucose par comparaison au milieu fructosé. Inquiets du rôle mal connu de l'extrait de levure nous avons renouvelé l'expérience sur le milieu minimum R dont la source d'azote est plus simple : le nitrate d'ammonium (figure 23).

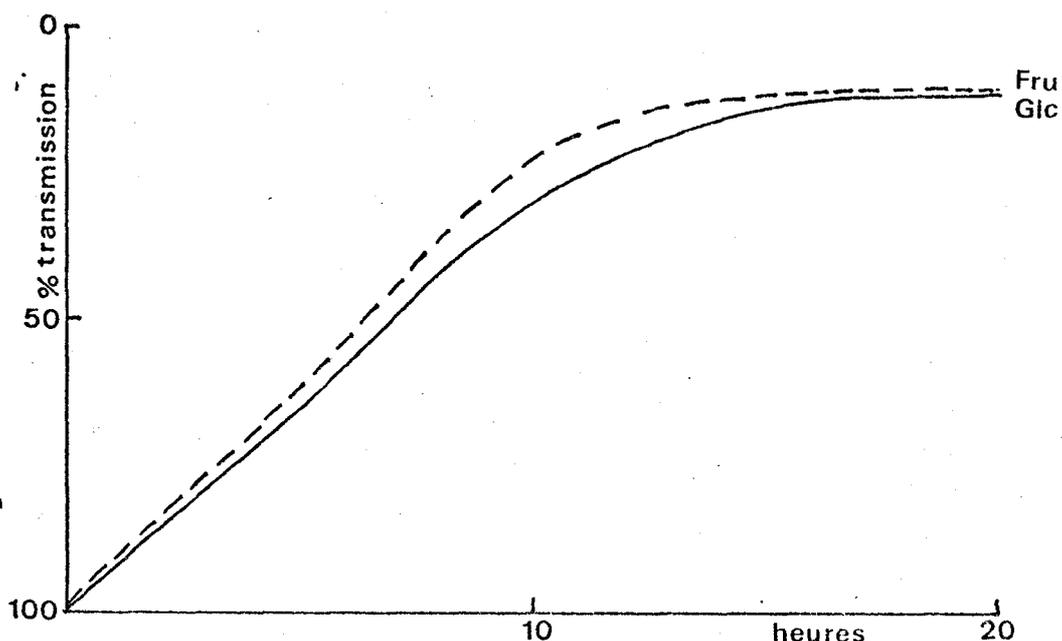


FIGURE 23

Courbes d'enregistrement au biophotomètre de la croissance de Rhizobium meliloti incubé à 30° C dans le milieu R additionné de fructose ou de glucose à 1 %.

L'allure des courbes comparées l'une à l'autre reste la même : il ne faut pas tenir compte des pourcentages de transmission finaux, les écarts obtenus entre les milieux RC et R n'étant dus qu'à un réglage différent du seuil de sensibilité de l'appareil. De la même façon, à partir d'un certain temps d'incubation la courbe devient parallèle à l'axe des abscisses ; elle ne correspond pas à la fin de la phase exponentielle de croissance mais à la limite supérieure de la sensibilité de l'appareil.

Il semble donc que le léger décalage dans le temps de la croissance de Rhizobium meliloti soit bien lié à la nature de la source de carbone du milieu d'incubation.

b. mesure de la croissance et de la variation du pH en présence de glucose à différentes concentrations :

Pour les mêmes raisons que précédemment, nous avons choisi le milieu R préférentiellement au milieu RC. Glucosé de 0,05 à 1 % et inoculé par Rhizobium meliloti, il est mis à incuber à 30° C en agitation moyenne. L'évolution de la croissance et la variation du pH des milieux sont rapportées dans le tableau 23.

Temps en h	0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5		1	
	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH
4	-	7,2	-	7,25	-	7,25	-	7,25	-	7,2	-	7,2	-	7,2
20	15	6,77	16,5	7	24,5	6,8	17,5	6,8	24	6,7	28	6,55	27	6,5
44	30	6,5	32	6,6	47	6	34,5	6,35	44	6,1	45	5,5	45,5	5,4
74	33,2	6,5	44	5,9	55	5,35	42	5,65	46	5,3	45	5,3	46	5,3
91	41	6,2	47	5,4	57	5,1	47	5,6	46	5,3	47,5	5,05	46	5,3

TABLEAU 23: Evolution de la croissance et du pH sur des milieux R glucosés de 0,05 à 1 % inoculés par Rhizobium meliloti et incubés à 30° C sous agitation moyenne.

Nous constatons que :

- les taux de croissance de la souche sont pratiquement identiques quelles que soient les concentrations en hydrates de carbone du milieu sauf à la concentration égale à 0,2 % en glucose où l'on observe un maximum de densité cellulaire.
- les pH ont tous une nette tendance à l'acidification sauf pour la concentration de glucose égale à 0,05 % où le pH reste très voisin de celui

de départ. Cette concentration est proche de la concentration limitante en source de carbone.

2) Mesure de la respiration de *Rhizobium meliloti* en présence de glucose, fructose, gluconate et 2 céto-gluconate

Nous avons vu que le fructose favorise un démarrage immédiat de la croissance bactérienne, donc favorise la division cellulaire. La dégradation du fructose est peut-être plus rapidement énergétique que celle du glucose. Il devient donc intéressant de mesurer les consommations d'oxygène et les vitesses d'oxydation de chacun de ces deux substrats.

D'une façon générale nous appelons Rhizobium G les cellules préparées en présence de glucose et Rhizobium F les cellules préparées en présence de fructose.

a. comparaison des courbes de consommation d'oxygène en présence de glucose ou de fructose :

La mesure régulière de la consommation d'oxygène en présence de 166 $\mu\text{g/ml}$ de glucose ou de fructose est réalisée dans les conditions déjà décrites (Cf III A 2 b). Les résultats sont rapportés dans la figure 24.

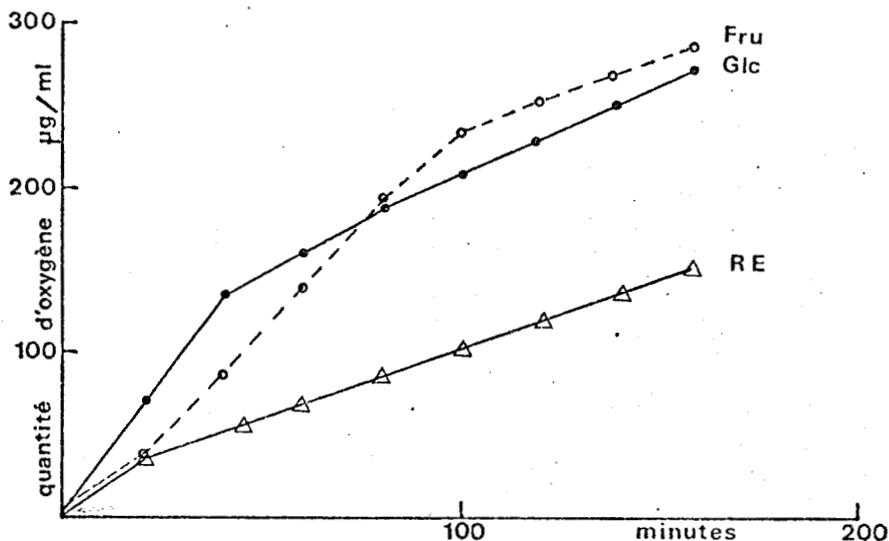


FIGURE 24

Courbes de consommation d'oxygène par *Rhizobium meliloti* G en présence de 166 $\mu\text{g/ml}$ de glucose ou de fructose.

Plusieurs remarques peuvent être faites :

- malgré l'agitation préalable des cellules durant 16 heures à 30° C, leur respiration endogène (RE) reste importante.

- l'allure générale des courbes de consommation d'oxygène en présence de glucose ou de fructose est très différente :

- . pour le fructose, nous observons une consommation régulière d'oxygène jusqu'à 100 mn, puis la pente de la courbe devient parallèle à celle de la respiration endogène, témoin de l'épuisement du substrat. A ce point d'inflexion, si l'on considère que la totalité de l'oxygène consommé est utilisée à l'oxydation complète du fructose en dioxyde de carbone et en eau, nous constatons que 62 % seulement du substrat serait oxydé. La mesure du dioxyde de carbone dégagé nous permet de calculer le quotient respiratoire : QR

$$QR = \frac{QO_2}{QCO_2} = 1,08$$

- . pour le glucose, la pente de la courbe n'est pas régulière, la vitesse d'oxydation diminue au cours du temps jusqu'à rejoindre dès 60 mn celle de la respiration endogène. Cette baisse régulière de la consommation d'oxygène pourrait résulter de l'inhibition progressive d'un système enzymatique par acidification lente du milieu réactionnel. La cause n'est cependant pas à ce niveau : en effet le pH passe de 7,2 au départ à 7 après 240 mn d'incubation. Si l'on suit le même raisonnement que pour le fructose, on s'aperçoit qu'après 60 mn 45 % seulement du substrat serait dégradé. La mesure du dioxyde de carbone dégagé nous permet de calculer le quotient respiratoire : QR

$$QR = \frac{QO_2}{QCO_2} = 1,02$$

- l'oxydation du fructose démarre avec un léger retard de l'ordre de 20 mn. Or les cellules employées ont été préparées sur glucose. En présence d'un autre substrat, peut-être y-a-t-il induction soit d'un système perméasique spécifique, soit d'enzymes nécessaires à sa dégradation ?

Pour répondre à cette question, nous avons préparé simultanément des cellules de Rhizobium meliloti par croissance d'une part sur milieu glucosé et d'autre part sur milieu fructosé. Chacun des types de cellules récupérées est mis en contact en présence de glucose ou de fructose. Les courbes de respiration établies dans ces conditions sont rapportées dans les figures 25 et 26.

