

50376
1979
3

N° d'ordre : 778

50376
1979
3

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

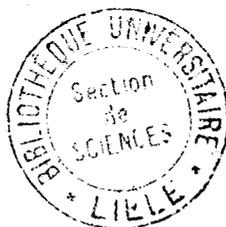
DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité : BIOCHIMIE

Mention : MICROBIOLOGIE

par

Christian NIEL



ETUDE DE L'UTILISATION DU LACTOSE A L'AIDE DE MUTANTS CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI

Soutenue le 14 septembre 1979, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury : MM.

J. GUILLAUME

Président

J. KREMBEL

Rapporteur

Melle

G. SPIK

Examineur

MM.

C. BONNIER

Examineur

G. MARTIN

Examineur

A MES PARENTS

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Tout au long de cette étude, Monsieur GUILLAUME m'a constamment prodigué ses conseils et la plupart des résultats obtenus n'auraient pu l'être sans son aide. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Professeur KREMBEL pour l'amabilité avec laquelle il a accepté d'être le rapporteur de cette thèse.

J'exprime aussi ma gratitude à Mademoiselle le Professeur SPIK, à Monsieur le Recteur BONNIER et à Monsieur le Professeur MARTIN pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Que tous mes collègues du Laboratoire qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail soient remerciés de leur amicale collaboration.

L'ensemble du sujet constitue un travail d'équipe : Messieurs DELMAERE et BECHET ont participé à l'obtention de certains résultats, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie également Monsieur le Professeur MOSCHETTO et le personnel de son Service I.N.S.E.R.M. qui m'ont permis d'utiliser le matériel avec lequel les courbes de croissance diauxiques ont pu être obtenues.

Je tiens à associer à ce travail mon épouse, Monique, qui a su comprendre et accepter les exigences de ma vie professionnelle.

Table des Matières

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	8
I. SOUCHES BACTERIENNES.....	8
A. Isolement.....	8
B. Conservation.....	9
C. Propriétés symbiotiques.....	9
II. MILIEUX DE CULTURE ET PRODUITS CHIMIQUES.....	9
A. Milieux de culture.....	9
B. Osés, osides et analogues.....	10
III. CROISSANCES.....	11
IV. PREPARATIONS, MESURES DES ACTIVITES ET ETUDES ENZYMATIQUES.....	11
A. Préparations des extraits bruts.....	11
B. Mesures des activités enzymatiques.....	11
C. Purifications partielles et études des enzymes.....	12
1. Purification partielle de l'enzyme A.....	12
2. Purification partielle de l'enzyme B.....	12
3. Electrophorèse en gel d'agar.....	12
4. Chromatographie d'échange d'ions.....	13
5. Inactivation thermique irréversible.....	13
V. MESURE DE LA PENETRATION DU LACTOSE ET DE L'IPTG DANS LES CELLULES.....	13
A. Temps courts.....	13
B. En culture.....	14
<u>RESULTATS, CHAPITRE I. CROISSANCE DE LA SOUCHE DE TYPE SAUVAGE</u>	
<u>2011 Str3 ET DE SON MUTANT 2011 L⁻i</u>	15
I. CROISSANCE EN PRESENCE DE β -GALACTOSIDES.....	15
A. Milieu minimum.....	15
B. Milieu riche.....	17

II. CROISSANCE EN PRESENCE D'AUTRES SOURCES DE CARBONE.....	17
<u>CHAPITRE II. ACTIVITES β-GALACTOSIDASQUES DES CELLULES ENTIERES DE LA</u>	
<u>SOUCHE DE TYPE SAUVAGE 2011Str3 ET DE SON MUTANT 2011 L⁻i.....</u>	22
I. RECHERCHE DE L'ACTIVITE β -GALACTOSIDASIQUE DANS DIFFERENTES	
CONDITIONS.....	22
II. INDUCTIBILITE DES ACTIVITES β -GALACTOSIDASQUES.....	24
<u>CHAPITRE III. MISE EN EVIDENCE ET FONCTION PHYSIOLOGIQUE DES DEUX</u>	
<u>ENZYMES A ACTIVITE β-GALACTOSIDASIQUE.....</u>	30
I. METHODES INDIRECTES DE MISE EN EVIDENCE DES DEUX ENZYMES A ACTIVITE	
β -GALACTOSIDASIQUE A ET B.....	30
A. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.....	30
B. Inactivation thermique irréversible.....	31
C. Double traitement à 48°C.....	32
D. Précipitation au sulfate d'ammonium après traitement à 48°C.....	33
II. SEPARATION DES DEUX ENZYMES A ACTIVITE β -GALACTOSIDASIQUE A ET B....	34
A. Electrophorèse en gel d'agar.....	35
B. Chromatographie d'échange d'ions.....	36
III. PROPRIETES ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ENZYMES A ET B.....	37
A. Constantes de Michaelis.....	37
B. Inhibiteurs.....	39
C. Inactivation thermique irréversible.....	41
D. Equation de DIXON et WEBBS.....	41
<u>CHAPITRE IV. ETUDE COMPAREE DU MUTANT 2011 L⁻i ET DE MUTANTS LAC⁺</u>	
<u>DIFFERENTS DU TYPE SAUVAGE.....</u>	44
I. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE MUTANTS LAC ⁺ DIFFERENTS DU TYPE	
SAUVAGE.....	44
A. Isolement.....	44
B. Croissance.....	44

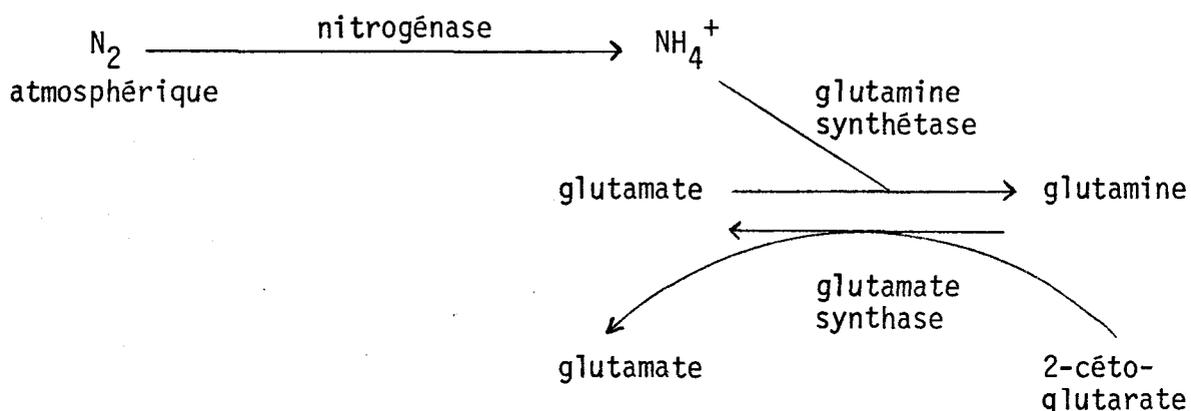
C. Activité β -galactosidasique des cellules entières.....	45
D. Inactivation thermique.....	45
E. Propriétés symbiotiques.....	48
F. Fréquence de mutation.....	48
II. COMPARAISON DES ACTIVITES β -GALACTOSIDASQUES DES SOUCHES 2011 L ⁻ⁱ	
ET 2011 L ⁺ⁱ³	49
A. Inductibilité.....	49
B. Activités β -galactosidasiques et lactasiques des extraits bruts..	50
C. Inactivation.....	50
D. Electrophorèse en gel d'agar.....	51
III. MESURE DE LA PENETRATION DU LACTOSE ET DE L'IPTG DANS LES CELLULES.	51
A. Temps courts.....	51
B. Temps longs.....	54
IV. ETUDE ET DISCUSSION DU PROBLEME POSE PAR LA DIFFERENCE DE CROISSANCE	
ENTRE LES MUTANTS 2011 L ⁻ⁱ ET 2011 L ⁺ⁱ³ SUR MILIEU MINIMUM LACTOSE.	55
A. Rendement énergétique.....	57
B. Rétroinhibition.....	59
C. Répression catabolique.....	60
<u>DISCUSSION</u>	62

BIBLIOGRAPHIE

Introduction

GENERALITES

A l'état libre, les bactéries du genre Rhizobium ne sont pas des fixateurs d'azote moléculaire, contrairement à celles des genres Klebsiella, Azotobacter et Clostridium. Par contre, la symbiose formée par les Rhizobium et les plantes du groupe des légumineuses est responsable de la majeure partie de la fixation biologique de l'azote dans le monde (1). Pour les légumineuses, l'intérêt retiré de cette association est l'acquisition d'une source d'azote abondante et directement utilisable par elles, les ions ammonium. Quant au Rhizobium spécifique de la légumineuse avec laquelle il s'associe, il peut très bien survivre et se développer seul dans le sol ; ce point est encore mal connu, car on ne dispose pas encore de caractères convenables d'identification et de sélection des rhizobia à l'état non symbiotique. Quel est, pour la bactérie, l'intérêt qu'elle peut retirer de son association avec la plante ? D'abord, la possibilité pour le Rhizobium d'utiliser les substrats azotés synthétisés dans le nodule. KONDOROSI et coll. (2) ont émis l'hypothèse que les enzymes glutamine synthétase (E.C. 6.3.1.2) et glutamate synthase (E.C. 2.6.1.15) de la plante sont responsables de la synthèse du glutamate à partir des ions ammonium libérés par la nitrogénase (E.C. 1.7.99.2) du bactéroïde.



Un autre intérêt pour le Rhizobium réside en la fourniture par la plante à la bactérie de substrats carbonés. Enfin, la bactérie bénéficie d'une certaine protection physique, étant beaucoup moins vulnérable aux agressions physiques dans le nodule qu'à l'état libre dans le sol.

Le nombre de chercheurs intéressés au problème de la symbiose

Rhizobium-Légumineuses ou au Rhizobium seul a considérablement augmenté ces toutes dernières années. Ceci est certainement une des conséquences indirectes de l'augmentation importante du prix des approvisionnements énergétiques qui a eu lieu à partir de 1973. On essaie actuellement de remplacer les engrais azotés par la fixation biologique de l'azote ; ces engrais sont aujourd'hui onéreux et -autre inconvénient- ils sont soumis à un lessivage dans le sol dû aux pluies, ce qui entraîne une perte considérable et une pollution des cours d'eau et des nappes phréatiques.

ETUDES GENETIQUES CHEZ RHIZOBIUM

Les voies d'avenir qui permettront peut être de réduire considérablement la consommation des nitrates et donc de faire des économies d'énergie sont les suivantes :

- à court terme, améliorer les rendements de la fixation biologique de l'azote chez les légumineuses ;
- à moyen terme, réaliser des symbioses bactéries efficaces-espèces végétales non légumineuses ;
- à long terme, en utilisant les techniques modernes de transfert génétique, d'hybridation, de sélection et de culture, obtenir des plantes nouvelles capables de fixer l'azote de l'atmosphère avec des rendements encore inconnus à ce jour.

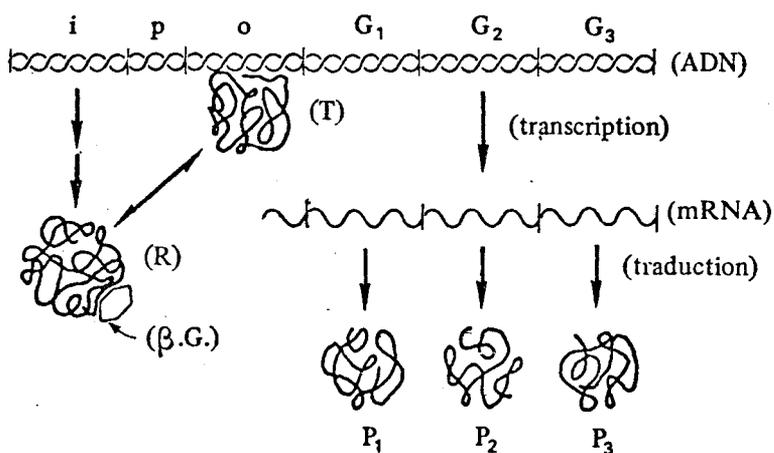
Pour atteindre ces buts ambitieux, une connaissance approfondie de la génétique des bactéries capables de fixer l'azote est nécessaire. Les études de génétique fondamentale actuellement menées sur la fixation de l'azote ont pour but d'identifier les gènes qui en sont responsables, de les localiser sur le génome et de savoir quelles sont les conditions requises pour que ces gènes puissent s'exprimer. Chez Rhizobium, en plus des gènes de la fixation de l'azote proprement dits (gènes nif : "nitrogen fixation"), existent les gènes responsables de la spécificité d'hôte et de l'aptitude à la nodulation. La mise en évidence des plasmides chez Rhizobium meliloti a été faite dans notre laboratoire (3).