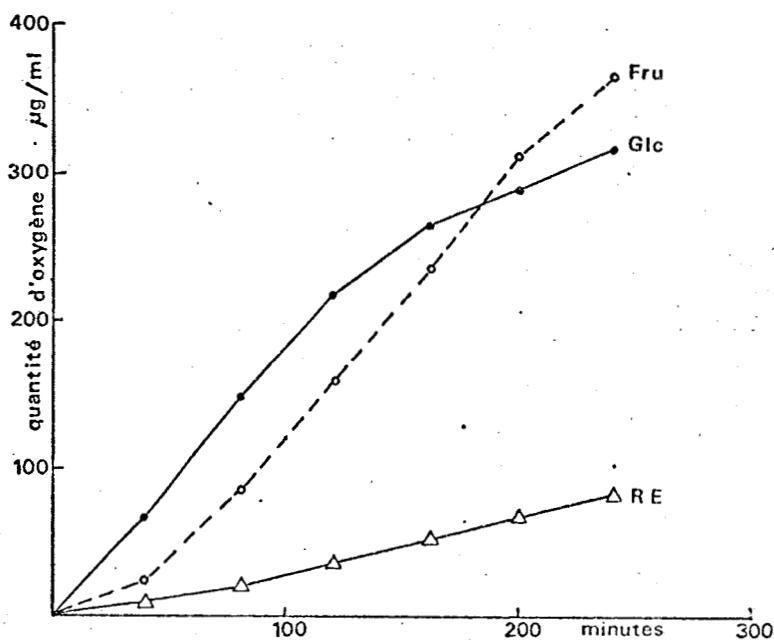


FIGURE 25

Courbes de consommation d'oxygène par Rhizobium meliloti G en présence de 333 µg/ml de glucose ou de fructose.

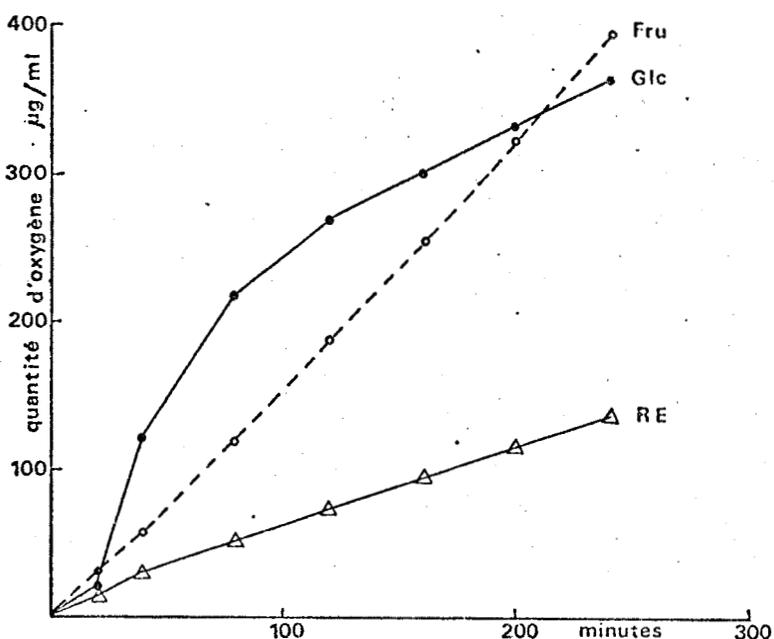


FIGURE 26

Courbes de consommation d'oxygène par Rhizobium meliloti F en présence de 333 µg/ml de glucose ou de fructose.

Nous constatons que le léger retard d'oxydation d'un substrat s'annule lorsque les cellules utilisées ont été préparées sur ce même substrat. Ce temps de latence correspond bien à une induction enzymatique.

Lors de cette manipulation, nous utilisons une concentration de substrats carbonés de 333 $\mu\text{g/ml}$, soit le double de l'expérimentation précédente. Nous pouvons faire les mêmes calculs pour obtenir les valeurs des différents quotients respiratoires et exprimer la consommation en oxygène en équivalent de substrats totalement oxydés en eau et dioxyde de carbone (tableau 24).

Types de cellules	QR sur glucose	QR sur fructose
<u>Rhizobium G</u>	1,27	1,16
<u>Rhizobium F</u>	1,23	1,14

TABLEAU 24 : Valeurs des quotients respiratoires (QR) de Rhizobium meliloti en présence de glucose et fructose.

Nous notons une identité des QR calculés en présence de glucose et fructose quelle que soit l'origine des cellules de Rhizobium meliloti utilisées. Par comparaison avec les valeurs calculées en présence de 166 $\mu\text{g/ml}$ de substrat, on remarque une augmentation des QR plus importante sur glucose que sur fructose. On peut penser qu'à partir d'une certaine concentration en glucose, une partie est dégradée totalement en eau et dioxyde de carbone, l'autre n'étant oxydée que partiellement (tableau 25).

Types de cellules	Consommation d'oxygène rapportée en pourcentage de dégradation totale de	
	Glucose	Fructose
<u>Rhizobium G</u>	33,54	50
<u>Rhizobium F</u>	33,67	53

TABEAU 25 : Valeurs de la consommation en oxygène rapportées en pourcentage de dégradation totale de glucose et de fructose par Rhizobium meliloti.

Après 240 mn d'incubation, nous n'observons pas encore de point d'inflexion sur les courbes correspondant à la consommation d'oxygène en présence de 333 $\mu\text{g/ml}$ de fructose. Les valeurs exprimées dans le tableau sont données dans ce cas par défaut.

En présence de glucose, la consommation d'oxygène calculée en équivalent de glucose oxydé est identique à la fois pour Rhizobium G et Rhizobium F. Elle n'est que de 33 % environ pour 333 $\mu\text{g/ml}$ contre 45 % en présence de 166 $\mu\text{g/ml}$. Il semble donc que la consommation d'oxygène ne soit pas proportionnelle à la quantité de glucose mis à la disposition des cellules. Nous avons vérifié ce phénomène en mesurant la consommation d'oxygène en présence de quantités variables de glucose : 666, 333, 166, 83 et 41,5 $\mu\text{g/ml}$ ou de fructose : 333, 166 et 41,5 $\mu\text{g/ml}$ (figure 27).

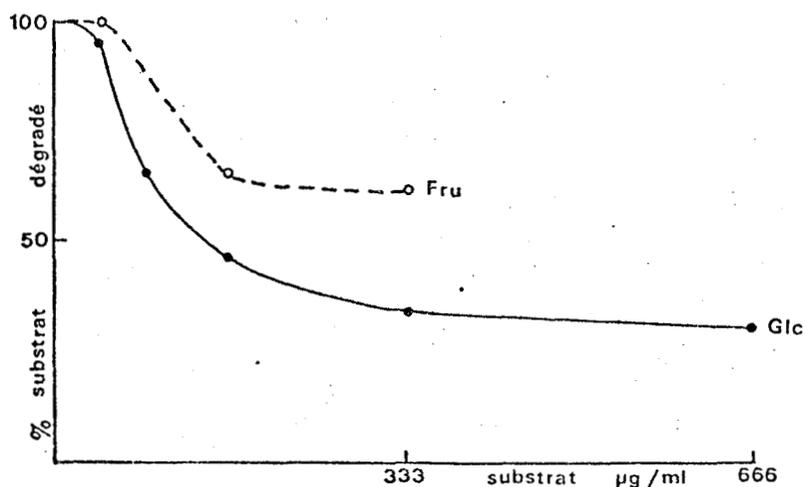


FIGURE 27

Taux d'oxygène consommé, rapportée en pourcentage de glucose ou de fructose dégradé par Rhizobium meliloti en fonction de la quantité d'ose initiale.

La quantité d'oxygène consommée est toujours plus importante sur fructose que sur glucose mais n'est pas proportionnelle à la quantité de substrat mis à la disposition des cellules. Il faut se souvenir que Rhizobium meliloti peut synthétiser des polyosides en présence de ces deux oses. On peut se demander si la quantité d'hydrates de carbone non dégradés en dioxyde de carbone et en eau ne se retrouvent pas dans le milieu sous forme de biopolymères.

b. bilan de la respiration de Rhizobium meliloti sur glucose et sur fructose :

Nous utilisons des quantités de 500 μg de fructose ou de glucose par fiole expérimentale (soit 166 $\mu\text{g}/\text{ml}$) avec des traceurs marqués au ^{14}C . Ce choix est basé sur les résultats précédemment décrits : en effet, dans ces conditions, le quotient respiratoire est égal à 1 et la totalité de l'oxygène consommée doit être utilisée à l'oxydation complète du substrat. En fin de manipulation nous passons les échantillons débarrassés des cellules bactériennes sur Sephadex G 25. Chaque fraction est additionnée de liquide scintillant et est analysée au compteur à scintillation. Les bilans ainsi réalisés sont rapportés dans le tableau 26.

	Glucose	Fructose
Equivalent dégagé en CO_2	210	300
Polyoside formé	0,63	1,17
Substrat + équivalents	285	26
% recouvrement	99,12	65,4

TABLEAU 26 : *Bilan de la respiration de Rhizobium meliloti en présence de 500 μg de glucose ou de fructose.*

Plusieurs raisons peuvent expliquer le peu de synthèse de polyosides : les temps de contact sont très brefs et la quantité de source de carbone (166 $\mu\text{g/ml}$) est de beaucoup plus faible que celle régulièrement employée pour la synthèse (10 000 $\mu\text{g/ml}$).

Sur fructose, le taux de recouvrement n'est que de 65,4 % Le complément à 100 se retrouve donc dans le cytoplasme cellulaire, peut-être sous la forme de "précurseurs" de polyosides non encore libérés dans le milieu extérieur.

Sur glucose, le taux de recouvrement est de 100 %. Nous retrouvons la totalité du substrat qui n'est pas totalement oxydé en eau et dioxyde de carbone dans les fractions passant en même temps que le glucose lors de la séparation en gel-filtration. Le dosage par la glucose-oxydase en fin de manipulation détecte seulement 235 μg de glucose, il reste donc 50 μg dont la nature n'a pas été étudiée mais qui pourrait correspondre à l'acide 2 céto-gluconique.

Il devient donc intéressant de mesurer la consommation d'oxygène de Rhizobium meliloti en présence à la fois d'acide gluconique et d'acide 2 céto-gluconique.

c. mesure de la respiration en présence de gluconate et de 2 céto-gluconate :

Les cellules de Rhizobium meliloti préalablement cultivées en présence de glucose sont mises à respirer sur 333 $\mu\text{g/ml}$ d'équivalent acide de gluconate de sodium ou de 2 céto-gluconate de calcium. Les courbes obtenues sont représentées sur la figure 28.