Il y a une dizaine d'années, certains auteurs pensaient que les légumineuses possédaient l'information génétique requise pour la synthèse de la nitrogénase, complexe enzymatique de réduction de l'azote (4). HOLSTEN et coll. (5) utilisent en 1971 la technique consistant à remplacer l'azote par de l'acétylène et à mesurer sa réduction par calcul de la quantité d'éthylène formé (6). Ils constatent une réduction d'acétylène par un mélange Rhizobium - culture de cellules végétales. Depuis 1975, sont apparues des publications décrivant la mise en évidence de la fixation non-symbiotique de l'azote par des souches de Rhizobium du "cowpea-group" (7 à 10), Rhizobium japonicum (8, 10, 11, 13, 14), Rhizobium léguminosarum (8), Rhizobium meliloti (12) et Rhizobium trifolii (14). Au vu de ces résultats obtenus dans des conditions très particulières de laboratoire, on affirme maintenant que le Rhizobium possède toutes les informations génétiques nécessaires à la fixation de l'azote. Celles-ci ne peuvent pas s'exprimer chez la bactérie à l'état libre dans le sol, mais seulement dans le micro-environnement du nodule ou dans certaines conditions de laboratoire. Depuis quelques années, le nombre de publications concernant la génétique du genre Rhizobium s'est fortement accru. Des transferts génétiques ont été réalisés entre souches ou espèces de Rhizobium et aussi entre Rhizobium et d'autres genres bactériens au moyen de la transformation (15 à 20), de la transduction (21 à 23) et surtout de la conjugaison (24 à 33). Quelques cartes génétiques ont été établies grâce à l'emploi de plasmides de résistance aux antibiotiques du groupe d'incompatibilité P₁ capables de mobiliser le chromosome de Rhizobium. On y trouve localisées des mutations de deux types : résistance à un antibiotique (streptomycine, rifampicine, novobiocine, spectinomycine), et exigence en un facteur de croissance (acide aminé, base nucléique, plus rarement vitamine). De ces premières cartes génétiques, qui possèdent au demeurant peu de caractères, deux grands types de mutations sont absentes. D'une part, les mutations concernant les caractères symbiotiques qui ont parfois été obtenues (34 à 39) et même transférées par conjugaison (40 à 44), mais encore jamais localisées, d'autre part des mutations portant sur le métabolisme des glucides. En ce qui concerne les régulations de la synthèse et de l'activité des enzymes dans la cellule de Rhizobium, le seul point important qui commence à être bien connu intéresse le métabolisme de l'azote (2 ; 45 à 49) ; l'implication de ces régulations sur l'activité de la nitrogénase est souvent à la base de telles études. Cependant, ce système de régulations est malheureusement complexe et de plus, fonctionne peut être différemment chez

la bactérie et chez le bactéroïde, la quantité d'ADN étant différente (50 à 52). Les régulations qui ont été essentiellement abordées pour les enzymes impliqués dans les transferts de groupements aminés ne l'ont pas été pour ceux du métabolisme glucidique et jusqu'en 1977, aucun mutant catabolique n'avait été décrit chez Rhizobium. Or, c'est justement le métabolisme glucidique qui fournit les moyens les plus simples et les plus convenables d'étude des régulations fonctionnant dans une cellule bactérienne. L'étude de l'utilisation du lactose, très employée pour l'étude des régulations chez Escherichia coli, nous est apparue particulièrement intéressante. L'hydrolyse du lactose en glucose + galactose est la première étape, obligatoire, du catabolisme du lactose, elle est indépendante du métabolisme intermédiaire. Enfin, chez Rhizobium, elle n'est certainement pas impliquée dans les processus de symbiose.

L'UTILISATION DU LACTOSE

On sait que des mutants Lac⁻ d'Escherichia coli ont permis un progrès considérable dans la connaissance du génome de cette espèce et c'est l'opéron lactose de cette bactérie, le premier découvert, qui a servi à l'étude des régulations de l'expression du génome (53). Le schéma ci-dessous, qui représente l'opéron lactose est extrait du livre de MONOD : "Le hasard et la nécessité" (54).



*Régulation de la synthèse des enzymes
du « système lactose ».*

R : Protéine-répresseur, dans l'état associé au galactoside induc-
teur, représenté par un hexagone.
T : Protéine-répresseur dans l'état associé au segment opérateur
(o) de l'ADN.
i : « Gène régulateur » gouvernant la synthèse du répresseur.
p : Segment « promoteur », point de départ de la synthèse du
RNA messenger (m RNA).
G₁, G₂, G₃ : Gènes de « structure » gouvernant la synthèse des
trois protéines du système, notées P₁, P₂, P₃.

Cet opéron contient trois gènes de structure : le gène lacZ code pour la synthèse de la β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) ; le gène lacY pour la β -galactoside perméase et le gène lacA pour la thiogalactoside transacétylase. Actuellement, la β -galactosidase est une enzyme très bien étudiée. C'est une protéine tétramérique de poids moléculaire 540 000 (55 à 57) dont la séquence des 1021 acides aminés de chaque monomère a été totalement déterminée (58) ; elle peut catalyser l'hydrolyse du lactose et de très nombreux β -galactosides synthétiques (59), mais non celle des thiogalactosides. Elle transforme le lactose en allolactose, inducteur naturel de l'opéron lactose (60). La β -galactoside perméase a aussi fait l'objet de nombreuses études (61 à 63) et son isolement est en cours. Quant à la thiogalactoside transacétylase, son rôle "in vivo" reste obscur même si ANDREWS et LIN (64) affirment qu'elle procure un avantage sélectif aux cellules d'Escherichia coli qui croissent sur un β -galactoside en présence d'analogues non métabolisables. La très bonne connaissance de la β -galactosidase d'Escherichia coli, enzyme qui fut peut être la plus étudiée dans le monde microbien, a aussi facilité la compréhension du phénomène de répression catabolique. Le glucose qui est la source de carbone permettant le plus fort taux de croissance chez Escherichia coli, inhibe indirectement la synthèse de la β -galactosidase et des autres enzymes nécessaires à la dégradation des autres oses et osides. Cet effet, observé chez d'autres bactéries et chez des levures, est appelé répression catabolique. L'AMPc apparaît comme le responsable du contrôle de la synthèse de ces enzymes (65). Malgré l'excellente connaissance que l'on a sur la dégradation du lactose chez Escherichia coli, c'est seulement depuis 1973 que l'on sait que cet organisme possède non pas une, mais deux β -galactosidasés. En effet, à la suite de la découverte de mutants Lac⁺ chez une souche ayant une délétion sur le gène lacZ (66, 67), une autre enzyme douée d'activité β -galactosidasique a été mise en évidence (68), puis purifiée et caractérisée (69). Cette protéine est appelée ebg pour "evolved beta-galactosidase", elle donne une réaction immunologique différente de celle de la β -galactosidase lacZ. Son Km pour l'orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside est de 5 mM alors qu'il est de 1,3 mM pour la β -galactosidase lacZ. Son activité β -galactosidasique est extrêmement faible et son activité d'hydrolyse du lactose "in vivo" est insuffisante pour permettre à une souche de se développer sur un milieu où le lactose est la seule source de carbone, ceci reflète sa très faible affinité pour le lactose caractérisée par un Km de 1,15 M(70). HALL et HARTL ont montré qu'il existe deux gènes ebg. Un gène de structure ebgA code pour la

β -galactosidase et est situé à 59 mn sur la carte génétique d'Escherichia coli, il est éloigné du gène lacZ placé à 10 mn. L'autre gène, ebgR est un gène de régulation situé près de ebgA, il code pour une protéine répresseur. Pour qu'une souche portant une délétion sur le gène lacZ puisse se développer avec le lactose comme seule source de carbone, il faut :

- une mutation sur le gène ebgA conduisant à une enzyme ebg modifiée ayant une activité d'hydrolyse du lactose augmentée ;
- une mutation sur le gène régulateur ebgR permettant un taux d'expression de ebgA plus élevé (70, 71, 73, 74).

Chaque mutation prise séparément est insuffisante pour assurer un phénotype Lac⁺. Les mutations sur le gène régulateur ebgR sont de deux types. L'une, ebgR⁻ permet l'expression constitutive du gène ebgA et peut être attribuée à la perte de la fonction répresseur (72). L'autre type, ebgR^{+u}, conduit à un répresseur modifié permettant, après induction par le lactose, une synthèse d'enzyme ebg quatre fois plus importante mais inchangée quand il n'y a pas induction (74). HALL a réussi, par mutations, à diriger la spécificité de l'enzyme ebg vers une variété de nouveaux substrats. Ainsi, une mutation unique peut conduire à une spécificité pour le lactose (glucose- β -galactoside) (70 à 73), pour le méthyl- β -galactoside (75) ou pour le lactulose (fructose- β -galactoside) (73-76). Une spécificité pour le galactose-arabinoside requiert deux mutations dans le gène ebgA (76). Une spécificité pour le lactobionate (acide gluconique- β -galactoside) en exige trois (76). De ces substrats, seul le lactose est un inducteur efficace de la synthèse de l'enzyme ebg, alors que le méthyl-galactoside, le lactulose et le galactose-arabinoside sont de faibles inducteurs et le lactobionate n'est pas inducteur (74). Toutefois, des mutants ebgR^{+L} ont été obtenus chez lesquels les pouvoirs inducteurs du lactulose, du méthyl-galactoside et du galactose-arabinoside sont très augmentés (77).

Chez Klebsiella, HALL et REEVE (78) ont montré l'existence d'une troisième β -galactosidase chez une souche portant deux opérons lactose, l'un sur le chromosome, l'autre sur un plasmide. Cette β -galactosidase, dont la synthèse est induite par le lactose, hydrolyse l'orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside mais non le lactose.

Chez Pseudomonas, genre bactérien proche de Rhizobium au point de vue métabolisme des glucides, HIDALGO et coll. (79) ont montré qu'il existe aussi une β -galactosidase et certainement une β -galactoside perméase. Chez la souche

marine BAL 31 qu'ils ont étudiée, ces deux enzymes présentent certaines similitudes avec les enzymes correspondant d'Escherichia coli : la synthèse de la β -galactosidase est inductible par le lactose et par l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). Par contre, l'activité lactose perméasique ne serait mesurable que quand les cellules ont été cultivées sur lactose et non dans un milieu riche additionné d'IPTG. Il est intéressant de noter que l'IPTG est inducteur de la synthèse de la β -galactosidase chez des bactéries aussi différentes que Escherichia coli (53), Lactobacillus plantarum (80) ou Pseudomonas BAL 31 (79). Par contre, chez Lactobacillus acidophilus, l'IPTG n'est pas inducteur.

Pour Rhizobium meliloti chez lequel ce travail a été réalisé, la seule indication dont on pouvait disposer concernant l'éventualité d'un système lactose était l'étude systématique faite par DELATTRE (81). Sur un grand nombre de souches de Rhizobium testées, DELATTRE trouve deux souches Lac⁺ en se basant sur le virage du rouge au jaune par acidification d'un milieu de culture contenant du rouge de phénol. D'autre part, l'aptitude à produire du 3-cétolactose sur un milieu lactosé a permis d'en faire un caractère distinctif entre Agrobacterium radiobacter et Rhizobium (82 à 84). Agrobacterium radiobacter produit du 3-cétolactose et Rhizobium n'en produit pas. Notre travail a débuté en même temps qu'une étude parallèle menée par UCKER et SIGNER (85) au "Massachusetts Institute of Technology". UCKER (86) a isolé des mutants cataboliques de Rhizobium meliloti 2011 Str3, la souche sur laquelle nous avons travaillé, ces mutants serviront certainement à augmenter les connaissances déjà acquises sur le catabolisme des oses (87 à 95). Mais le résultat le plus important obtenu par UCKER et SIGNER est que le succinate serait responsable d'un phénomène analogue à la répression catabolique, ce phénomène semble toutefois indépendant de la présence d'AMPc dans les cellules.

Notre travail a d'abord consisté à isoler différents mutants sur le caractère lactose à partir d'une souche Lac⁺, ce qui nous a permis de mettre en évidence non pas une, mais deux enzymes à activité β -galactosidasique. Nous nous sommes livrés à une étude biochimique succincte de ces deux enzymes puis à une étude physiologique sur toutes les étapes de l'utilisation du lactose : induction des enzymes impliquées, pénétration du lactose dans les cellules et hydrolyse du lactose.

Note : Certains résultats de cette thèse ont fait l'objet d'une publication (96) D'autres ont été soumis au "Journal of General Microbiology" (97).

Matériel et Méthodes

I - SOUCHES BACTERIENNES

A - Isolement

La souche sauvage 2011, vraisemblablement isolée en Ecosse, nous a été aimablement fournie par J. DENARIE (C.N.R.A. Versailles).

La souche 2011 Str3 provient de la même collection. Il s'agit d'un mutant de 2011 résistant à la streptomycine à la concentration de 400 µg/ml

Le protocole suivant (98) a été observé pour l'isolement du mutant 2011 L⁻i. Les cellules de la souche 2011 Str3, cultivées dans le milieu RC glucosé à 1 %, sont centrifugées, lavées et reprises dans du tampon Tris 0,09 M - acide maléique 0,05 M pH 6,65. Après addition du même volume de N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine à 1500 µg/ml dissoute dans le même tampon (concentration finale : 750 µg/ml), on laisse en agitation 30 mn à 30°C ; les cellules sont centrifugées et reprises dans le milieu R, puis étalées sur milieu RC glucosé gélosé. Lorsque les colonies isolées atteignent 1 mm de diamètre, on procède à des répliques sur milieu minimum lactosé, puis sur milieu minimum glucosé.

L'isolement de mutants Lac⁻, difficile chez Rhizobium meliloti, serait facilité si l'on disposait d'un moyen de reconnaissance des colonies Lac⁺ et Lac⁻ sur agar, sans avoir recours à la technique des répliques. Nous avons fait un certain nombre d'essais avec les souches 2011 Str3 et 2011 L⁻i, afin de rechercher un indicateur de pH convenable.

La différenciation de ces souches a été obtenue dans les conditions suivantes :

Milieu RC gélosé à 20 % d'Agar Difco
additionné de lactose à 2 %
Bleu de bromothymol : 40 mg/litre
pH 6,9 ou 7 avant autoclavage
Ce milieu doit être vert.

L'observation doit se faire avec environ 15 à 20 colonies par boîte et au bout de 6 jours.

◦ Dans ces conditions, la souche 2011 Str3 donne de grosses colonies jaune-citron et la souche 2011 L⁻i de petites colonies blanc-jaune.

Malheureusement, ce système de différenciation n'a pas été satisfaisant

avec d'autres souches Lac^+ et Lac^- de la collection du laboratoire.

L'isolement des mutants Lac^+ est décrit dans le chapitre IV des résultats.

B - Conservation

Une culture en milieu riche RC ou TY est additionnée de glycérol à 20 % et placée à -20°C . Les souches sont repiquées une fois par an.

C - Propriétés symbiotiques

Les tests d'infectivité et d'efficacité des souches sont réalisés sur plantules aseptiques de luzerne (Medicago sativa) selon BONNIER et BRAKEL (99). Les souches utilisées sont toutes efficaces.

II - MILIEUX DE CULTURE ET PRODUITS CHIMIQUES

A - Milieux de culture

Milieu riche RC

$\text{K}_2 \text{HPO}_4$	1 g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Extrait de levure (Difco)	1 g
H_2O	q.s.p. 1 l
pH 7 à 7,5	

Stérilisation à l'autoclave, 120°C , 20 minutes.

Milieu riche TY

Bacto tryptone Difco	5 g
Yeast extract Difco	3 g
$\text{Ca Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,3 g
H_2O	q.s.p. 1 l
pH 7 à 7,5	

Stérilisation à l'autoclave, 120°C , 20 minutes.