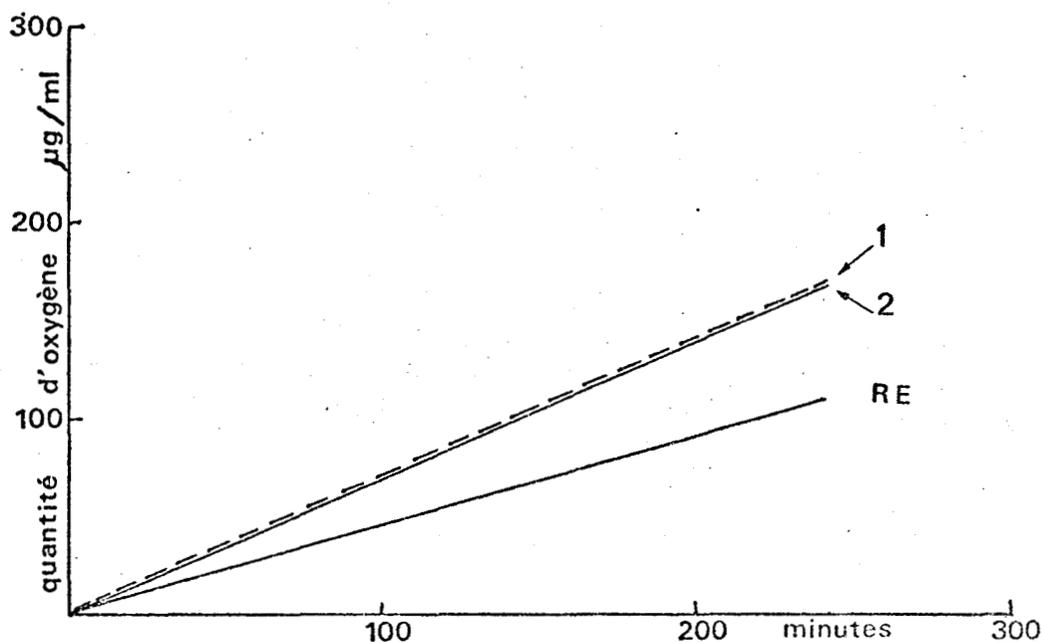


FIGURE 28

Courbes de consommation d'oxygène par Rhizobium meliloti G en présence de 333 µg/ml de gluconate de sodium (1) et de 2 céto-gluconate de calcium (2).

Le taux de consommation d'oxygène en présence de ces deux substrats est extrêmement faible par rapport à celui de la respiration en présence de glucose.

Nous avons réalisé à nouveau la même expérience avec des cellules cultivées en présence de gluconate de sodium. Les résultats sont identiques.

Gluconate et 2 céto-gluconate pénètrent donc mal dans la cellule ou sont mal utilisés par Rhizobium meliloti.

3) Courbes de disparition du glucose en fonction de sa concentration initiale

Nous avons étudié la disparition du glucose dans les milieux d'incubation contenant des concentrations d'oses de l'ordre de celles employées lors de la respiration en Warburg. Nous avons dosé en même temps l'acide 2 céto-gluconique dans les milieux réactionnels. Les résultats obtenus lors d'incubation à 30° C sous agitation moyenne sont rapportés dans la figure 29.

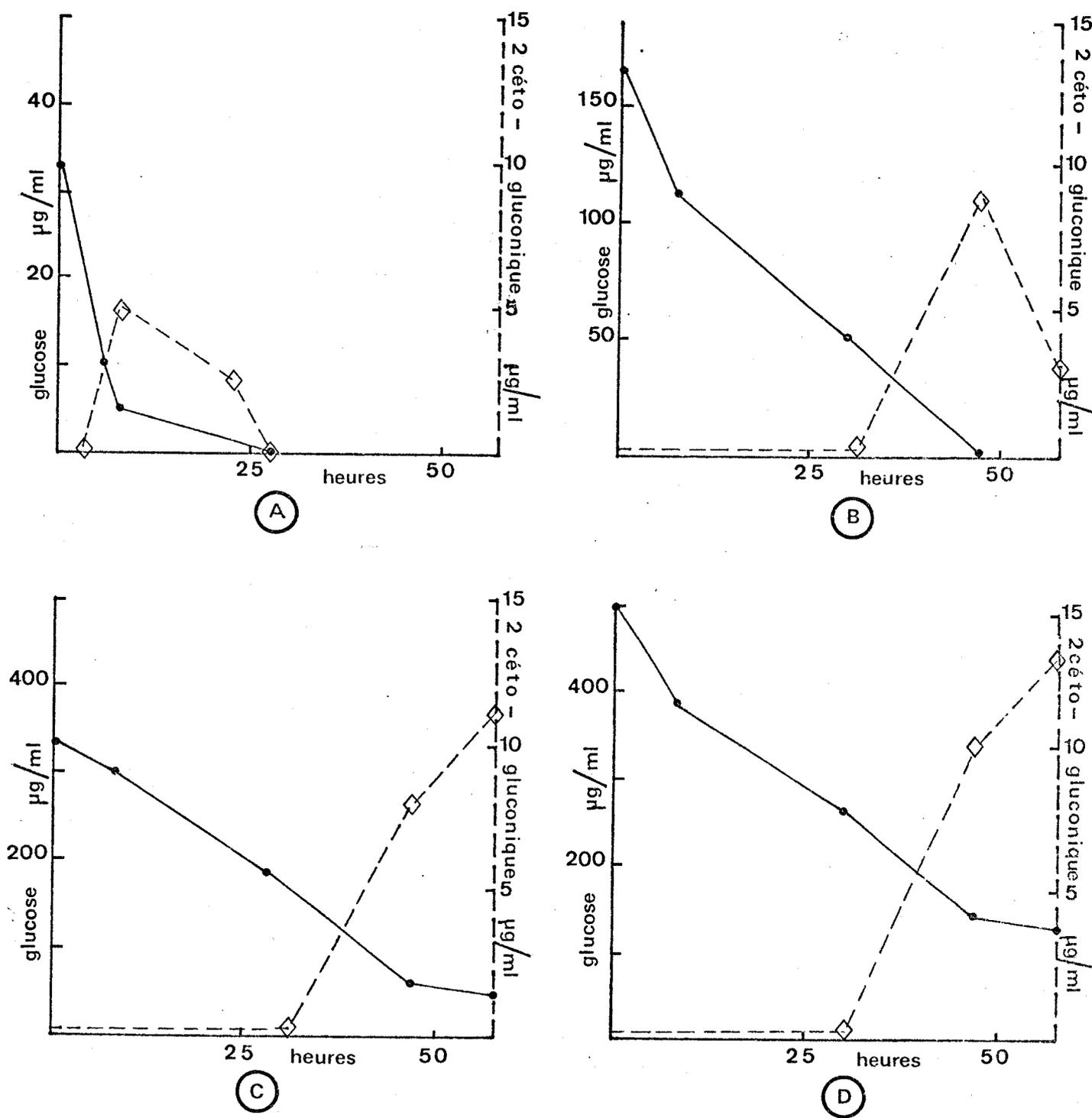


FIGURE 29



Courbes de disparition du glucose (en trait plein, échelle variable) et d'apparition de l'acide 2 ceto-gluconique (en pointillé) lors de l'incubation de *Rhizobium meliloti* en présence de différentes concentrations initiales de glucose

A 33 $\mu\text{g/ml}$

C 333 $\mu\text{g/ml}$

B 166 $\mu\text{g/ml}$

D 500 $\mu\text{g/ml}$

Pour les concentrations faibles de 0 à 166 $\mu\text{g/ml}$, le glucose disparaît totalement en 54 heures d'incubation. Par contre pour les concentrations supérieures, il reste mal utilisé au-delà de ce même temps.

L'acide 2 céto-gluconique apparaît dans chacun des cas à des temps différents. Mais alors qu'il disparaît ensuite pour les faibles concentrations, il s'accumule dans les autres cas.

La même expérience répétée dans des conditions d'incubation sous agitation très forte, donc dans de meilleures conditions d'oxygénation, aboutit aux mêmes résultats. L'acide 2 céto-gluconique ne s'accumule pas pour autant en quantité plus importante.

Nous pouvons comprendre facilement que dans les conditions utilisées habituellement pour la culture de nos souches (10 000 $\mu\text{g/ml}$), l'acide 2 céto-gluconique s'accumule.

4) Etude de la formation de l'acide 2 céto-gluconique en fonction du pH initial des milieux réactionnels

L'accumulation de l'acide 2 céto-gluconique dans les milieux tamponnés au départ aux environs de la neutralité a pour conséquence une acidification des milieux. On peut se demander si ce phénomène ne favorise pas la formation de l'acide 2 céto-gluconique aux dépens d'autres voies de catabolisme. Nous avons donc utilisé un système de non prolifération RN^- , deux fois concentré, ajusté aux pH 3,5 - 4 - 5 - 6 - 7 et glucosé à 1 %. On y suspend des cellules de Rhizobium meliloti jusqu'à absorbance de 1. Le dosage de l'acide 2 céto-gluconique se fait par la méthode de BRISOU [13] avec correction de l'interférence du glucose dosé dans chaque échantillon par la glucose-oxydase (figure 30).

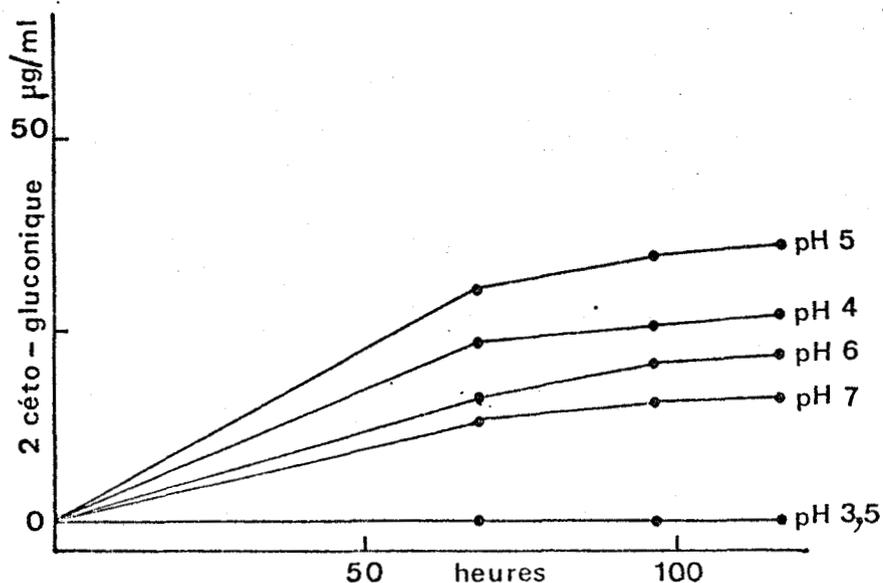
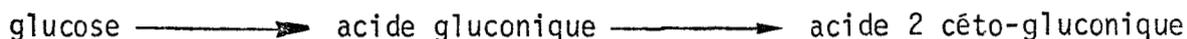


FIGURE 30

Synthèse d'acide 2 céto-gluconique par *Rhizobium meliloti* en suspension dans le système tampon RN^- deux fois concentré et ajusté à des pH initiaux différents.