Milieu minimum RHB₁

K ₂ HPO ₄	0,5 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
NH ₄ NO ₃	0,5 g
H ₂ O	q.s.p. 1 l
pH 7 à 7,5	

Après stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20 minutes
ajouter 0,01 µg de biotine et 0,5 µg de thiamine.

Milieu minimum M 9 A

Na ₂ H PO ₄	5,8 g
K H ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
H ₂ O	q.s.p. 1 l
pH 7 à 7,5	

Après autoclavage à 120°C, 20 mn, ajouter 1 mM Mg SO₄,
10 M CaCl₂ et 1 µg de biotine par ml.

Quand les milieux de culture sont gélosés, on ajoute 15 g d'Agar
Difco par litre.

Pour éviter les contaminants bactériens, on ajoute la plupart du
temps dans les cultures, de la dihydrostreptomycine (S.P.E.C.I.A.) à la
concentration de 400 µg/ml pour toutes les souches, sauf pour la souche
sauvage 2011, qui est streptomycine-sensible.

B - Osés, osides et analogues

Le paranitrophényl-β-D-galactopyranoside (PNPGal) et le paranitrophényl-
β-D-glucopyranoside (PNPGlc) proviennent de chez Koch-Light ; le glucose,
le galactose et le lactose de chez Merck ; le glycérol de chez Prolabo ;
le lactulose (4-(β-D-galactosyl)-D-fructose) de chez Serva ; le fructose ,
le cellobiose, le gentiobiose, l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
(I.P.T.G.), le 1-O-méthyl-β-D-galactoside (MG), le méthyl-β-D-thiogalacto-
side (TMG) et le phényl-β-D-galactoside de chez Sigma.

III - CROISSANCES

Les courbes de croissance sont réalisées de la manière suivante. Les bactéries sontensemencées à raison de 10^5 cellules/ml environ dans des flacons de 500 ml contenant 100 ml de milieu de culture. Ces flacons sont agités à raison de 100 tours/minute dans une pièce à 30°C.

La mesure de la densité optique se fait à 600 nm sur un spectrophotomètre Zeiss type PMQ II.

Les courbes diauxiques ont été réalisées sur le biophotomètre expérimental dans le Service du Professeur MOSCHETTO, I.N.S.E.R.M. Lille.

Les numérations de cellules viables se font sur milieu riche gélosé par la méthode de la double couche après dilution par entraînement dans le milieu R (RHB₁ sans addition de vitamines).

IV - PREPARATIONS, MESURES DES ACTIVITES, ET ETUDES ENZYMATIQUES

A - Préparations des extraits bruts

Plusieurs litres de culture bactérienne sont préparés en milieu RC additionné ou non de lactose dans des fioles à toxines de 2 litres, à raison d'un litre par fiole. Les cellules sont centrifugées et lavées dans du tampon phosphate de potassium 12,5 mM pH 6,6, puis centrifugées à nouveau. Le culot est mélangé à de l'alumine neutre (Prolabo) à raison de 2 g d'alumine pour 1 g de cellules (poids humide) et broyé dans un mortier à 0°C. Les cellules brisées sont diluées dans le même tampon et centrifugées à 30000 g pour éliminer l'alumine et les débris cellulaires. Le surnageant est placé à 4°C, puis les acides nucléiques sont précipités par addition de sulfate de streptomycine 25 mg/ml. Après centrifugation à 30000 g le surnageant est dialysé une nuit à 4°C contre le tampon. Le surnageant dialysé constitue l'extrait brut.

B - Mesures des activités enzymatiques

Les cellules sont centrifugées et reprises dans 2 ml de tampon phosphate de potassium 12,5 mM pH 6,6. Elles sont placées à 30°C, puis perméabilisées pendant 10 mn. On ajoute 0,5 ml de solution de paranitrophényl- β -D-galactopyranoside (PNPGal) à la concentration de 3,3 mM. On incube pendant 2 heures à 30°C, puis la réaction est arrêtée par addition de

1 ml de Na_2CO_3 , 0,25 M et E.D.T.A. 2 %. Après centrifugation, le paranitrophénoI libéré est dosé par lecture de l'absorbance du surnageant à 400 nm. Une unité enzymatique correspond à la libération de 1 nmol de paranitrophénoI par minute dans ces conditions d'expérience.

Pour les extraits enzymatiques (dans le tampon phosphate), ceux-ci sont mis directement en contact avec le PNPGal ou le PNPGLc à la concentration finale désirée.

La mesure de l'hydrolyse du lactose est faite selon DAHLQVIST (100) on dose le glucose libéré avec la glucose oxydase.

C - Purifications partielles et études des enzymes

1 - Purification partielle de l'enzyme A

La souche 2011 Str3 est cultivée en milieu RC additionné de lactose à 1 % afin d'induire la synthèse de l'enzyme A. Un extrait brut de cette souche est soumis à une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. L'extrait brut est porté à un degré de saturation de 35 % avec une solution saturée de sulfate d'ammonium, ceci à 0°C. Le précipité est éliminé par centrifugation et le surnageant est porté à un degré de saturation de 50 %. Le précipité est centrifugé, dissout et dialysé une nuit contre le tampon phosphate de potassium. La préparation enzymatique est passée sur une colonne de chromatographie de tamisage moléculaire Séphadex G-200 (65 x 1,5 cm). Le même tampon est utilisé pour l'élution de la colonne. Les fractions contenant une activité β -galactosidasique sont ensuite rassemblées, concentrées si besoin contre du polyvinylpyrrolidone et utilisées rapidement.

2 - Purification partielle de l'enzyme B

La souche 2011 L⁻i est cultivée en milieu RC sans addition d'ose, oside ou analogue. L'extrait brut de cette souche subit une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et on récupère la fraction qui précipite entre 50 % et 65 % de saturation. Comme pour l'enzyme A, la fraction enzymatique est passée sur une colonne de Sephadex G-200 avant utilisation.

3 - Electrophorèse en gel d'agar

L'électrophorèse est réalisée en tampon phosphate pH 7,5 avec de l'agar noble (Difco). La tension appliquée est de 20 V. L'activité β -galactosidasique est révélée en coulant à la surface de la gélose où

s'est faite l'électrophorèse, une couche de solution gélosée de PNPGal en tampon phosphate, pH 6. On incube à 37°C.

4 - Chromatographie d'échange d'ions

De la diéthyl-amino-éthyl-cellulose (D.E.A.E.-cellulose) est régénérée par des séjours successifs dans HCl 0,5 N, dans NaOH 0,5 N et dans l'eau distillée jusqu'à pH 7. Après stabilisation avec du tampon phosphate de sodium 0,025 M pH 8, la cellulose est placée dans une colonne de dimensions 3 x 14 cm et stabilisée à nouveau avec 100 ml de tampon. Après dépôt de l'extrait enzymatique, 100 ml de tampon sont ajoutés ; les protéines fixées sont ensuite éluées par un gradient de force ionique de 0 à 1 M de NaCl dans le tampon. Les activités β -galactosidasique et β -glucosidasique sont mesurées dans les fractions de 5 ml collectées.

5 - Inactivation thermique irréversible

Les cellules perméabilisées par le toluène d'une part, les extraits enzymatiques d'autre part, sont portés à la température désirée pendant un temps donné, puis instantanément refroidis dans la glace. Les activités β -galactosidasiques et β -glucosidasiques sont ensuite mesurées.

V - MESURE DE LA PENETRATION DU LACTOSE ET DE L'I.P.T.G. DANS LES CELLULES

A - Temps courts

Les cellules sont précultivées dans le milieu RC lactosé à 1 % puis centrifugées, lavées et placées dans le milieu RHB₁ à 30°C, à une absorbance à 600 nm de 0,8 (environ $8 \cdot 10^8$ bactéries/ml). Au temps T_0 , on ajoute du lactose ou de l'I.P.T.G. non radioactif (D-glucose - 1 - ^{14}C - lactose Amersham France ou I.P.T.G. ^{14}C C.E.A.). On prélève 1 ml à différents temps que l'on filtre sur filtre Sartorius porosité 0,22 μ . On rince abondamment à l'eau distillée à 0°C. Les filtres sont séchés sous infra-rouge, placés dans une fiole à scintillation où l'on ajoute 9 ml de liquide scintillant Lipoluma, puis comptés au compteur à scintillation. Inter Technique.

B - En culture

Les cellules sont précultivées dans le milieu RC. Au temps T_0 , on inocule environ $2 \cdot 10^6$ bactéries/ml dans le milieu RHB₁ additionné de lactose 2 mM et de lactose $0,02 \mu\text{Ci/ml}$. A différents temps, on prélève 1 ml que l'on filtre et compte comme précédemment. Après 95 heures de culture, les cellules sont éliminées par centrifugation, on prélève 1 ml de surnageant auquel on ajoute 2 gouttes d'acide sulfurique et 9 ml de liquide scintillant avant de compter.

Résultats

CHAPITRE I :

CROISSANCE DE LA SOUCHE DE TYPE SAUVAGE 2011 Str3

ET DE SON MUTANT 2011 L⁻i

I - CROISSANCE EN PRESENCE DE β -GALACTOSIDES

A - Milieu minimum

La croissance de la souche de type sauvage 2011 Str3 et celle de son mutant 2011 L⁻i dans le milieu minimum RHB₁ sont suivies par mesure de l'absorbance à 600 mn. De nombreux contrôles ont été effectués en numérant les cellules viables en milieu solide. Les courbes de densité optique et de numération sont superposables. Une densité optique de 1 correspond à environ 10⁹ cellules/ml. La croissance a été mesurée avec les sources de carbone suivantes : glucose, galactose, lactose, lactulose, 1-0-méthyl- β -D-galactoside et cellobiose, toutes additionnées à 0,1 %. Les courbes de croissance sont représentées sur la figure 1. On constate que les souches se développent de manière similaire sur glucose, galactose et cellobiose (4-0- β -D-glucoopyranosyl-D-glucose). Par contre, la souche 2011 L⁻i croît à peine avec un β -galactoside comme seule source de carbone, qu'il s'agisse du lactose (4-0- β -D-galactopyranosyl-D-glucose), du lactulose (4-0- β -D-galactopyranosyl-D-fructose) ou du 1-0-méthyl- β -D-galactoside.

Une très faible croissance, comme celle observée ici, peut être due à une difficulté pour le substrat à pénétrer dans les cellules. Dans le cas qui nous intéresse, on pouvait supposer qu'un système de pénétration au lactose par une perméase, actif chez la souche de type sauvage ait été affecté par la mutation, la synthèse de la perméase ne se faisant plus chez le mutant. Dans ce cas, on aboutit à un système de pénétration des substrats par diffusion simple et en augmentant la concentration en substrat dans le milieu, on augmente proportionnellement sa concentration intracellulaire et donc la densité optique de la culture. Nous avons inoculé la souche 2011 L⁻i dans le milieu minimum RHB₁ additionné de concentrations croissantes en lactose. La même expérience a été faite avec le type sauvage 2011 Str3. La figure 2 représente les courbes de croissance obtenues. Pour le type sauvage, on observe un début de croissance d'autant plus rapide

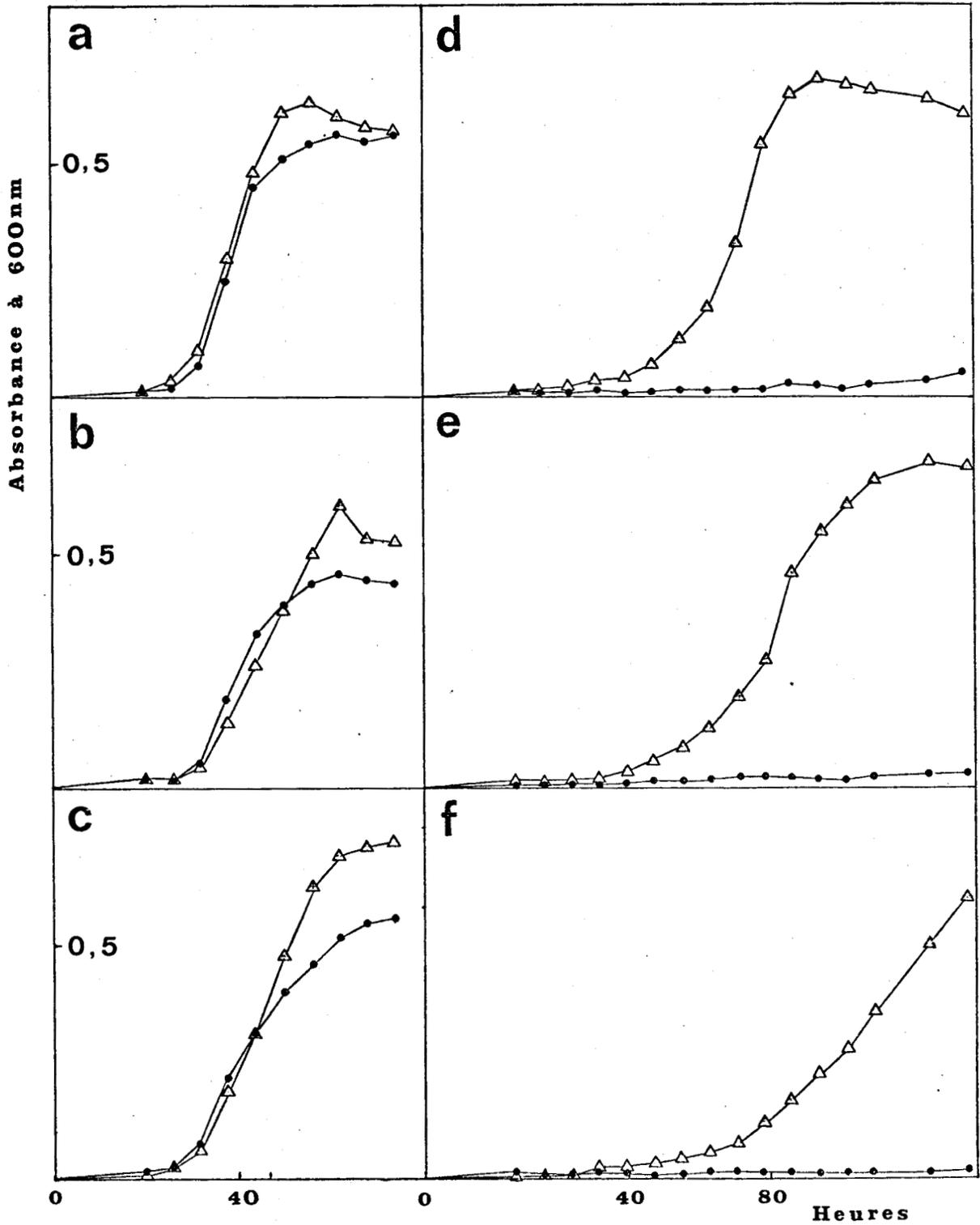


Figure 1. Courbes de croissance de la souche de type sauvage 2011 Str3 (Δ — Δ) et de son mutant 2011 L⁻i (\bullet — \bullet) dans le milieu minimum RHB₁ additionné d'une source de carbone à la concentration de 0,1%
Sources de carbone: a.glucose b.galactose c.cellobiose
d.lactose e.lactulose f.1-O-méthyl- β -D-galactoside

que la concentration en lactose dans le milieu est élevée. Par contre, et dans ces conditions d'expérience, la densité optique maximale obtenue en phase stationnaire ne varie pas selon les concentrations en lactose essayées. La concentration en lactose n'est donc pas un facteur limitant, au moins jusqu'à 0,1 %, de la croissance. En ce qui concerne le mutant, la croissance est faible dans tous les cas et l'addition de lactose à une concentration élevée, 3 %, n'augmente pas sensiblement le taux de croissance.

B - Milieu riche

A de nombreuses reprises au cours de cette étude, nous avons eu besoin d'une quantité importante de cellules cultivées dans un milieu contenant du lactose, ceci afin d'induire la synthèse des enzymes impliqués dans l'utilisation du lactose. Puisque le mutant 2011 L⁻i ne se développe presque pas sur milieu minimum lactosé, nous avons utilisé un milieu riche contenant de l'extrait de levure, le milieu RC dans lequel 1 % de lactose a été ajouté. Dans ces conditions, la croissance du mutant 2011 L⁻i est nettement moins importante que celle du type sauvage (figure 3), mais permet la récupération de cellules en quantité suffisante. Dans le milieu RC seul, sans addition de lactose, la croissance des souches 2011 Str3 et 2011 L⁻i est la même. Cette croissance est sensiblement égale à celle de la courbe basse de la figure 3, c'est-à-dire à celle du mutant cultivé sur RC lactosé. Ceci indique que le lactose n'est pas non plus utilisé par le mutant dans ce milieu riche.

II - CROISSANCE EN PRESENCE D'AUTRES SOURCES DE CARBONE

Le mutant 2011 L⁻i a été sélectionné par son incapacité à se développer correctement sur milieu minimum RHB₁ additionné de lactose comme seule source de carbone. Il était intéressant de savoir si la mutation conduisant de la souche 2011 Str3 à 2011 L⁻i n'avait pas affecté d'autres caractères. Aussi avons nous inoculé ces deux souches dans le milieu minimum RHB₁, additionné d'une source de carbone. Les résultats figurent dans le tableau 1.

Rhizobium meliloti type sauvage 2011 Str3 est capable d'utiliser pour sa croissance toutes les sources de carbone essayées, excepté le glycogène. Cette souche semble donc posséder de grandes capacités métaboliques et un

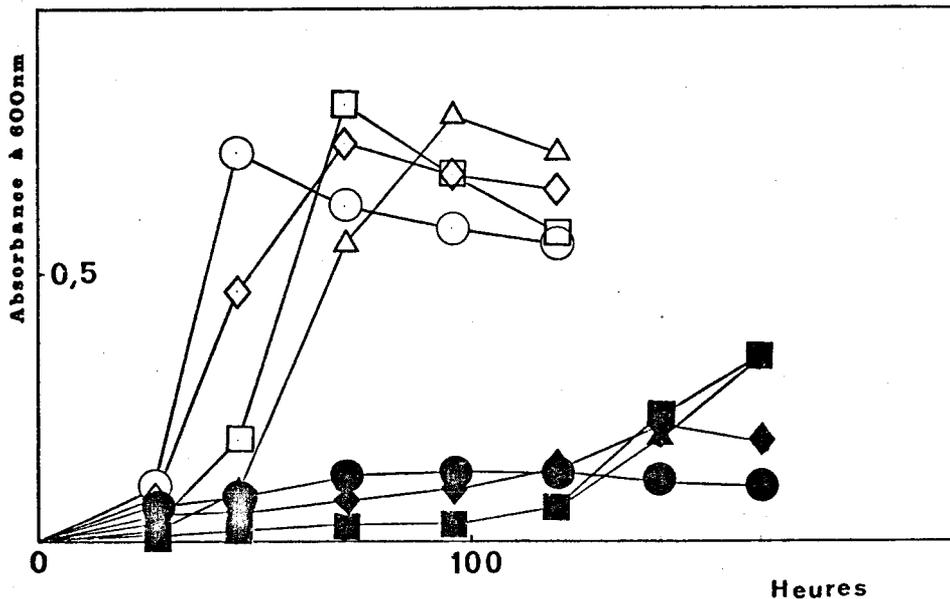


Figure 2. Courbes de croissance de la souche de type sauvage 2011 Str3 (symboles creux) et de son mutant 2011 L⁻i (symboles pleins) dans le milieu minimum RHB₁ additionné de lactose à différentes concentrations.

Concentrations en lactose: $\triangle \blacktriangle$; 0,1%
 $\square \blacksquare$; 0,3%
 $\diamond \blacklozenge$; 1%
 $\circ \bullet$; 3%

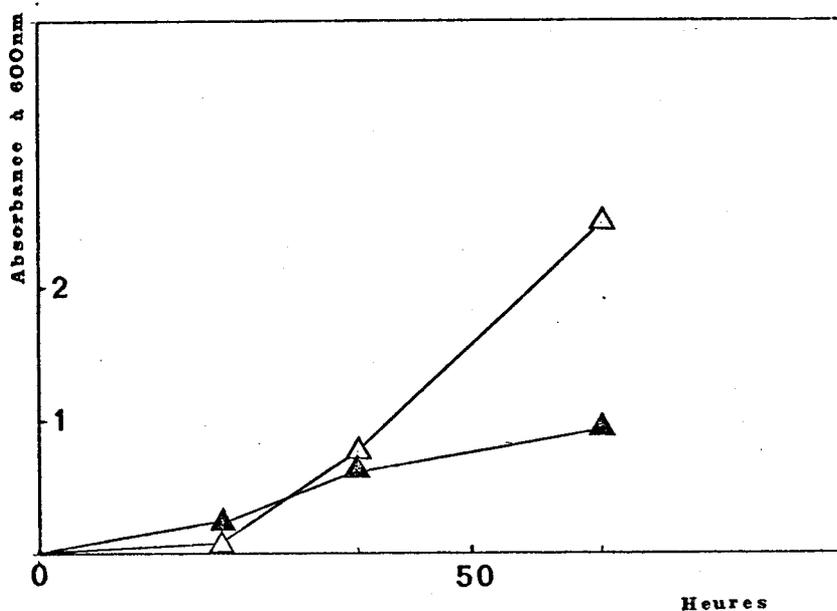


Figure 3. Courbes de croissance de la souche de type sauvage 2011 Str3 ($\triangle-\triangle$) et de son mutant 2011 L⁻i ($\blacktriangle-\blacktriangle$) dans le milieu riche RC additionné de lactose à 1%.



Tableau 1 : Croissance des souches 2011 Str3 et 2011 L⁻i sur milieu minimum RHB₁, additionné d'une source de carbone.

Source de Carbone	Type sauvage 2011 Str3			Mutant 2011 L ⁻ i		
	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
-	0,01	0,01	0	0,01	0,02	0,01
:Glycérol	0,29			0,63		
:Erythritol	0,08	0,28	0,52	0,04	0,14	0,31
:D Arabinose	0,48			0,23		
:L Arabinose	0,51			0,42		
:Ribose	0,44			0,46		
:D Xylose	0,64			0,66		
:Adonitol	0,27			0,22		
:D Glucose	0,82			0,78		
:D Fructose	1,48			1,15		
:Rhamnose	0,51			0,42		
:Dulcitol	0,09	0,18	0,26	0,03	0,14	0,43
:Inositol	0,60			0,38		
:D Cellobiose	0,34			0,61		
:Maltose	0,48			0,50		
:Lactose	0,66			0,06	0,09	0,19
:Saccharose	0,71			0,71		
:Trehalose	0,52			0,65		
:D Melezitose	0,40			0,32		
:D Raffinose	0,11	0,48		0,06	0,27	
:Glycogène	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
:β Gentiobiose	0,40			0,37		
:L Fucose	0,23	0,40		0,23	0,34	

Les inocula sont d'environ 2.10^6 bactéries/ml.

Les résultats sont exprimés en absorbance à 600 nm. Lorsque l'absorbance atteinte après 48 heures d'incubation était faible, l'expérience a été poursuivie jusqu'à 72 ou même 96 heures.



équipement important en enzymes de dégradation des oses et osides. Le mutant 2011 L⁻i donne des résultats tout à fait semblables pour l'ensemble des sources de carbone essayées, à l'exception bien sûr du lactose. A ce tableau, il faut ajouter le sorbitol qui, essayé séparément, s'est révélé être une source de carbone utilisable par ces deux souches pour leur croissance.

Pour s'assurer de ce que la différence de croissance sur β -galactosides entre les souches était entièrement localisée au niveau de la première étape du catabolisme, c'est-à-dire pour le lactose : lactose \rightarrow galactose + glucose, nous avons calculé le temps de génération des deux souches sur milieu minimum additionné de glucose. Les courbes de croissance nécessaires au calcul de ces temps de génération constituent la figure 4.

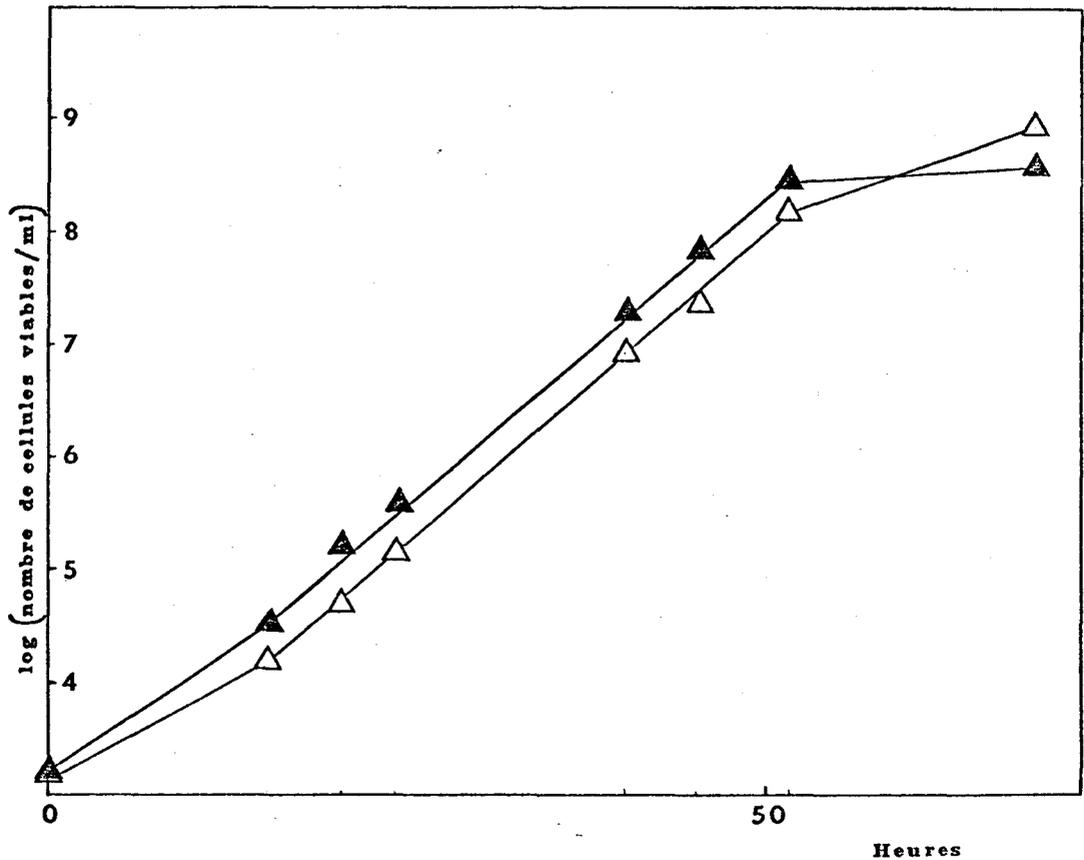


Figure 4. Courbes de croissance de la souche de type sauvage 2011 Str3 ($\triangle-\triangle$) et de son mutant 2011 L⁻i ($\blacktriangle-\blacktriangle$) dans le milieu minimum RHB₁ additionné de glucose à 0,1%. Ces courbes permettent le calcul des temps de génération.

Dans les conditions de l'expérience, les temps de génération calculés dans la phase exponentielle de croissance, sont les suivants :

2011 Str3 : 2 h 45 2011 L⁻i : 2 h 45.

Les résultats identiques obtenus quant à l'utilisation d'un grand nombre d'oses et osides comme seule source de carbone et les temps de génération semblables pour les deux souches montrent que la mutation a affecté la première étape du catabolisme du lactose, et elle seule.

Le mutant 2011 L⁻i apparaît donc comme étant affecté sur la première étape du catabolisme du lactose. Aucune fonction essentielle à la dégradation des autres oses et osides ne semble avoir été détruite. Une des expériences décrites ci-dessus donne à penser que ce n'est pas un système perméasique qui a été touché lors de la mutation, mais cela va être étudié plus en détail dans le chapitre IV. Avant cela, nous nous intéresserons d'abord à la β -galactosidase.

CHAPITRE II :

ACTIVITES β -GALACTOSIDASQUES DES CELLULES ENTIERES DE LA SOUCHE DE TYPE SAUVAGE 2011 Str3 ET DE SON MUTANT 2011 L⁻ⁱ

I - RECHERCHE DE L'ACTIVITE β -GALACTOSIDASIQUE DANS DIFFERENTES CONDITIONS

La β -galactosidase d'Escherichia coli est capable d'hydrolyser un grand nombre de substrats : lactose, phényl- β -D-galactoside, orthonitrophényl- β -D-galactoside, métanitrophényl- β -D-galactoside, paranitrophényl- β -D-galactoside, orthoaminophényl- β -D-galactoside, paraaminophényl- β -D-galactoside 2-4-dinitrophényl- β -D-galactoside, 3-5-dinitrophényl- β -D-galactoside, cinnamyl- β -D-galactoside, méthyl- β -D-galactoside, naphtyl- β -D-galactoside, 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactoside, 6-bromo-2-naphtyl- β -D-galactoside, orthonitrophényl- α -L-arabinoside, orthonitrophényl- β -D-fucoside et orthonitrophényl- β -D-glucoside (59).