5) Recherche d'activités enzymatiques spécifiques de la voie du 2 céto-gluconique

Rhizobium meliloti est donc capable de produire de l'acide 2 céto-gluconique à partir du glucose. Il est fort probable que la réaction passe par l'intermédiaire de l'acide gluconique et se décompose comme suit :



a. mise en évidence d'une activité glucose-déshydrogénase :

Le coenzyme de la glucose-deshydrogénase peut être soit une nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) ou une nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ($NADP^+$). Les essais d'oxydation du glucose en acide gluconique sont réalisés par l'utilisation de chacun de ces deux coenzymes (figure 31).

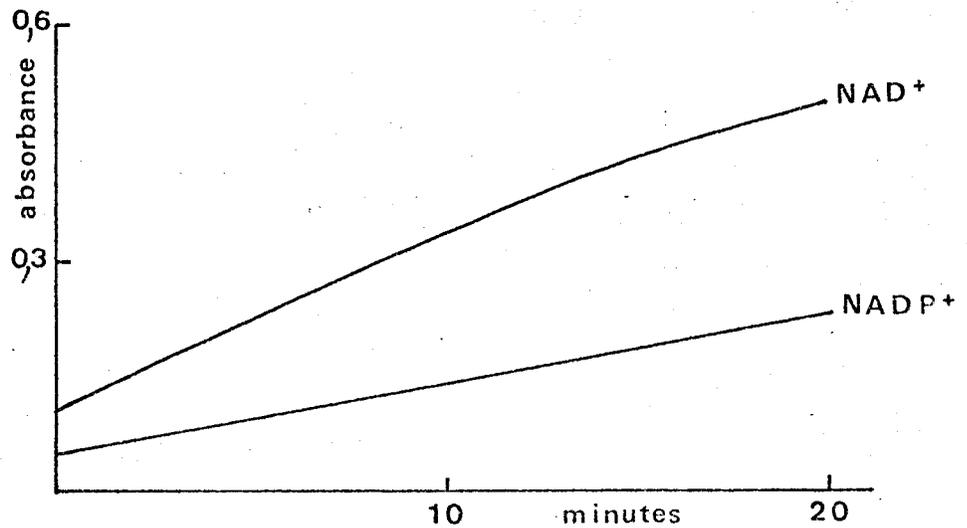


FIGURE 31

Vitesse de réduction de NAD^+ et NADP^+ par un extrait cellulaire de Rhizobium meliloti en présence de 0,2 ml de glucose M, dans un tampon Tris-HCl pH 8

Les deux coenzymes fonctionnent mais la NAD^+ est réduite deux fois plus vite que la NADP^+ . Comparée aux vitesses de réaction décrites dans la littérature, la réaction n'est pas rapide : 1 μM d' NAD^+ réduite (mn). On peut se demander s'il n'existe pas une réaction réverse. Pour le vérifier, nous ajoutons au cours de la réaction de petites quantités de NADH H^+ (figure 32).

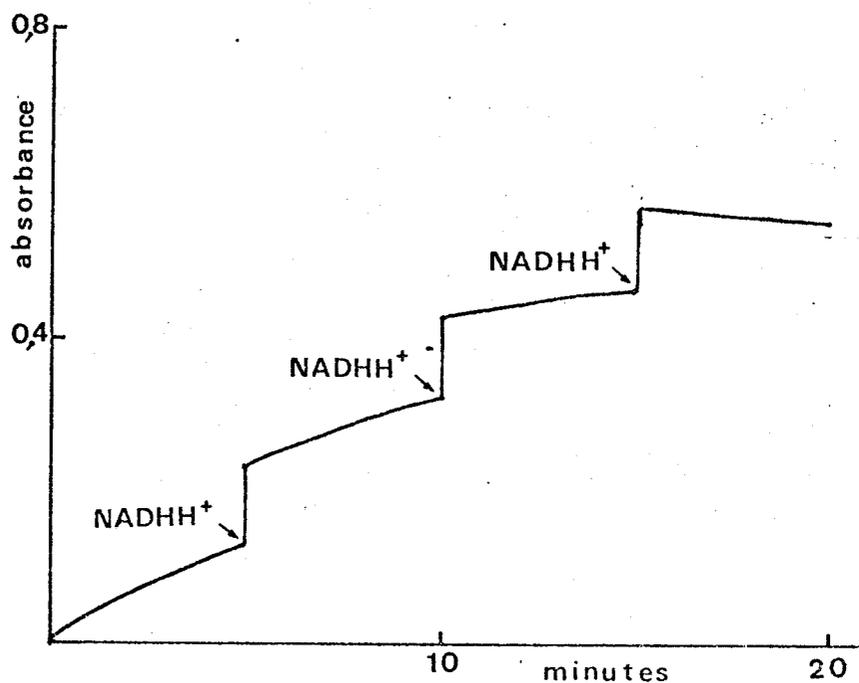
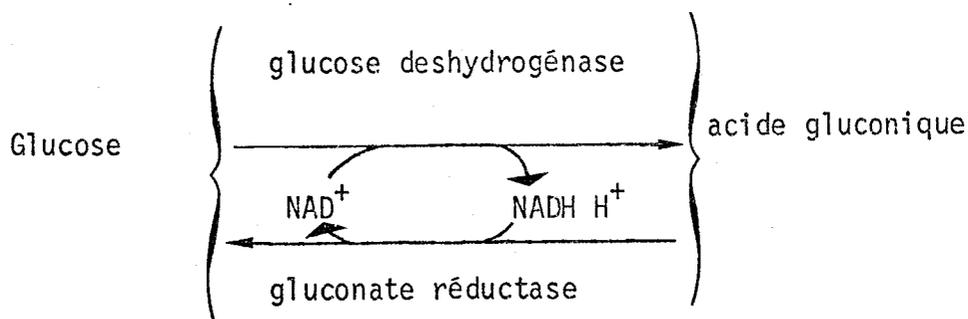


FIGURE 32

Effet de l'addition de NADH H^+ au cours de la réduction de NAD^+ par des extraits cellulaires de *Rhizobium meliloti* en présence d'un excès de glucose.

L'addition de NADH H^+ en cours de réaction modifie la pente de la courbe jusqu'à l'inverser. Nous sommes donc en présence d'une activité réverse NADH H^+ oxydase (gluconate réductase) et la vitesse d'oxydation du glucose lue dans nos conditions n'est que la résultante de ces deux réactions :



Nous avons recherché le pH d'activité maximale de la glucose-deshydrogénase (figure 33).

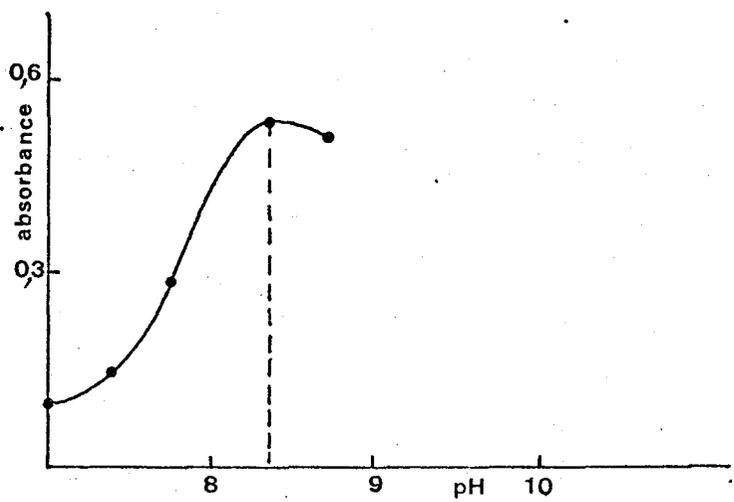


FIGURE 33

Recherche du pH de l'activité maximale de la glucose-deshydrogénase chez Rhizobium meliloti.

Nous obtenons une courbe en cloche classique avec un maximum à 8,35.

b. mise en évidence d'une activité gluconate-deshydrogénase :

De la même façon que pour la glucose-deshydrogénase, nous faisons l'essai avec les deux coenzymes différents dans les conditions décrites précédemment. Les résultats sont reportés sur la figure 34.

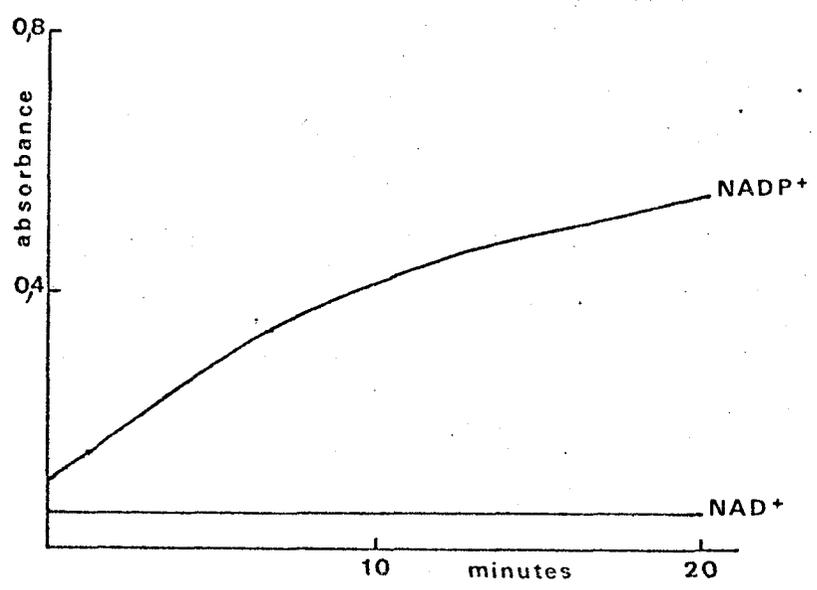


FIGURE 34

Vitesse de réduction de NAD⁺ et NADP⁺ par un extrait cellulaire de Rhizobium meliloti en présence de 50 μM de gluconate, dans un tampon glycolle-NAOH pH 10

La NAD^+ ne fonctionne pas, la gluconate deshydrogénase est un enzyme à NADP^+ . Dans nos conditions expérimentales, nous observons après 30 mn d'incubation un plateau de saturation de la réaction.

Le dosage des protéines totales dans les extraits cellulaires nous permet de calculer l'activité spécifique de gluconate deshydrogénase de Rhizobium meliloti : elle varie de 2 à 2,8 μM d' NADP^+ réduite / mn / mg de protéines.

Nous avons recherché le pH d'activité maximale de cet enzyme (figure 35).

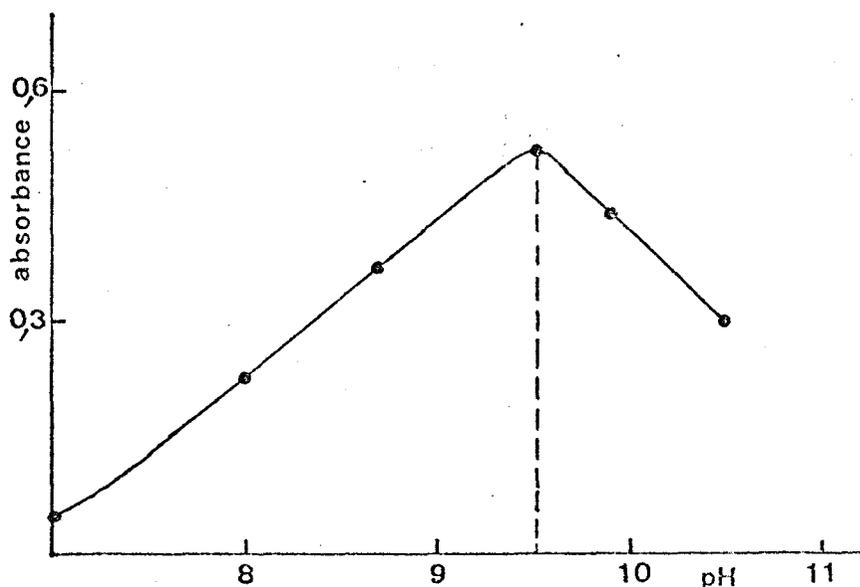


FIGURE 35

Recherche du pH d'activité maximale de la gluconate deshydrogénase chez Rhizobium meliloti

Le pH d'activité maximale est de 9,5.

C - DISCUSSION ET CONCLUSION

=====

Nous avons confirmé que glucose et fructose sont tous deux des substrats carbonés assurant à Rhizobium meliloti une croissance comparable. Mais l'étude de la respiration d'une suspension de cellules en présence de chacun d'eux fait apparaître un mode différent d'oxydation de chaque molécule :

- le fructose est dégradé en dioxyde de carbone et en eau jusqu'à épuisement. En effet, bien que d'après les calculs réalisés à partir des données de UMBREIT, BURRIS et STAUFFER [123], seulement 62 % de la quantité initiale ne sont oxydés totalement, on ne détecte plus de substrat dans les milieux réactionnels. Le complément reste à l'intérieur des cellules et est dirigé vraisemblablement vers des voies de métabolisme particulières, peut-être sous forme de "précurseurs" de biopolymères : polyosides et poly β hydroxybutyrate.

- le glucose est oxydé dans les premières minutes de contact à une vitesse voisine de celle de l'oxydation du fructose. Mais cette vitesse décroît régulièrement jusqu'à se stabiliser à une valeur légèrement supérieure à celle de la respiration endogène. Tout se passe comme si le système enzymatique mis à contribution se saturait peu à peu à un endroit donné de la chaîne métabolique.

L'acide 2 céto-gluconique pourrait être le maillon de la chaîne en aval duquel la déficience ou l'absence d'un enzyme en favoriserait l'accumulation.

La mise en évidence des activités glucose-deshydrogénase et gluconate-deshydrogénase confirme l'existence de cette voie conduisant à l'acide 2 céto-gluconique.

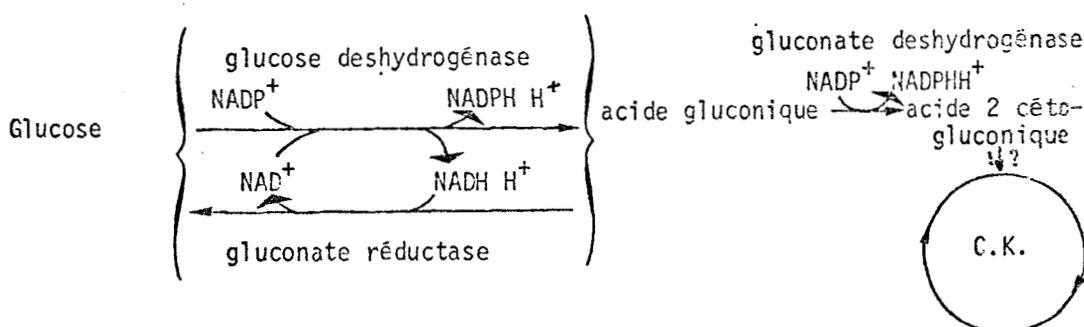
Cependant ce produit, qui apparaît dans tous les cas observés lors de nos expérimentations, disparaît au cours du temps pour les faibles concentrations en glucose (0 à 166 μ g/ml) mais s'accumule dans les concentrations su-

périeures. Il n'est donc pas un produit final de métabolisme, il peut rejoindre le cycle de Krebs.

Par ailleurs, l'étude de la respiration d'une suspension cellulaire en présence de gluconate et de 2 céto-gluconate démontre que les deux substrats bien que mal utilisés sont oxydés de la même façon ; leur oxydation se poursuit donc au-delà de l'acide 2 céto-gluconique. Ceci confirme le rôle d'intermédiaire de cet acide.

Enfin, la valeur des quotients respiratoires calculés en présence de faibles concentrations de glucose nous indique son passage par le cycle des acides tricarboxyliques.

Nous pouvons donc proposer un schéma d'utilisation du glucose par Rhizobium meliloti.



Nous avons démontré aussi que l'activité maximale des enzymes de la voie du 2 céto-gluconique se situe dans des zones de pH alcalins. Or, in vivo, nous avons constaté que les pH acides favorisaient l'accumulation de cet intermédiaire. Nous n'avons pu trouver d'explication à cette contradiction.

VI

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

V I C O N C L U S I O N G E N E R A L E

Par nos travaux, nous avons démontré que Rhizobium meliloti utilise différemment le fructose et le glucose. En effet, l'observation faite par COURTOIS [19] sur une souche du groupe d'inoculation de la luzerne est étendue à la totalité de l'espèce :

- le fructose donne une synthèse de polyosides convenable et lors de sa dégradation le pH des milieux d'incubation se maintient aux environs de la neutralité.

- le catabolisme du glucose, par contre, s'accompagne d'une diminution forte du pH sur des milieux réactionnels, incompatible avec la synthèse des polyosides. En absence d'oxygène tout métabolisme acide est inhibé.

La fraction acide qui s'accumule en aérobiose lors de l'incubation de Rhizobium meliloti en présence de glucose est étudiée en électrophorèse et en chromatographie. Elle ne semble constituée que d'un composant dont les coefficients de migration dans les différents systèmes s'identifient à ceux de l'acide 2 céto-gluconique. La nature chimique de cette fraction acide est confirmée par l'étude de la 2-4 dinitrophénylhydrazone qui en dérive et du quinoxalinoïde qui lui correspond.

La mesure de la respiration des cellules bactériennes en présence du pyruvate, succinate et malate de sodium ainsi que leur croissance à partir de ces intermédiaires et du citrate de sodium nous permettent d'affirmer que le cycle de Krebs de Rhizobium meliloti est fonctionnel. Nous avons montré de plus en accord avec PEDROSA et coll. [108] et JOHNSON et coll. [60] qu'il peut être complété par le by-pass de l'acide glyoxylique.

L'accumulation de l'acide 2 céto-gluconique lors de l'utilisation du glucose est fonction de la concentration de cet hydrate de carbone dans les milieux d'incubation :

- en présence de peu de glucose (moins de 166 μ g/ml), le quotient respiratoire mesuré est proche de 1. De plus l'acide 2 céto-gluconique qui apparaît en cours d'incubation disparaît totalement par la suite. Cet intermédiaire peut

donc rejoindre le cycle des acides tricarboxyliques.

- en présence de fortes concentrations en glucose (plus de 166 $\mu\text{g/ml}$) le quotient respiratoire mesuré est supérieur à 1, et l'acide 2 cétogluconique s'accumule.

Il existe donc chez Rhizobium meliloti une voie de dégradation du glucose aboutissant au cycle de Krebs, voie se saturant rapidement au niveau de l'acide 2 cétogluconique qui ne s'écoule que lentement.

La mise en évidence des activités de $\text{NAD}^+/\text{NADPH}^+$ glucose deshydrogénase et NADP^+ gluconate deshydrogénase confirme ces résultats.

En présence de fructose, il n'apparaît jamais d'acide 2 cétogluconique. Rhizobium meliloti oxyde totalement en dioxyde de carbone et en eau une partie de ce substrat, le complément étant dirigé vers des voies de biosynthèse.

Nous pouvons donc proposer le schéma suivant d'utilisation du glucose et du fructose par Rhizobium meliloti (figure 36).

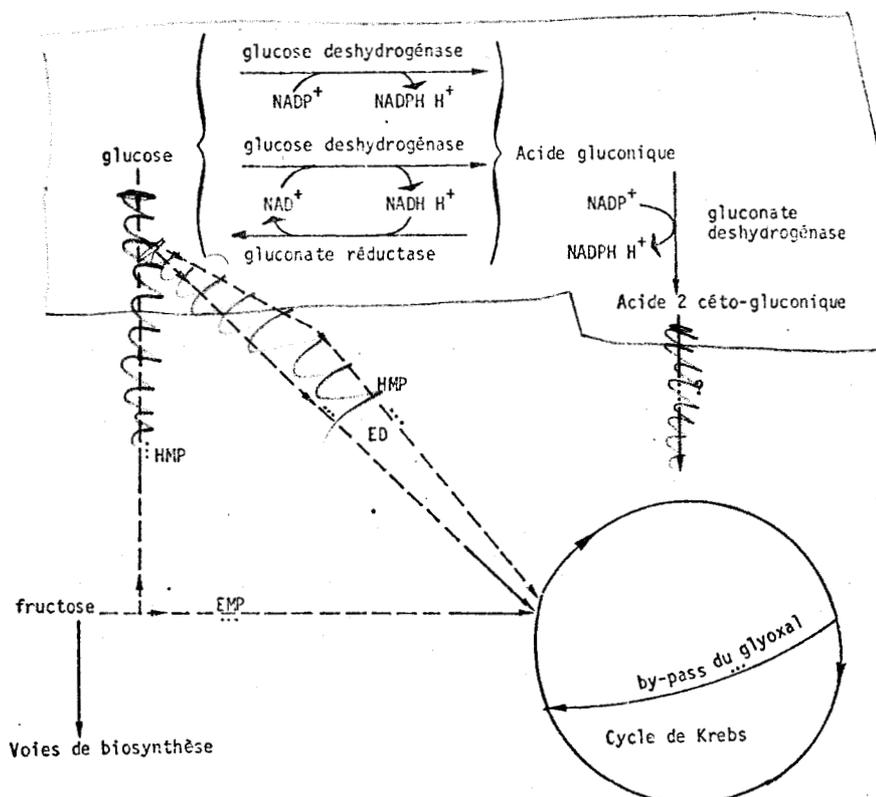


FIGURE 36

Voies de dégradation du glucose et du fructose par Rhizobium meliloti.