Parmi tous ces substrats, le plus couramment utilisé est l'orthonitrophényl- β -D-galactoside (ONPG). L'hydrolyse de l'ONPG libère de l'orthonitrophénol de couleur jaune et du galactose. La mesure de l'activité β -galactosidasique se fait par lecture de l'absorbance à 415 nm après la réaction. Un composé voisin de l'ONPG, le paranitrophényl- β -D-galactoside (PNPGal) peut être également très utile dans certains cas. Son hydrolyse libère du paranitrophénol dont le maximum d'absorption se situe à 400 nm et qui a l'avantage sur l'orthonitrophénol d'avoir une absorbance près de quatre fois plus élevée pour une même concentration. Ceci est particulièrement intéressant quand les activités β -galactosidasiques mesurées sont faibles.

Chez Rhizobium meliloti, nous avons utilisé trois substrats : l'ONPG, le PNPGal et le lactose.

L'activité β -galactosidasique a été mesurée dans un premier temps sur cellules entières dans différentes conditions. Les résultats figurent dans le tableau 2. On constate que :

1) L'activité β -galactosidasique des cellules de type sauvage est supérieure à celle des cellules du mutant.

2) L'activité des cellules du mutant n'est pas nulle, ce qui révèle qu'il existe encore dans ces cellules une enzyme à activité β -galactosidasique.

Tableau 2 : Activités β -galactosidasiques des cellules du type sauvage et du mutant perméabilisées dans différentes conditions.

N°	Substrat et produit qui perméabilise les cellules	Type sauvage 2011 Str3	Mutant 2011 L ⁻ i
1	0,5 ml PNPGal à 1 mg/ml	0,58	0,27
2	0,5 ml PNPGal à 1 mg/ml 2 gouttes Toluène	3,61	1,20
3	0,5 ml PNPGal à 1 mg/ml 4 gouttes de Toluène	3,57	1,24
4	0,5 ml PNPGal à 1 mg/ml 4 gouttes chloroforme	6,79	1,22
5	0,5 ml PNPGal à 1 mg/ml 2 gouttes Toluène 4 gouttes chloroforme	7,14	1,58
6	0,5 ml PNPGal à 1 mg/ml 2 gouttes S.D.S. 0,1 % 4 gouttes chloroforme	6,97	0,91
7	0,4 ml ONPGal à 4 mg/ml 2 gouttes S.D.S. 0,1 % 4 gouttes chloroforme	8,64	2,35

Les résultats sont exprimés en unités β -galactosidasiques. Une unité β -galactosidasique se définit comme 1 nanomole de paranitrophénol libéré par minute par mg de cellules (poids sec).



Même quand ces cellules ne sont pas perméabilisées, une activité résiduelle persiste, ce qui montre que le PNPGal peut pénétrer dans les cellules du mutant.

3) Pour les deux souches, l'activité est nettement plus forte quand les cellules sont perméabilisées par un solvant organique.

4) Les activités les plus fortes ont été obtenues par perméabilisation des cellules avec le chloroforme.

5) L'expérience n° 7 est la seule faite avec l'ONPGal comme substrat, cette expérience donne les résultats les plus élevés en nombre d'unités β -galactosidasiques. Mais, si l'on tient compte du fait que l'ONPG a été ajouté à 4 mg/ml contre 1 mg/ml pour le PNPGal, les résultats ne sont pas comparables.

On peut déduire de cette expérience que la mutation conduisant à la souche 2011 L⁻i a perturbé la synthèse de la β -galactosidase. Cette mutation a pu affecter un gène de structure ou un gène de régulation. Toutefois, chez le mutant, l'activité β -galactosidasique, bien que diminuée, subsiste à un taux non négligeable. Dans ces conditions, l'hypothèse la plus simple est que le mutant synthétise une β -galactosidase modifiée et moins active vis-à-vis des substrats synthétiques ONPG et PNPGal. Si tel est le cas, la mutation a affecté un gène de structure de la β -galactosidase et la régulation de la synthèse de cette enzyme doit être la même chez la souche de type sauvage et chez le mutant.

Pour savoir si tel était le cas, nous avons cultivé les deux souches dans différents milieux et en présence de différents oses, osides et analogues, puis les cellules ayant été lavées et perméabilisées, nous avons mesuré leur activité β -galactosidasique spécifique.

II - INDUCTIBILITE DES ACTIVITES β -GALACTOSIDASQUES

La recherche de l'inductibilité de l'activité β -galactosidasique se fait de la manière suivante.

Les cellules sont cultivées sur le milieu qu'on désire étudier. Puis elles sont centrifugées, le surnageant est rejeté et on reprend le culot avec un tampon dans lequel on veut effectuer la réaction enzymatique, puis on perméabilise les cellules à raison de deux gouttes de toluène pour 2 ml de cellules dont l'absorbance à 600 nm est 1. Enfin, le substrat PNPGal est ajouté.

Tableau 3 : Induction des activités β -galactosidasiques par des oses, osides et analogues après culture des cellules dans le milieu riche RC contenant de l'extrait de levure.

Inducteurs 10^{-3} M	Type sauvage 2011 Str3		Mutant 2011 L ⁻ i	
-	3,32		1,36	
Galactose	6,79	(3,47)	1,56	(0,20)
Lactose	11,00	(7,68)	1,67	(0,31)
Lactulose	11,58	(8,26)	1,47	(0,11)
IPTG	11,35	(8,03)	1,40	(0,04)
MG	12,30	(8,98)	1,48	(0,12)
TMG	9,36	(6,04)	1,29	(- 0,07)
Glucose	2,99	(- 0,33)	1,44	(0,08)
Fructose	3,11	(- 0,21)	1,46	(0,10)
Cellobiose	3,57	(0,25)	1,97	(0,61)

Les résultats sont exprimés en unités β -galactosidasiques.

Les chiffres entre parenthèses indiquent la différence entre le taux d'activité en présence d'inducteur et le taux de base sans inducteur.



Deux milieux de culture ont été utilisés pour la recherche de l'inductibilité, le milieu riche RC contenant de l'extrait de levure et le milieu minimum RHB₁ additionné d'une source de carbone : fructose, glycérol, lactose, glucose, cellobiose ou succinate.

Les résultats obtenus après croissance des cellules dans le milieu riche RC figurent dans le tableau 3 et ceux du milieu minimum RHB₁ dans le tableau 4.

Les oses, osides et analogues ajoutés à ce milieu de culture pendant toute la croissance le sont à la concentration de 10^{-3} M, ce qui est une concentration généralement considérée comme très excédentaire pour l'inactivation du répresseur impliqué dans la synthèse des enzymes étudiées.

A la lecture du tableau 3, on constate que :

1) Chez la souche 2011 Str3, six composés : galactose, lactose, lactulose, isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), 1-O-méthyl- β -D-galactoside (MG) et méthyl- β -D-thiogalactoside (TMG) augmentent l'activité β -galactosidase spécifique. Trois composés, le glucose, le fructose et le cellobiose n'augmentent, ni ne diminuent cette activité de façon significative. Les six composés qui augmentent l'activité et qui sont donc des inducteurs, possèdent tous un radical galactose dans leur molécule. Ce radical galactose semble suffire pour l'induction de la β -galactosidase. Cette induction serait donc peu spécifique.

2) Lorsqu'il y a augmentation de l'activité β -galactosidasique, cette augmentation est toujours faible. Le taux de base, obtenu avec le milieu RC seul, est à peine multiplié par 4 dans le meilleur des cas (induction par le MG). En première approximation, il semble que le taux d'induction de l'activité β -galactosidasique soit faible, incomparablement plus faible que pour la β -galactosidase lac Z d'Escherichia coli, dont le nombre de molécules par cellule est multiplié par environ 10 000 lorsqu'un inducteur est ajouté dans le milieu de culture.

3) En ce qui concerne le mutant 2011 L⁻ⁱ, les résultats varient peu quels que soient les oses, osides, ou analogues additionnés au milieu RC. Toutefois, c'est avec le cellobiose que le taux d'activité est le plus élevé, sans que l'on puisse véritablement parler d'induction.

Nous avons donc d'une part chez le type sauvage, une β -galactosidase inductible et d'autre part, chez le mutant une activité β -galactosidasique plus faible et devenue non inductible.

A partir de ces données, nous pouvons examiner plusieurs hypothèses concernant la mutation survenue.

1) Un gène de régulation d'un éventuel opéron lactose de Rhizobium meliloti a été touché. La synthèse de la β -galactosidase, inductible chez la souche de type sauvage, deviendrait constitutive chez le mutant. Deux arguments s'opposent à cette hypothèse. L'activité β -galactosidasique chez le mutant est très faible par rapport à celle du type sauvage induit (environ 10 fois moins). Or, on sait que les mutants constitutifs synthétisent la β -galactosidase à un taux maximal. Mais surtout, le mutant 2011 L⁻i se développe très mal sur milieu minimum lactosé, ce qui n'est pas du tout le cas d'un mutant constitutif.

2) La mutation a complètement détruit un gène de régulation et a atteint partiellement le gène de structure de la β -galactosidase. Cette hypothèse, bien qu'ayant peu de chance de se produire, est néanmoins vraisemblable. La destruction d'un gène de régulation aurait rendu la synthèse de la β -galactosidase constitutive chez le mutant, mais les dommages subis par le gène de structure font que la β -galactosidase fonctionne à un taux très diminué (environ 10 fois moins).

3) Troisième hypothèse : le type sauvage 2011 Str3 possède deux enzymes à activité β -galactosidasique, l'une est inductible par les β -galactosides, par les thiogalactosides et dans une moindre mesure par le galactose, l'autre enzyme n'est pas inductible par ces composés.

L'analyse du tableau 4 nous permet de mieux étudier l'inductibilité de l'activité β -galactosidasique. Dans ce tableau figurent les résultats obtenus après croissance des cellules dans le milieu minimum RHB₁. Dans ce milieu, les éventuelles interférences dues à l'extrait de levure sur le taux de synthèse des enzymes sont éliminées.

Les observations suivantes peuvent être énoncées :

1) L'activité β -galactosidasique des bactéries cultivées dans le milieu minimum RHB₁ contenant une source de carbone, autre qu'un β -galactoside est plus faible que celle des mêmes cellules cultivées dans le milieu RC additionné de la même source de carbone.

2) Chez la souche 2011 L⁻i, les activités β -galactosidasiques diffèrent peu quelles que soient les sources de carbone ajoutées au milieu.

Tableau 4 : Induction des activités β -galactosidasiques par des oses, osides et analogues après culture des cellules dans le milieu minimum RHB₁.

Principale source de carbone (0,1 %)	Inducteurs 10^{-3} M	Type sauvage 2011 Str3	Mutant 2011 L ⁻ i
Fructose	-	0,60	0,52
	Lactose	1,13 (0,53)	0,64 (0,12)
	IPTG	0,63 (0,03)	0,57 (0,05)
Glycérol	-	0,93	0,76
	Lactose	2,29 (1,36)	1,04 (0,28)
	TMG	1,89 (0,96)	0,75 (- 0,01)
	IPTG	1,63 (0,70)	0,71 (- 0,05)
Glucose	-	0,70	N.D.
Lactose	-	4,23	-
Cellobiose	-	1,24	0,65
Succinate	-	0,83	0,90

Les résultats sont exprimés en unités β -galactosidasiques.

Les chiffres entre parenthèses indiquent la différence entre le taux d'activité en présence d'inducteur et le taux de base sans inducteur.



3) Chez la souche de type sauvage, la présence du lactose comme seule source de carbone donne un taux d'activité relativement élevé, respectivement 6 à 7 fois plus élevé que le niveau obtenu après addition de glucose et de fructose. Quand le lactose est ajouté en tant qu'inducteur dans le milieu minimum dont la source principale de carbone est le fructose ou le glycérol, on observe une augmentation de l'activité β -galactosidasique spécifique. Cependant, cette augmentation est faible lorsque c'est l'IPTG qui est additionné au milieu minimum glycérolé et nulle au milieu minimum fructosé. Dans ce dernier, l'IPTG n'est plus inducteur du tout.

4) Dans le milieu minimum additionné de fructose ou de succinate, l'activité β -galactosidasique est semblable chez les deux souches.

Cette dernière observation est certainement très importante : elle contredit l'hypothèse selon laquelle il n'y aurait qu'une β -galactosidase dont l'activité vis-à-vis du PNPGal serait diminuée par rapport au type sauvage.

Parmi les hypothèses formulées, celle qui apparaît comme la plus probable est donc celle qui fait intervenir deux enzymes à activité β -galactosidasique chez le Rhizobium meliloti 2011 Str3. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en travaillant non plus sur des cellules entières, mais sur des extraits enzymatiques possédant une activité β -galactosidasique.

CHAPITRE III :

MISE EN EVIDENCE ET FONCTION PHYSIOLOGIQUE DES DEUX

ENZYMES A ACTIVITE β -GALACTOSIDASIQUE CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI

I - METHODES INDIRECTES DE MISE EN EVIDENCE DE DEUX ENZYMES A ACTIVITE
 β -GALACTOSIDASIQUE A ET B

A - Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Les cellules sont cultivées dans le milieu RC additionné de lactose à 1 %. On prépare un extrait brut de chaque souche. Ces extraits bruts sont ensuite soumis à une précipitation fractionnée des protéines au sulfate d'ammonium. Une solution saturée de sulfate d'ammonium à 0°C est ajoutée à chaque extrait brut maintenu à la même température. Après des études préliminaires, nous avons séparé l'échelle de saturation en quatre zones : 0 à 35 % de saturation en sulfate d'ammonium, 35 à 50 %, 50 à 65 % et 65 à 100 %.

Chaque précipité est dissout dans le tampon phosphate et l'activité β -galactosidasique de la fraction est mesurée avec le PNPGal comme substrat.

Les résultats figurent dans le tableau 5.