- en trait plein : d'après nos travaux,
- en trait pointillé : d'après la bibliographie.

L'accumulation d'acide 2 céto-gluconique par Rhizobium meliloti en présence de glucose n'a été à notre connaissance décrite par aucun auteur.

Par contre, le phénomène est observé chez Acetobacter suboxydans [73], Acetobacter melagenum [24,64] et très récemment chez Pseudomonas fluorescens [89,90]. Il existe donc une analogie certaine entre les voies de dégradation du glucose chez ces trois genres bactériens : Acetobacter, Pseudomonas et Rhizobium. La classification actuelle ne permet cependant pas d'assurer leurs relations phylogéniques que seule la taxonomie numérique pourrait préciser.

Nous avons ainsi mis à jour une voie de l'acide 2 céto-gluconique venant compléter d'autres voies de dégradation du glucose et du fructose chez Rhizobium meliloti. Cette étude doit maintenant être poursuivie par la recherche de l'ensemble des enzymes responsables de ce métabolisme, de leur taux d'activité et de leur régulation.

VII

B I B L I O G R A P H I E

- I. ALLEN, C.F.H.
J. Am. Chem. Soc., 1930, 52, 2955.
2. ALLEN, E.K. and ALLEN, O.N.
Bacteriol. Rev., 1950, 14, 273-330.
3. AMARGER N., OBATON, M. and BLACHERE, M.
Can. J. Microbiol., 1967, 13, 99-105.
4. APRISON, M.H., MAGEE, W.E. and BURRIS, R.H.
J. Biol. Chem., 1954, 208, 29.
5. ARIAS, A. and MARTINEZ DE DRETS, G.
Can. J. Microbiol., 1976, 22, 150-153.
6. BALDWIN, I.L. and FRED, E.B.
Soil Sci., 1927, 24, 217-230.
7. BERGERSEN, F.J.
Australian J. Biol. Sci., 1965, 18, 1.
8. BERGERSEN, F.J.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 130, 304-312.
9. BERGERSEN, F.J.
Ann. Rev. Plant Physiol., 1971, 22, 121-140.
10. BERGERSEN, F.J. and BRIGGS, M.J.
J. Gen. Microbiol., 1958, 19, 482-490.
11. BERGERSEN, F.J. and TURNER, G.L.
Biochem. Biophys. Acta, 1967, 141, 507-515.
12. BERGMAYER, H.U. and BERNT, E.
Methods of enzymatic Analysis, Academic Press, New-York, 1963,
123-130.

13. BRISOU, J., TYSSET, C., DE RAUTLIN DE LA ROY, Y., CURSIER, R.
et MOREAU, R.

Ann. Inst. Pasteur, 1964, 106, 469.

14. BRYANT, F. and OVERELL, B.T.

Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 471.

15. BURRIS, R.M., PHELPS, A.S. and WILSON, J.B.

Soil Sci. Soc. Am. Proc., 1942, 7, 272-275.

16. BURTON, J.C.

Microbial Technology, 1967, p. 17 Edited by H.J. PEPLER and
published by Reinhold, New-York.

17. CAVELLINI,

Ricerca Sci., 1950, 20, 803.

18. CHEFTEL, R.I., MUNIER, R. et MACHEBOEUF, M.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 34, 380.

19. COURTOIS, B.

Thèse de Doctorat de 3ème cycle Univ. Sc. & Tech. Lille I,
1975, n° 559.

20. COURTOIS, B., DERIEUX, J.C. et HORNEZ, J.P.

Ann. Inst. Pasteur - Paris, 1975, 126B (1), 1-15.

21. COZZARELLI, N.R., FREE, W.B. and LIN, E.C.C.

J. Mol. Biol., 1968, 31, 371-387.

22. DAHMS, A.S. and ANDERSON, R.L.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 36, 809-814.

23. DART, P.J. and MERCER, F.V.

Arch. Mikrobiol., 1963, 46, 382.

24. DATTA, A.G. and KATZNELSON, H.

Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 576-578.

25. DATTA, A.G. and KATZNELSON, H.
Nature, 1957, 179, 153
26. DELATTRE, J.M.
Thèse de Docteur Ingénieur n° 121 Univ. Sc. et Tech. Lille I, 19
27. DE LEY, J. in S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN.
Methods in enzymology, Academic Press New-York, 1966, IX, 196-200
28. DENISON, F.W. and PHARES, E.F.
Anal. Chem., 1952, 24, 1628.
29. DILWORTH, M.J.
Ann. Rev. Plant Physiol., 1974, 25, 81-114.
30. DIXON, R.O.D.
Arch. Mikrobiol., 1964, 48, 166.
31. DIXON, R.O.D.
Ann. Rev. Microbiol., 1969, 23, 137-158.
32. DUDMAN, W.F.
J. Bacteriol., 1964, 88, 640-645.
33. DURRUM, E.L.
J. Colloid. Sc., 1951, 6, 274.
34. EISENBERG, R.C. and DOBROGOSZ, W.J.
J. Bacteriol., 1967, 93, 941-949.
35. ELKAN, G.H. and KWIK, I.
J. Appl. Bacteriol., 1968, 31, 399-404.
36. ENTNER, N. and DOUDOROFF, M.
J. Biol. Chem., 1952, 196, 853.

37. ERTOLA, R.J., MAZZA, L.A., BALATTI, A.P., CUEVAS, C.M. and DAGUERRE, R.

Soil Sci., 1969, 108, (5), 373-380.

38. EVANS, W.R. and KEISTER, D.L.

Can. J. Microbiol., 1976, 22 (7), 949-952.

39. EVANS, H.J. and RUSSEL, S.

Plant Physiol. Suppl., 1965, 40, iii.

40. EVANS, H.J., BISHOP, P.E. and ISRAEL, D.

Proc. Int. Conf. Nitrogen Fixation, 1975 In Press.

41. FAHRAEUS, G.

J. Gen. Microbiol., 1957, 16, 374.

42. FORSYTH, W.C.G., HAYWARD, A.C. and ROBERTS, J.B.

Nature, 1958, 182, 800.

43. FRED, E.B., BALDWIN, I.L. and Mc. COY, E.

Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants Madison, Wis : Univ. Wisconsin Press, 1932, 343p.

44. GEORGI, C.E. and ETTINGER, J.M.

J. Bacteriol., 1941, 41, 323-340.

45. GIBSON, A.H., SCOWCROFT, W.R., CHILD, J.J. and PAGAN, J.D.

Arch. Microbiol., 1976, 108 (1), 45-54.

46. GOODCHILD, D.J. and BERGERSEN, F.J.

J. Bacteriol., 1966, 92, 204.

47. GRAHAM, P.H.

Ant. Van. Leewenhoek, 1964, 30, 68-72.

48. HAACK, A.

Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt., 1964, 117, 343.

49. HAMBLIN, J. and KENT, S.P.
Nature New Biol., 1973, 245, 28-30.
50. HARWARY, and THOMPSON
Biochem. J., 1953, 53, 340.
51. HAUGH, A. and LARSEN, B.
Acta Chem. Scand., 1961, 15, 1395.
52. HAYWARD, A.C., FORSYTH, W.G.C. and ROBERTS, J.B.
J. Gen. Microbiol., 1959, 20, 510-518.
53. HELLRIEGEL, H. und WILLFORTH, H.
Beilage Z. Vers. Rubenzuckerind., 1888, I-234.
54. HOCKENHULL and FLOODGATE
Biochem. J., 1952, 52, 38.
55. HOCKENHULL, HUNTER and HERBERT
Chem. and Ind., 1953, 53, 127.
56. HOPKINS, C.G.
J. Amer. Chem. Soc., 1902, 24, 1155.
57. HORNEZ, J.P., COURTOIS, B., DEFIVES, C. et DERIEUX, J.C.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1974, 278, 157-160.
58. HORNEZ, J.P., COURTOIS, B. et DERIEUX, J.C.
C.R. Ac. Sc. PARIS, 1976, Série D, sous presse.
59. HUBBEL
Botan. Gaz., 1970, 131, 337.
60. JOHNSON, G.V., EVANS, M.J. and CHING, T.M.
Plant Physiol., 1966, 41, 1330.

61. JORDAN, D.C.
Bacteriol. Rev., 1962, 26, 119-141.
62. KATZNELSON, H.
Nature, 1955, 175, (4456) 551-552.
63. KATZNELSON, H.
Can. J. Microbiol., 1958, 4, 25-34.
64. KATZNELSON, H., TANENBAUM, S.W. and TATUM, E.L.
J. Biol. Chem., 1953, 204, 43-59.
65. KATZNELSON, H. and ZAGALLO, A.C.
Can. J. Microbiol., 1957, 3, 879-884.
66. KEELE, B.B., HAMILTON, P.B. and ELKAN, G.H.
J. Bacteriol., 1969, 97, 1184-1191.
67. KEELE, B.B., HAMILTON, P.B. and ELKAN, G.H.
J. Bacteriol., 1970, 101, 698-704.
68. KEISTER, D.L. and EVANS, W.R.
J. Bacteriol., 1976, 129 (1), 149-153.
69. KENNEDY, I.R.
Biochim. Biophys. Acta, 1966a, 130, 285-294.
70. KENNEDY, I.R.
Biochim. Biophys. Acta, 1966b, 130, 295.
71. KENNEDY, I.R., PARKER, C.A. and KIDBY, D.K.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 130, 517.
72. KIJNE, J.W.
Physiol. Plant Pathol., 1974.

73. KITOS, P.A., WANG, C.H., MOHLER, B.A., KING, T.E. and CHELDELIN, V.
J. Biol. Chem., 1958, 233, 1295-1298.
74. KOCH, B., EVANS, H.J. and RUSSELL, S.A.
Plant Physiol., 1967, 42, 466-468.
74. KOCH, J.P., HAYASHI, S. and LIN, E.C.C.
J. Biol. Chem., 1964, 239, 3106-3108.
76. KOVACHEVICH, R. and WOOD, W.A.
Bact. Proc. Soc. Amer. Bact., 1954, 109.
77. KUHN, R. und BÄR, F.
Ber. Chem. Ges., 1934, 67B, 898.
78. LAIRD, D.J.
Arch. Mikrobiol., 1932, 3, 159-193.
79. LANGE, R.T.
J. Gen. Microbiol., 1961, 26, 351-359.
80. LANNING, S.C. and COHEN, S.S.
J. Biol. Chem., 1951, 189, 109-114.
81. LATURAZE, J.
Thèse Doct. Etat Pharmacie n° 247, 1959, Lille.
82. LJUNGGREN, H.
Physiol. Plantarum, 1969, suppl. 5.
83. LJUNGGREN, H. and FAHRAEUS, G.
J. Gen. Microbiol., 1961, 26, 521.
84. LOPRETO, C.R., MAZZA, L.A. and BALATTI, A.P.
An. Soc. Cient. Argent., CSCLII, 35-47.

85. LUEKING, D., TOKUHISA, D. and SOJKA, G.
J. Bacteriol., 1973, 115, 897-903.
86. LUGG, L.W. and OVERELL, B.T.
Nature, 1947, 160, 87.
87. LULLA, B.S. and JOHAR, D.S.
Current Sci. India, 1954, 23, 362.
88. LUNDGREN, D.G., ALPER, R., SCHNAITMAN, C. and MARCHESSAULT, R.M.
J. Bacteriol., 1965, 89, 245-251.
89. LYNCH, W.H., Mc LEOD, J. and FRANKLIN, M.
Can. J. Microbiol., 1975, 21, 1553-1559.
90. LYNCH, W.H., Mc LEOD, J. and FRANKLIN, M.
Can. J. Microbiol., 1975, 21, 1560-1572.
91. Mc COMB, J.A., ELLIOTT, J. and DILWORTH, M.J.
Nature, 1975, 256, 409-410.
92. MACEK and TADRA
Chem. Lisky, 1952, 46, 450.
93. MAC GEE, J. and DOUDOROFF, M.
J. Biol. Chem., 1954, 210, 617.
94. MARTINEZ DE DRETS, G. and ARIAS, A.
J. Bacteriol., 1970, 103 (1), 97-103.
95. MARTINEZ DE DRETS, G. and ARIAS, A.
J. Bacteriol., 1972, 109, 467-470.
96. MICHL, H.
Monatsh Chem., 1951, 82, 489.

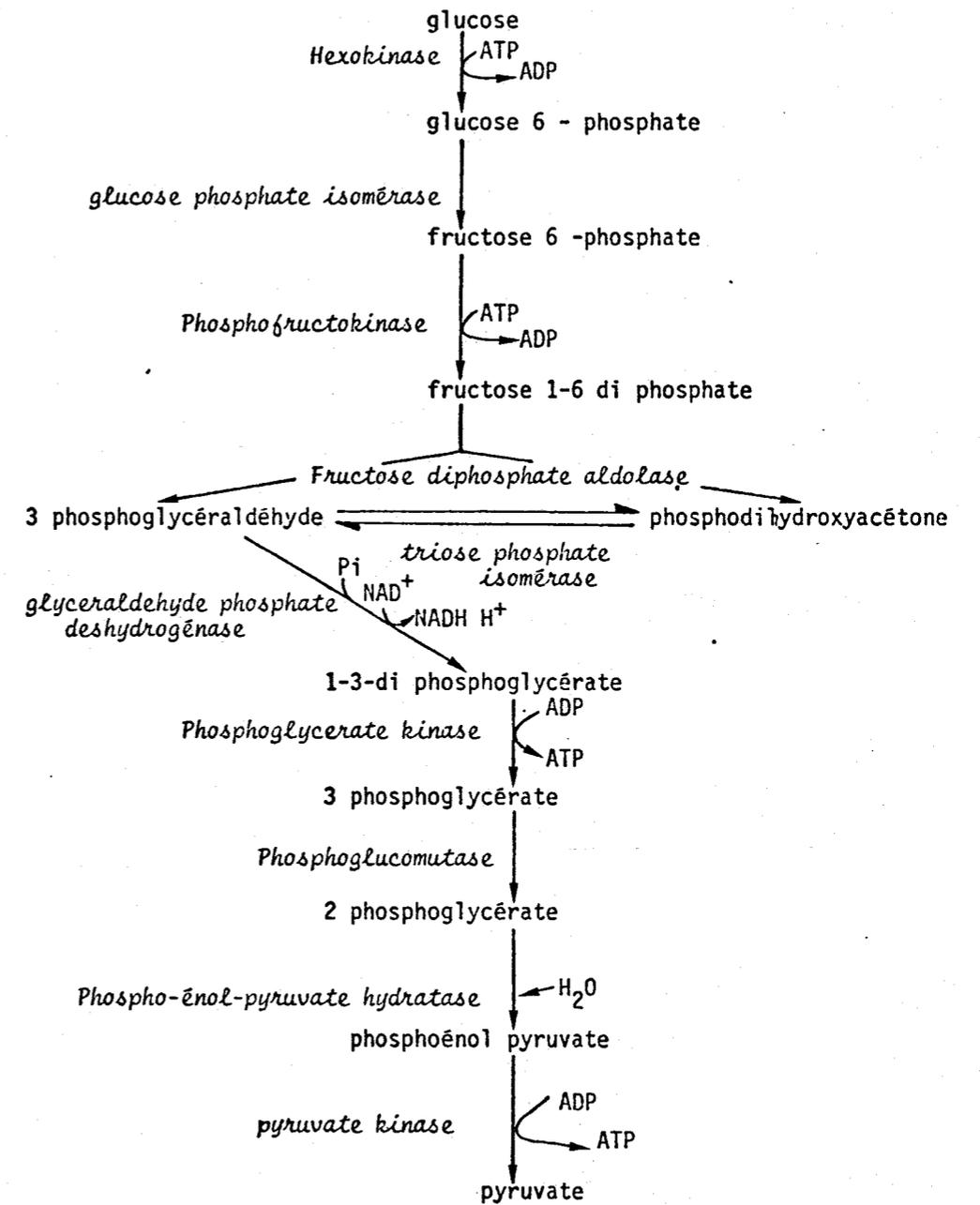
97. MIETTINEN, J.K. and VIRTANEN, A.I.
Ann. Acad. Sc. Fennicae, 1951, 41A, I.
98. MIKHAILOV, M.K.
Compt. Rend. Ac. Bulg. Sci., 1955, 8 (I), 45.
99. MONTREUIL, J. et SPIK, G.
Monographie n° 2, Labor. Chim. Biol. Univ. Sc. et Tech. Lille I,
1968, 172.
100. MOONEY, P. and FOTTRELL, P.F.
Biochem. J., 1968, 110, 17.
101. MORRISON
J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 9483.
102. NEAL, O.R. and WALKER, R.H.
J. Bacteriol., 1935, 30, 173-187.
103. NICOL, H. and THORNTON, H.G.
Proc. Roy. Soc. London, Sev. B, 1941, 32-59.
104. NORRIS, D.O.
Plant Soil, 1965, 22, 143-166.
105. NUTMAN, P.S.
J. Exptl. Botany, 1959, 10, 250.
106. NUTMAN, P.S., DONCASTER, C.C. and DART, P.J.
Infection of clover by root nodule bacteria. Black and white,
16mm optical sound track film available from the British Film
Institute, 81 Dean Street, London W1V6AA.
107. PARTRIDGE, S.M.
Biochemical Society Symposia, 1949, 3, 52.

- IO8. PEDROSA, O.F. and ZANCAN, G.T.
J. Bacteriol., 1974, 113 (2), 336-338
- IO9. PREVOT, A.R.
Traité de systématique bacterienne, 1961.
- II0. REGNA, P.P. and CALDWELL, B.P.
J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 243.
- III. RUSH, D., KARIBIAN, D., KARNOVSKY, M. and MAGASANIK, B.
J. Biol. Chem., 1957, 226, 891-899.
- II2. SADOFF, H.L. in S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN
Methods in enzymology, Academic Press, New-York, 1966, IX, 103-107
- II3. SCOLNICK, L.M. and LIN, E.C.C.
J. Bacteriol., 1962, 85, 601-617.
- II4. SELIGSON and SHAPIRO.
Anal. Chem., 1952, 24, 754.
- II5. SMITH and TAYLOR.
Biochem. J, 1953, 55, XXX.
- II6. SMITHIES, W.R., GIBBONS, N.E. and BAYLEY, S.
Can. J. Microbiol., 1955, I, 605-613.
- II7. STILL, G.G. and WANG, C.H.
Arch. Biochem. Biophys., 1964, 105, 126-132.
- II8. SUTHERLAND, I.W.
in Advance in microbial physiology, 1972, 8, 143-213.
- II9. THORNE, D.W. and BURRIS, R.H.
J. Bacteriol., 1940, 39, 187-196.

- I20. TOMS, G.C.
Phytohaemagglutinins in chemotaxonomy of leguminosae eds
J.B. Harbone, D.B. Oulter and B.L. Turner, Acad. Press,
London & New-York, 1971, I, 367-462.
- I21. TU, J.C.
J. Bacteriol, 1974, II9, 986-991.
- I22. TUZIMURA, K. and MEGURO, H.
J. Biochem., 1960, 47, 391-397.
- I23. UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. and STAUFFER, J.F.
"Manometric Techniques", Burgess Publishing Co. 1959.
- I24. VINCENT, J.M.
International Biological Programme, Handkoob n° 15, 1970
Blackwell Scientific-Oxford.
- I25. VINCENT, J.M., THOMPSON, J.A. and DONAVAN, K.O.
Australian J. Agr. Res., 1962, 13, 258-270.
- I26. VORHEES, E.B. and LIMPAN, J.G.
J. Amer. Chem. Soc., 1905, 27, 556.
- I27. WALKER, R.H., ANDERSON, D.A. and BROWN, P.E.
Soil Sci., 1933, 37, 387-400.
- I28. WEBER, H.A.
J. Amer. Chem. Soc., 1898, 20, 9.
- I29. WILEY.
J. Amer. Chem. Soc., 1894, 16, I.
- I30. WONG, P.P. and EVANS, H.J.
Plant Physiol. Suppl., 1969, 44, 35.

- I31. WOOD, W.A. and SCHWERDT, R.F.
J. Biol. Chem., 1954, 206, 625.
- I32. WRIGHT, W.H.
Soil Sci., 1926, 20, 95-129.
- I33. WURTZ, B. et JEHL, C.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, 1139.