Il apparaît que chez la souche de type sauvage 2011 Str3, près des trois quarts de l'activité β -galactosidasique se retrouve dans la fraction précipitant entre 35 et 50 % de saturation ; par contre, chez le mutant 2011 L⁻i, c'est dans la fraction 50-65 % que l'on récupère la majeure partie de l'activité. Il existe donc deux enzymes à activité β -galactosidasique, ces deux enzymes peuvent pré-exister ou le deuxième peut résulter d'une modification du premier.

B - Inactivation thermique irréversible

Les extraits bruts des différentes souches sont portés à une certaine température pendant un certain temps, puis instantanément refroidis dans la glace. L'activité β -galactosidasique est ensuite mesurée. Si pour une température donnée, l'activité β -galactosidasique ne se conserve pas de la même manière chez les deux souches, ceci est un argument en faveur de l'existence de deux enzymes. La figure 5 représente l'activité β -galactosidasique résiduelle après un certain temps de chauffage à 48°C. On constate que l'enzyme du mutant conserve presque toute son activité après le traitement à 48°C. Au contraire, l'enzyme extraite de la souche 2011 Str3 induite en perd près de 90 %.

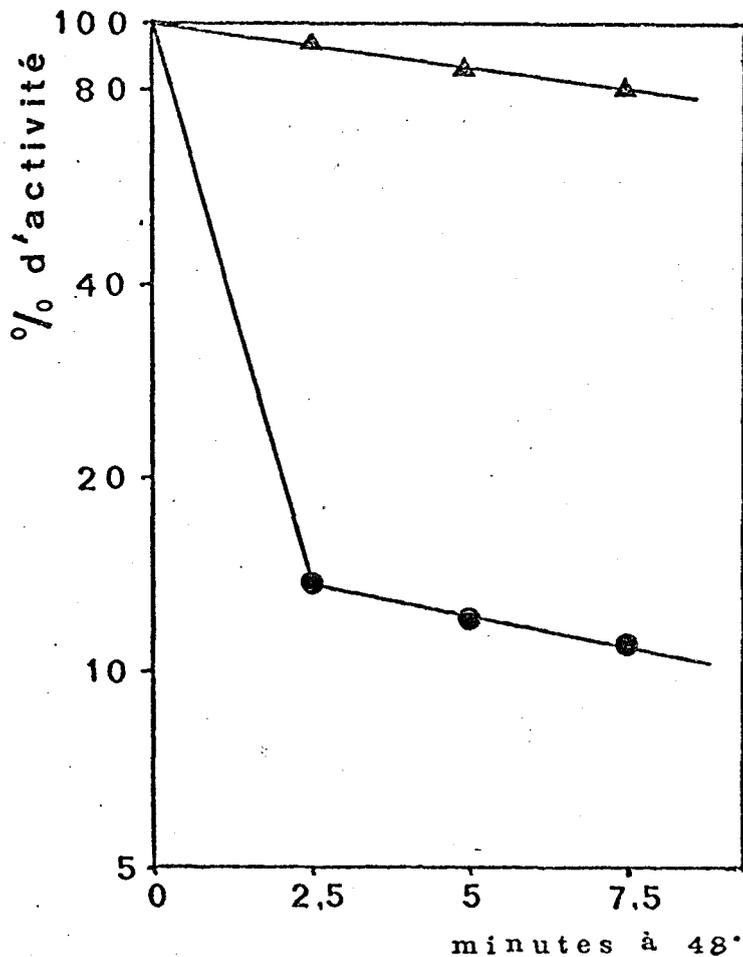


Figure 5. Activités β -galactosidasiques résiduelles au cours de l'inactivation thermique à 48°C des extraits enzymatiques provenant des souches 2011 Str3 (●) et 2011 L̄i (▲) cultivées sur milieu RC lactosé.

C - Double traitement à 48°C

Les résultats précédemment obtenus sont en faveur de l'existence chez le type sauvage 2011 Str3 de deux enzymes, l'une inductible et devenue inactive ou inexistante chez le mutant 2011 L⁻i (enzyme A), l'autre peu inductible et persistant chez le mutant (enzyme B). Pour chercher la présence de l'enzyme B chez la souche 2011 Str3, nous avons étudié l'activité β -galactosidasique de cette souche non induite. Ce procédé devait permettre de minimiser l'enzyme A, dont la synthèse n'est pas induite dans ces conditions.

Sur la figure 5, on constate que l'inactivation thermique de l'enzyme de la souche 2011 Str3 induite, laisse persister une activité résiduelle (après 7 mn 30 s à 48°C). Pour déterminer si cette activité résiduelle était due à la molécule B, thermorésistante, ou simplement à la forme de la courbe de dénaturation de la molécule A, nous avons extrait l'enzyme de la souche 2011 Str3 non induite, que nous avons chauffée à 48°C pendant 7 mn 30 s, dans ces conditions, la majeure partie de l'activité de l'enzyme A est supprimée. On réalise des courbes d'inactivation thermique irréversible sur l'extrait intact et sur l'extrait déjà chauffé (figure 6).

On voit que la fraction préalablement chauffée est devenue thermo-résistante à 48°C et donc, qu'elle possède une enzyme à activité β -galactosidasique différente de l'enzyme A.

Tableau 5 : Répartition de l'activité B-galactosidasique au cours de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium.

Concentration en sulfate d'ammonium (en % de saturation)	Pourcentage de l'activité β -galactosidasique dans la fraction	
	Souche 2011 Str3	Mutant 2011 L ⁻ i
0 - 35	0	4
35 - 50	73	22
50 - 65	27	69
65 - 100	0	5
0 - 100	100	100

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité β -galactosidasique par rapport à l'activité totale.

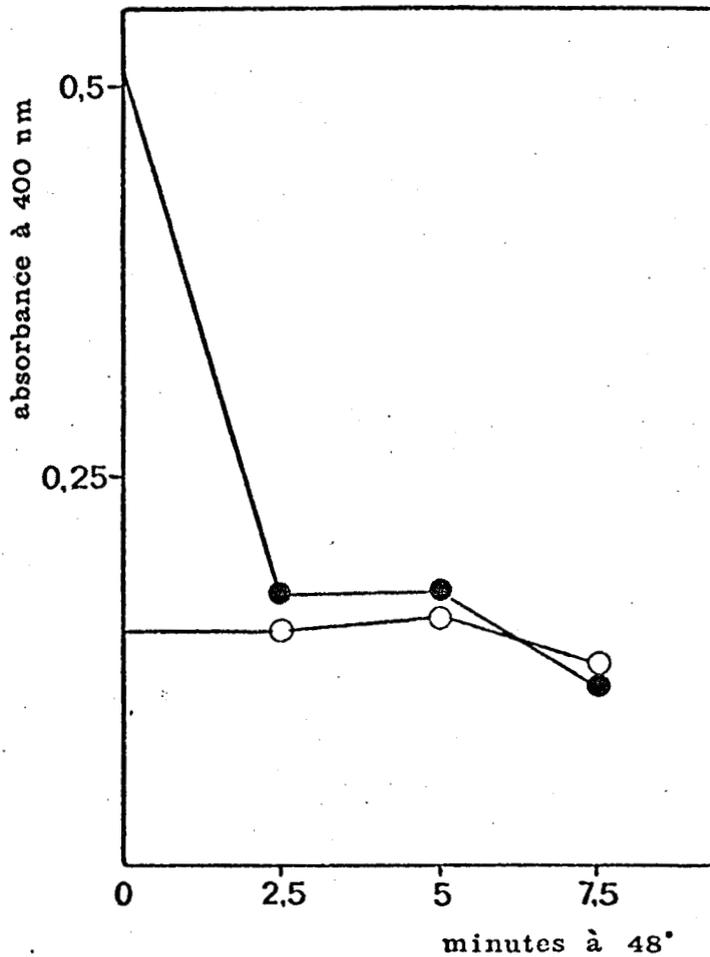


Figure 6. Activités β -galactosidasiques résiduelles au cours de l'inactivation thermique à 48°C des extraits enzymatiques préalablement chauffé 7 min 30 s à 48°C (○) et non chauffé (●) provenant de la souche 2011 Str3 non induite (cultivée sur milieu RC).



D - Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium après traitement à 48°C

L'expérience consiste à opérer une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium comme décrit précédemment, soit sur un extrait intact, soit sur

un extrait préalablement chauffé, toujours chez la souche 2011 Str3 non induite. Le tableau 6 renferme les résultats.

Tableau 6 : Répartition de l'activité β -galactosidasique au cours de la précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium pour l'extrait enzymatique de la souche 2011 Str3 (non induite) avant et après inactivation thermique.

Concentration en :		Pourcentage de l'activité	
Sulfate d'ammo-		β -galactosidasique dans la fraction	
nium (en % de		-----	
saturation)		Extrait non chauffé	Extrait chauffé
		7 mn 30 s à 48°C	
-----		-----	
35-50	:	43,5	20
50-65	:	56,5	80
	:		

La souche est cultivée sur milieu RC. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité β -galactosidasique par rapport à l'activité totale.

On constate que le chauffage de l'extrait enzymatique a pour effet d'augmenter sensiblement le pourcentage d'activité précipitant entre 50 et 65 % de saturation en sulfate d'ammonium. Cet extrait chauffé a alors le même comportement que celui de l'enzyme de type 2011 L⁻i ou enzyme B.

II - SEPARATION DES DEUX ENZYMES A ACTIVITE β -GALACTOSIDASIQUE A ET B

Deux méthodes ont été employées pour obtenir la séparation des deux enzymes à activité β -galactosidasique A et B : l'électrophorèse en gel d'agar et la chromatographie d'échange d'ions.

A - Electrophorèse en gel d'agar

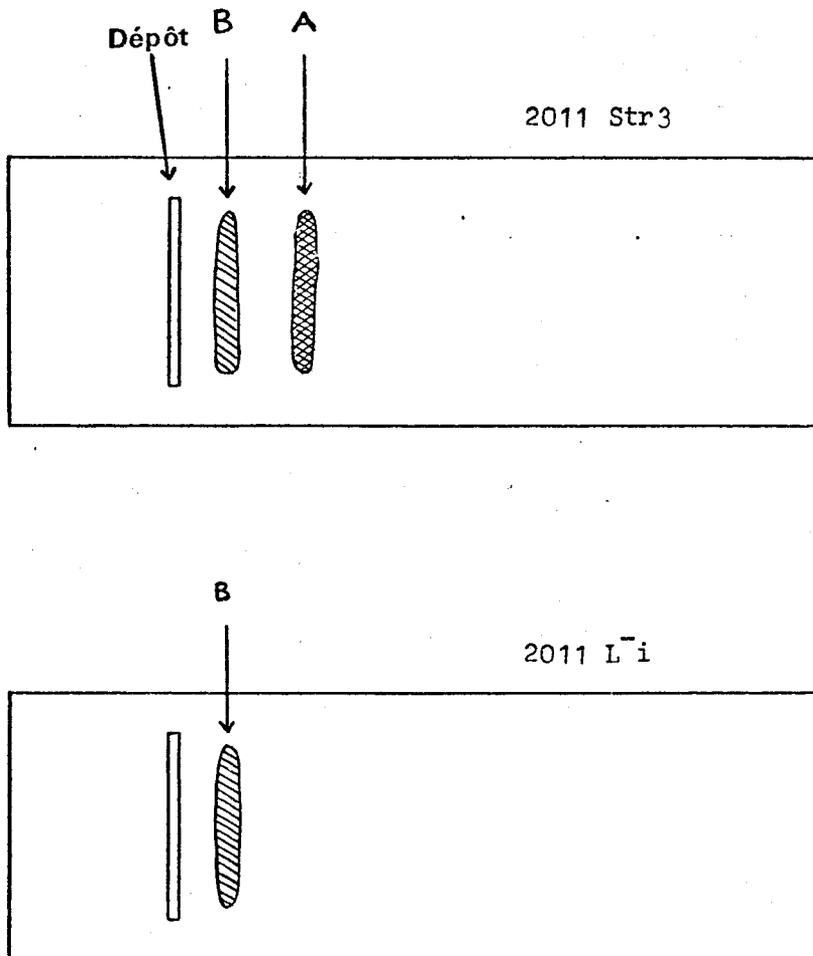


Figure 7
Electrophorèse en gel
d'agar des extraits
enzymatiques bruts de la
souche de type sauvage
2011 Str3 et de son
mutant 2011 L⁻i. Les
zones hachurées représen-
tent les zones d'activité
 β -galactosidasique.
A: Enzyme A
B: Enzyme B

Après migration des protéines, les enzymes à activité β -galactosidasique sont révélés par addition de PNPGal sur la gélose et incubation à 37°C. La figure 7 constitue un schéma des résultats obtenus. Après 4 heures de migration électrophorétique, deux bandes sont observées pour l'extrait brut du type sauvage, l'une à 5 mm du dépôt, l'autre à 12 mm. Chez le mutant 2011 L⁻i, on retrouve une seule bande située à 5 mm du dépôt.

B - Chromatographie d'échange d'ions

La présence des enzymes A et B chez le type sauvage a également été détectée par cette méthode. Un extrait brut de la souche 2011 Str3 cultivée dans le milieu RC sans addition, a d'abord subi une chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de Sephadex G-200. Un seul pic d'activité β -galactosidasique a été obtenu, ceci montre que les poids moléculaires des enzymes sont voisins (environ 150 000, JOTTARD, ref. 101). Les fractions présentant une activité β -galactosidasique ont été collectées et concentrées à l'aide du polyvinylpyrrolidone, puis passées sur une colonne de DEAE-cellulose. La figure 8 montre le profil obtenu après cette seconde chromatographie : deux pics ont été détectés. L'un est dû à l'enzyme A dont la synthèse est inductible, l'autre à l'enzyme B.