ANNEXE I



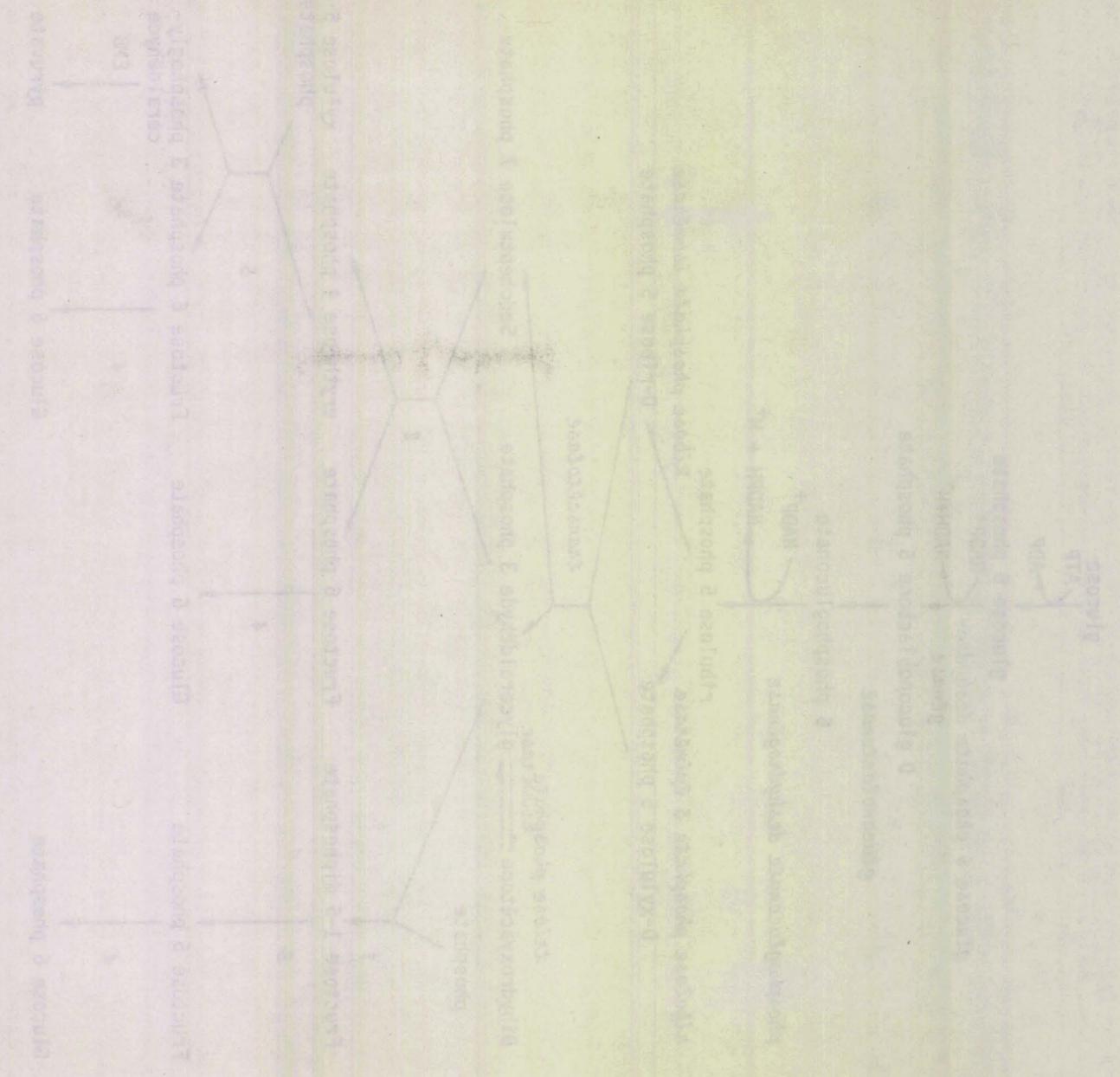
ANNEXE 1

Métabolisme du glucose par la voie de Embden - Meyerhoff - Parnas (EMP)



1 - 2 - 3 - 4 - 5 : Eukarya (1014) (1014) (1014) (1014) (1014)
 on loje me puvata puvata (1014)
 puvata (1014) (1014) (1014) (1014) (1014)

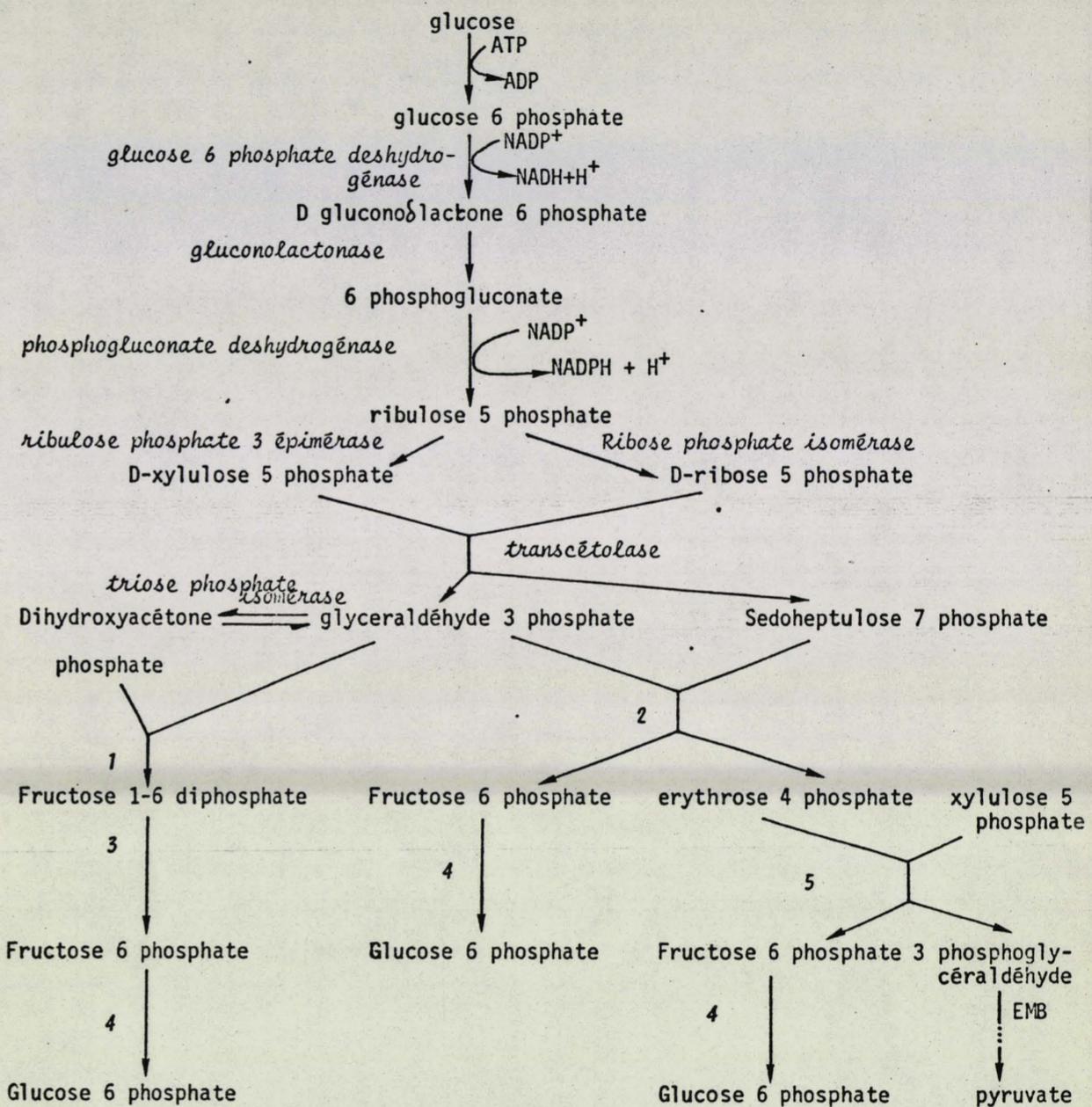
Y A R K A L



ANNEXE 2

- 1 - Eukarya (1014)
- 2 - Prokaryota (1014)
- 3 - Lipid (1014)
- 4 - Carbohydrate (1014)
- 5 - Nucleic acid (1014)

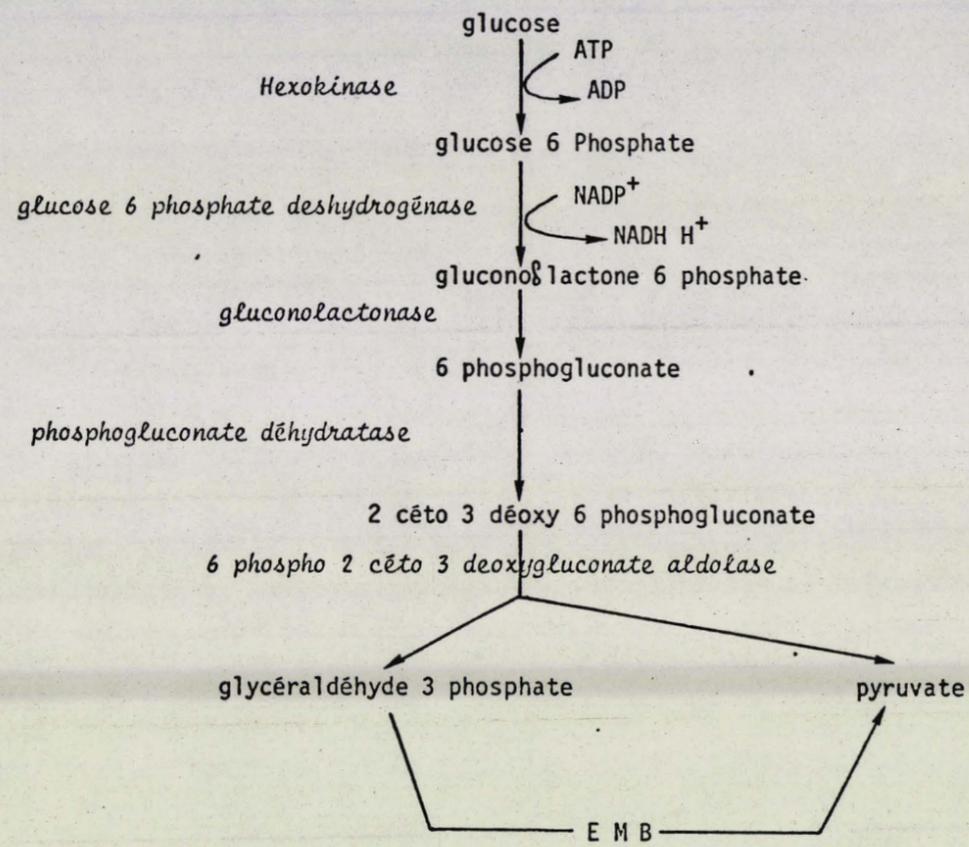
- 1 - Fructose 1-6 diphosphate aldolase
- 2 - Transaldolase (E.C. 2.2.1.2.)
- 3 - Hexose diphosphatase
- 4 - Glucose phosphate isomérase
- 5 - Transcétolase



ANNEXE 2

Métabolisme du glucose par la voie de Dickens Horecker (DH) ou voie des pentoses ou voie des hexoses monophosphates (HMP).

1 - 2 - 3 - 4 - 5 : Enzymes (voir nomenclature page ci-contre).



ANNEXE 3

Métabolisme du glucose par la voie d'Entner-Doudoroff (ED)