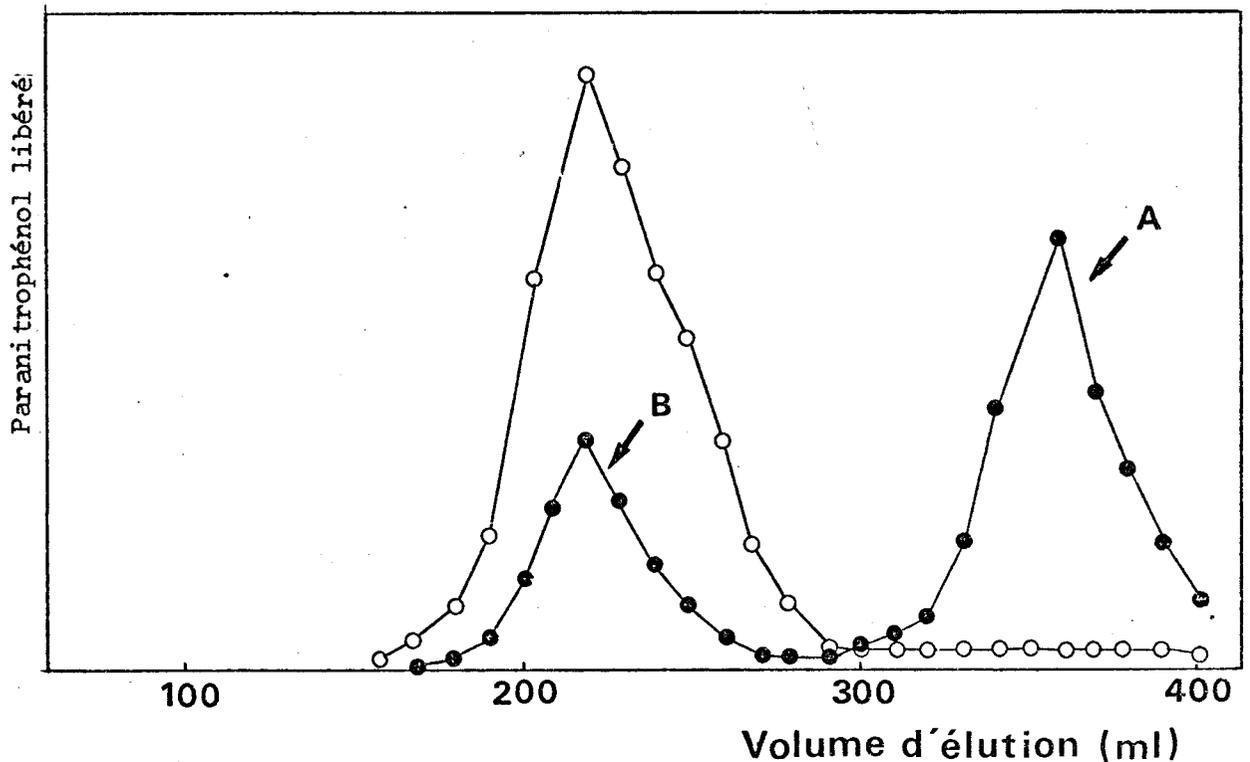


Figure 8. Séparation des deux enzymes à activité β -galactosidasique A et B chez la souche de type sauvage 2011 Str3 par chromatographie d'échange d'ions. La souche 2011 Str3 a été cultivée dans le milieu RC sans addition d'ose, oside ou analogue pour ne pas induire la synthèse des enzymes. Une première chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G-200 a été réalisée sur un extrait brut; les fractions ayant une activité β -galactosidasique ont été collectées et rassemblées puis passées en chromatographie d'échange d'ions.
●—● : activité β -galactosidasique
○—○ : activité β -glucosidasique

Nous avons également mesuré les activités β -glucosidasiques après cette seconde chromatographie.

Remarquons dès à présent qu'on obtient un pic d'activité β -glucosidasique et que ce pic se situe au même niveau que le pic d'activité β -galactosidasique de l'enzyme B.

L'existence de deux enzymes à activité β -galactosidasique chez Rhizobium meliloti pouvait paraître assez surprenante. Aussi, nous sommes nous posés la question : S'agit-il vraiment de deux β -galactosidasases ou d'enzymes capables de catalyser d'autres réactions chimiques que l'hydrolyse des β -galactosides ? C'est à cette question que nous allons maintenant nous efforcer de répondre.

III - PROPRIETES ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ENZYMES A ET B

A - Constantes de Michaelis

Les K_m ont été calculés pour deux substrats, un substrat synthétique, le PNPGal et un substrat naturel, le lactose. Ces expériences ont été réalisées aux pH optimaux respectifs de chacun des enzymes : pH 6,5 pour l'enzyme A et pH 6,4 pour l'enzyme B (les courbes de pH sont données sur la figure 9).

Les résultats concernant les K_m figurent dans le tableau 7.

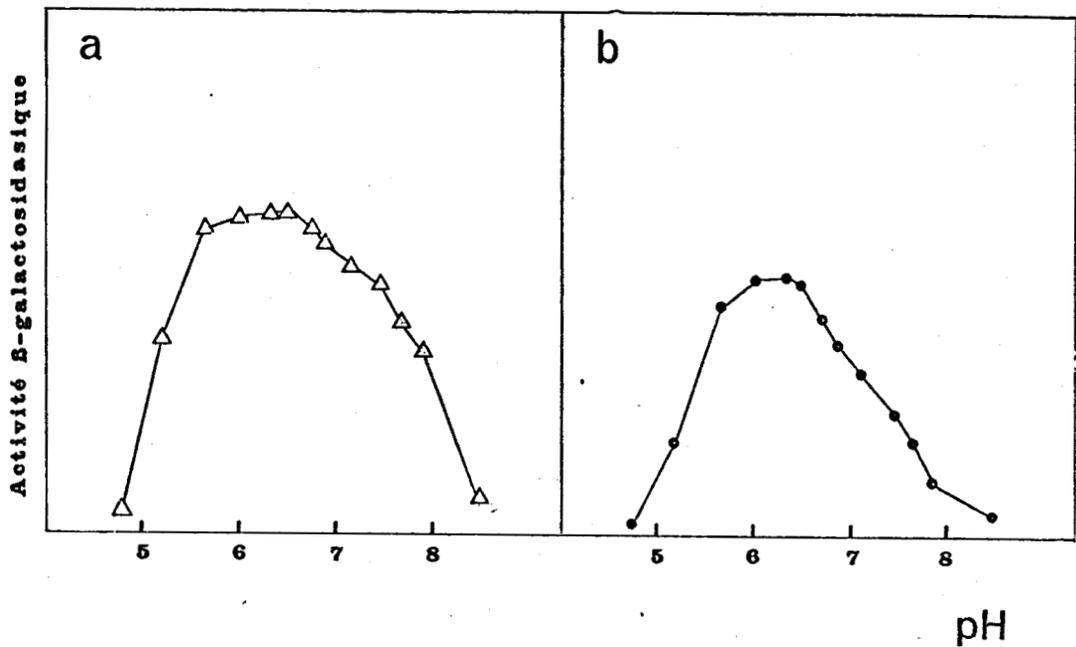


Figure 9. Courbes d'activité β -galactosidasique en fonction du pH des enzymes A (fig. 9a) et B (fig. 9b). Les taux d'activité des deux enzymes sont non comparables.

Tableau 7 : Constantes de Michaelis des enzymes A et B pour le PNPGal et pour le lactose.

Substrat	Enzyme A	Enzyme B
PNP Gal	0,5 mM	6,4 mM
Lactose	4,1 mM	30 mM

On peut d'abord constater que pour les deux enzymes le K_m pour le PNPGal est moins élevé que le K_m pour le lactose. Ce phénomène est assez général : l'affinité pour un substrat synthétique est souvent plus grande que pour le substrat naturel.

On remarque aussi que l'enzyme B a moins d'affinité pour ces substrats que l'enzyme A. Le K_m de l'enzyme B pour le lactose (30 mM) est intéressant car la souche 2011 L⁻i possède B et non A, et ne se développe presque pas sur milieu minimum lactosé. Ce K_m de 30 mM montre une faible affinité, mais non un manque d'affinité pour le lactose. Si le nombre de molécules d'enzyme B par cellule est suffisant, une telle affinité devrait permettre à la souche 2011 L⁻i de se développer sur milieu minimum lactosé. Nous reviendrons sur ce problème dans le chapitre IV.

Concernant l'enzyme A, son K_m pour le lactose (4,1 mM) est proche de celui de la β -galactosidase d'Escherichia coli pour ce substrat : 2 mM.

B - Inhibiteurs

Chaque enzyme partiellement purifié est mis en présence du substrat PNPGal et d'un ose, oside ou analogue essayé en tant qu'inhibiteur de l'activité β -galactosidasique. Le tableau 8 donne les principaux résultats obtenus.

Tableau 8 : Inhibition des activités β -galactosidasiques par des oses, osides, et analogues.

Inhibiteur	Pourcentage d'inhibition	
	Enzyme A	Enzyme B
Lactose	81	20
1-O-méthyl- β -galactoside	75	21
Phényl- β -D-galactoside	71	41
Cellobiose	16	87
Gentiobiose	15	66
Galactose	31	31
Glucose	4	39

Le PNPGal est à la concentration de 1 mM. Les inhibiteurs sont à la concentration de 50 mM.

L'enzyme A est très inhibée par les β -galactosides et peu inhibée par les β -glucosides, comme on pouvait s'y attendre pour une β -galactosidase. Au contraire, l'activité de l'enzyme B est très diminuée par les β -glucosides et peu par les β -galactosides.

L'expérience décrite ensuite repose sur une observation précédente. Nous avons montré au paragraphe I-B que l'enzyme B n'était pratiquement pas inactivée par un chauffage à 48°C pendant 7 mn 30 s, tandis que l'enzyme A perdait la majeure partie de son activité. L'expérience consiste à mettre en présence un extrait de la souche de type sauvage 2011 Str3 contenant les enzymes A et B, le substrat PNPGal et le cellobiose, inhibiteur de l'enzyme B, comme nous venons de le voir. Cet extrait est employé intact ou chauffé à 48°C pendant 7 mn 30 s.

Les résultats inclus dans le tableau 9 confirment les précédentes observations : l'extrait intact est peu inhibé, car l'enzyme A y prédomine, par contre l'extrait chauffé où l'enzyme B est responsable de l'activité restante, est pratiquement inactivé.

Tableau 9 : Inhibition de l'activité β -galactosidasique par le cellobiose. Souche 2011 Str3.

Nature de l'extrait	Pourcentage de l'activité totale	
	Sans cellobiose	Avec cellobiose
Extrait non chauffé	100	85
Extrait chauffé 7 mn 30 s à 48°C	29	5

Le p-nitrophényl- β -D-galactoside est à la concentration de 1 mM.
Le cellobiose est à la concentration de 50 mM.

Ces faits expérimentaux nous ont conduit à envisager l'hypothèse selon laquelle l'enzyme B serait en fait une β -glucosidase à activité β -galactosidasique et nous avons par la suite expérimenté de façon à infirmer ou confirmer cette hypothèse.

C - Inactivation thermique irréversible

L'enzyme B partiellement purifié a été porté à différentes températures pendant 7 mn 30 s et après refroidissement les activités β -galactosidasique et β -glucosidasique ont été mesurées.

Le tableau 10 montre que l'inactivation irréversible qui s'en suit, survient à la même température pour les deux activités. La température de demi-inactivation est proche de 50°C.

Tableau 10 : Inactivation irréversible d'un extrait de la souche 2011 L⁻i porté à différentes températures.

		Pourcentage d'activité résiduelle	
Température (en °C)	-----		
	Activité β -galactosidasique	Activité β -glucosidasique	
48	80	93	
50	38	39	
52	17	8	

D - Equation de Dixon et Webbs

La même préparation de l'enzyme B a été mélangée simultanément à deux substrats synthétiques, le PNPGal et le paranitrophényl- β -D-glucoside (PNPGLc). Dans ces conditions, si un seul enzyme est responsable de l'hydrolyse des deux substrats dans le même site actif, l'équation suivante peut être appliquée (102) :

$$V = \frac{V_1 \frac{S_1}{K_{m_1}} + V_2 \frac{S_2}{K_{m_2}}}{1 + \frac{S_1}{K_{m_1}} + \frac{S_2}{K_{m_2}}}$$

V : Vitesse totale d'hydrolyse

V_i : Vitesse maximale d'hydrolyse du substrat i (i, 1 ou 2)

S_i : Concentration du substrat i

K_{m_i} : Constante de Michaelis pour le substrat i.

Trois séries de tubes sont incubées, une série avec les deux substrats simultanément, une série avec le PNPGal seul et une série avec le PNPGlc seul. Ces deux dernières séries nous permettent de calculer les K_m et les vitesses maximales d'hydrolyse pour chacun des substrats. Dans le tableau 11 ne sont portés que les résultats concernant la première série.

Les valeurs obtenues expérimentalement sont très proches des valeurs théoriques calculées pour une seule enzyme, alors que les valeurs théoriques calculées pour deux enzymes sont très différentes.

L'enzyme B apparaît donc responsable des activités β -galactosidasique et β -glucosidasique. Son K_m est de 0,135 mM pour le PNPGlc et 6,4 mM pour le PNPGal. De cette différence d'affinité, il ressort que l'enzyme B peut être considéré comme une β -glucosidase à activité β -galactosidasique et non l'inverse. Toutefois, on peut remarquer que sa vitesse maximale d'hydrolyse pour le PNPGal est plus élevée que pour le PNPGlc.

Rhizobium meliloti type sauvage 2011 Str3 possède donc une β -galactosidase dont la synthèse est inductible et une β -glucosidase à activité β -galactosidasique. Cette dernière enzyme, appelée enzyme B, a un K_m pour le lactose de 30 mM, ce qui devrait suffire à la croissance sur milieu minimum lactosé si le nombre de molécules B par cellule est suffisant. Dans le dernier chapitre, grâce à l'isolement de mutants Lac^+ , nous essayons d'aborder ce problème de défaut de croissance sur milieu minimum lactosé.

CHAPITRE IV

ETUDE COMPAREE DU MUTANT 2011 L⁻i ET DE MUTANTS LAC⁺

DIFFERENTS DU TYPE SAUVAGE

I - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE MUTANTS Lac⁺ DIFFERENTS DU TYPE SAUVAGE

A - Isolement

Nous avons isolé des mutants Lac⁺ spontanés à partir de la souche mère 2011 L⁻i qui se développe extrêmement lentement sur milieu minimum lactosé. La souche 2011 L⁻i est cultivée dans un milieu riche puis les cellules sont centrifugées et lavées dans le milieu R. On étale ensuite cette souche à raison de 10⁷ à 10⁸ cellules sur le milieu RHB₁ gélosé contenant le lactose comme seule source de carbone. Au bout de 4 ou 5 jours, des colonies apparaissent à la fréquence de 2,5 . 10⁻⁶.

Nous avons récupéré un certain nombre de ces souches que nous avons étudiées du point de vue de leur croissance.

B - Croissance

Le tableau 12 est un récapitulatif des phénotypes des clones récupérés vis-à-vis des trois β-galactosides que nous avons employés : lactose, lactulose et 1-0-méthyl-β-D-galactoside. On remarque que les mutants Lac⁺ isolés ont tous retrouvé la capacité à se développer avec le lactulose comme seule source de carbone, mais aucune de ces souches ne peut, contrairement au type sauvage 2011 Str3, utiliser le 1-0-méthyl-β-galactoside pour sa croissance. Ces mutants Lac⁺ ne sont donc vraisemblablement pas des révertants vrais. Sur 50 mutants Lac⁺ étudiés, aucun ne s'est avéré être un révertant du type sauvage. Ces révertants, si ils existent, apparaissent donc à la fréquence inférieure à 5.10⁻⁸ (2,5.10⁻⁶ : 50). Il est possible qu'il n'y en ait pas du tout, notamment dans le cas où la mutation Lac⁻ serait une grande délétion dans l'ADN.

Tableau 12 : Croissances des souches étudiées sur le milieu minimum RHB₁ additionné d'un β -galactoside.

Nom de la souche	Lactose	Lactulose	1-0-méthyl- β -D-galactoside
2011 Str3	+	+	+
2011 L ⁻ i	Très faible	-	-
2011 L ⁺ i3	+	+	-
2011 L ⁺ i6	+	+	-
2011 L ⁺ i9	+	+	-
2011 L ⁺ i18	+	+	-
2011 L ⁺ i21	+	+	-
2011 L ⁺ i22	+	+	-
2011 L ⁺ i27	+	+	-
2011 L ⁺ i28	+	+	-
2011 L ⁺ i32	+	+	-
2011 L ⁺ i34	+	+	-
2011 L ⁺ i35	+	+	-
2011 L ⁺ i48	+	+	-

Il s'agit de croissances en milieu liquide.

C - Activités β -galactosidasiques des cellules entières

Ces mutants ont-ils retrouvé l'activité β -galactosidasique de la souche de type sauvage ? Le tableau 13 nous indique que non seulement ils n'ont pas retrouvé cette activité, mais que la plupart d'entre eux ont une activité égale à celle du mutant 2011 L⁻i. En effet, seules deux souches, la 2011 L⁺i6 et la 2011 L⁺i48, ont une activité β -galactosidasique significativement supérieure à celle du mutant 2011 L⁻i. (cf. tableau 13).

D - Inactivation thermique

Pour éviter d'avoir à procéder à l'extraction chez chaque nouvelle souche isolée des enzymes responsables des activités β -galactosidasiques, nous avons utilisé un test rapide d'inactivation thermique irréversible de

Tableau 13 : Activités β -galactosidasiques de l'ensemble des souches étudiées

Nom de la souche	Activité β -galactosidasique	Nom de la souche	Activité β -galactosidasique
2011 Str3	= 4,45	2011 L ⁺ i33	= 1,00
2011 L ⁻ i	= 0,90	2011 L ⁺ i34	= 1,04
2011 L ⁺ i3	= 0,98	2011 L ⁺ i35	= 1,19
2011 L ⁺ i6	= 2,91	2011 L ⁺ i36	= 0,76
2011 L ⁺ i9	= 0,88	2011 L ⁺ i37	= 0,82
2011 L ⁺ i11	= 0,97	2011 L ⁺ i38	= 0,82
2011 L ⁺ i12	= 0,92	2011 L ⁺ i39	= 0,98
2011 L ⁺ i13	= 0,88	2011 L ⁺ i40	= 0,76
2011 L ⁺ i14	= 1,03	2011 L ⁺ i41	= 0,93
2011 L ⁺ i15	= 1,00	2011 L ⁺ i42	= 0,82
2011 L ⁺ i16	= 1,00	2011 L ⁺ i43	= 0,91
2011 L ⁺ i17	= 0,82	2011 L ⁺ i44	= 0,83
2011 L ⁺ i18	= 1,07	2011 L ⁺ i45	= 1,05
2011 L ⁺ i19	= 0,96	2011 L ⁺ i46	= 0,83
2011 L ⁺ i20	= 0,90	2011 L ⁺ i47	= 0,80
2011 L ⁺ i21	= 0,91	2011 L ⁺ i48	= 1,76
2011 L ⁺ i22	= 0,94	2011 L ⁺ i49	= 0,98
2011 L ⁺ i23	= 0,82	2011 L ⁺ i50	= 0,83
2011 L ⁺ i24	= 0,81	2011 L ⁺ i52	= 1,18
2011 L ⁺ i25	= 0,87	2011 L ⁺ i53	= 0,76
2011 L ⁺ i26	= 0,90	2011 L ⁺ i54	= 1,11
2011 L ⁺ i27	= 0,90	2011 L ⁺ i55	= 0,96
2011 L ⁺ i28	= 0,91	2011 L ⁺ i56	= 1,05
2011 L ⁺ i29	= 0,91	2011 L ⁺ i57	= 0,91
2011 L ⁺ i30	= 1,08	2011 L ⁺ i58	= 0,83
2011 L ⁺ i31	= 0,96	2011 L ⁺ i59	= 1,16
2011 L ⁺ i32	= 0,94	2011 L ⁺ i60	= 0,87

Les résultats sont exprimés en unités β -galactosidasiques par mg de cellules (poids humide) perméabilisées par le toluène.

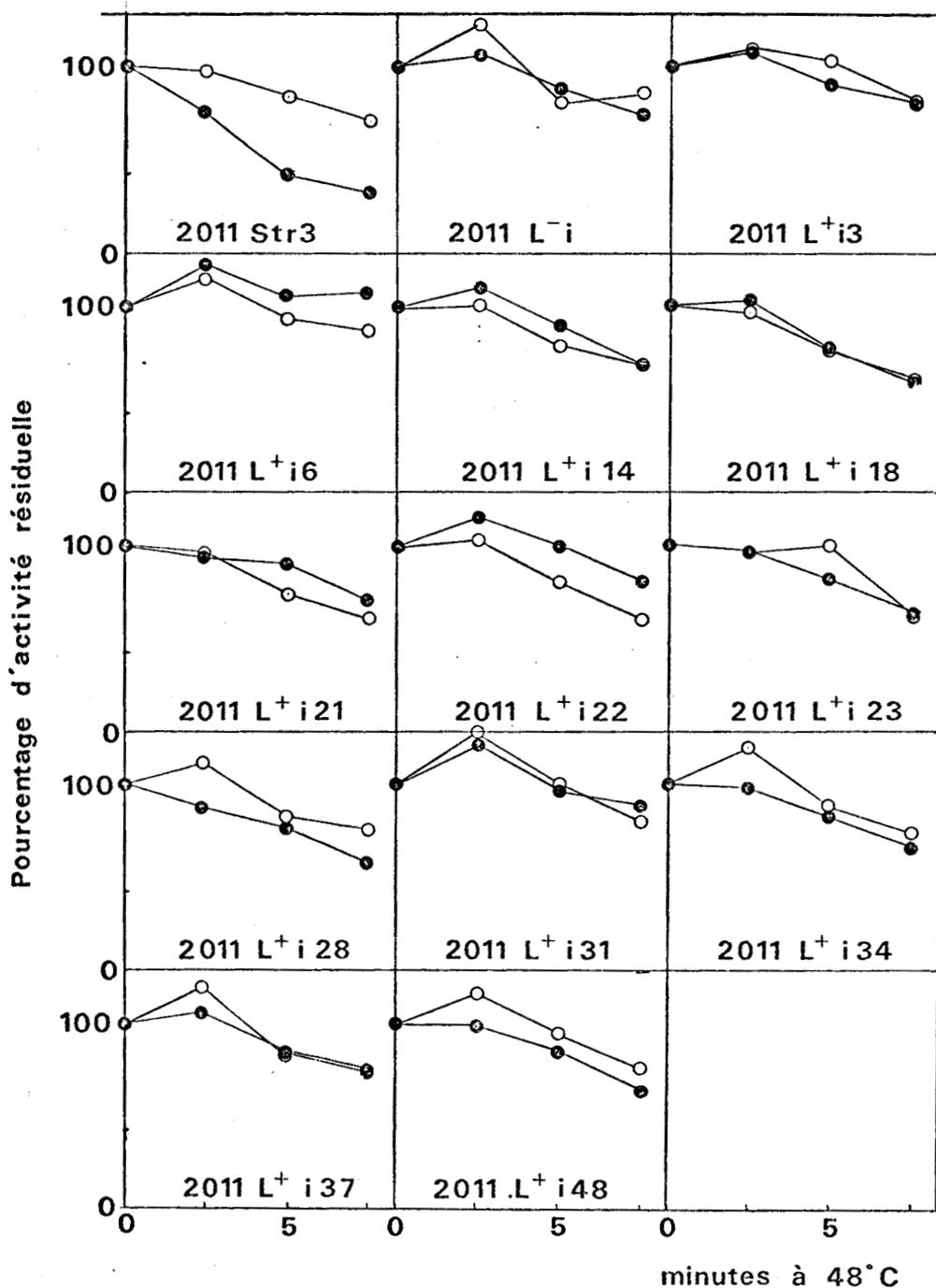


Figure 10. Inactivation thermique irréversible de cellules entières perméabilisées. Les courbes représentent les activités β -galactosidasiques résiduelles après chauffage à 48°C. Les souches ont été cultivées dans le milieu RC (○—○) ou dans ce milieu additionné de lactose à 1% (●—●).



cellules entières perméabilisées. Pour chaque clone étudié, ce test a été fait sur deux lots de cellules, les unes étaient cultivées sur milieu riche RC, les autres sur ce milieu additionné de lactose à 1 %, ce qui aurait dû induire la synthèse de l'enzyme A éventuellement présente.

Les courbes de la figure 10 montrent deux comportements. D'une part, la souche de type sauvage 2011 Str3 voit son pourcentage d'activité β -galactosidasique décroître fortement en fonction du temps de chauffage, quand cette souche a été cultivée en milieu lactosé et faiblement dans l'autre cas. D'autre part, l'ensemble des autres souches testées, qu'il s'agisse du mutant 2011 L⁻i ou des mutants Lac⁺, où les deux lots de cellules se comportent de la même façon. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de l'enzyme B, dont la synthèse n'est pas inductible, comme unique enzyme à activité β -galactosidasique chez l'ensemble de ces souches.

E - Propriétés symbiotiques

Les souches 2011 Str3, 2011 L⁻i, 2011 L⁺i3, 2011 L⁺i6 et 2011 L⁺i9 ont été inoculées à plusieurs reprises à des plantules aseptiques de luzerne (Medicago sativa). Ces souches provoquent toutes la formation de nodules racinaires et sont efficaces (capables de fixer l'azote atmosphérique).

F - Fréquence de mutation

La fréquence de mutation spontanée Lac⁺ à partir de la souche 2011 L⁻i est de $2,5 \cdot 10^{-6}$. Cette fréquence nous est apparue élevée. Aussi avons-nous calculé chez la souche sauvage 2011 la fréquence de la mutation spontanée streptomycine-résistance. La fréquence trouvée est de $3,5 \cdot 10^{-7}$, soit donc 7 fois plus faible que celle de la mutation Lac⁺. La fréquence si élevée de la mutation Lac⁺ pourrait être due à l'une des deux causes suivantes :

- plusieurs gènes sont impliqués dans l'apparition d'une souche Lac⁺. Une mutation sur un seul de ces gènes donne naissance à une telle souche ;
- il ne s'agit pas d'une mutation au sens dommage physique causé à l'ADN de la bactérie, mais plutôt mise en fonctionnement à basse fréquence d'un mécanisme de dérégulation d'une partie du génome normalement incapable de s'exprimer.

Nous sommes donc en présence de mutants Lac⁺ qui n'ont pas subi une

mutation réverse et qui apparaissent à une fréquence élevée.

Nous avons choisi un de ces mutants, représentatif du groupe, la souche 2011 L⁺i3, et l'avons étudié plus en détail par la suite.

II - COMPARAISON DES ACTIVITES β -GALACTOSIDASQUES DES SOUCHES 2011 L⁻i

ET 2011 L⁺i3

A - Inductibilité

Le tableau 14 indique les activités β -galactosidasiques des souches 2011 Str3, 2011 L⁻i, 2011 L⁺i3 et Escherichia coli 200 PS F'lac. On constate d'une part que les souches 2011 L⁻i et 2011 L⁺i3 ont des activités voisines et que la synthèse de leur β -galactosidase est peu induite par l'addition de lactose ; d'autre part, on voit que l'induction par le lactose de la souche de type sauvage 2011 Str3 est très inférieure à celle d'une souche d'Escherichia coli portant le plasmide F'lac prise comme témoin.

Tableau 14 : Unités β -galactosidasiques de 1 mg de cellules (poids sec)



Souche	Cellules perméabilisées		
	Cellules intactes	Non induites	Induites par le lactose
Rhizobium meliloti 2011 Str3	0,8	2,9	13,9
Rhizobium meliloti 2011 L ⁻ i	0,6	1,6	2,2
Rhizobium meliloti 2011 L ⁺ i3	0,6	1,5	2,8
Escherichia coli K12 200PS F'lac	ND	0,4	40,2

Les cellules non induites sont cultivées dans le milieu RC et les cellules induites dans le même milieu additionné de lactose à 1 %.

B - Activités β -galactosidasiques et lactasiques des extraits bruts

Pour deux extraits préparés dans les mêmes conditions, le tableau 15 donne les activités β -galactosidasiques (vis-à-vis du PNPGal), lactasiques (vis-à-vis du lactose) et leur répartition au cours de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium. Une grande similitude est constatée entre les deux souches, ce qui peut paraître surprenant étant donnée leur différence quant à l'utilisation du lactose pour la croissance.

Tableau 15 : Activités β -galactosidasiques et lactasiques et leur répartition au cours de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium. Souches 2011 L⁻i et 2011 L⁺i3.

Concentration en Sulfate d'ammonium (en % de saturation)	Substrat PNPGal		Substrat lactose	
	2011 L ⁻ i	2011 L ⁺ i3	2011 L ⁻ i	2011 L ⁺ i3
0 - 35	0,03	0	0,01	0
35 - 50	0,14	0,25	0,05	0,08
50 - 65	0,44	0,56	0,21	0,19
65 - 100	0,03	0,08	0,01	0,02
0 - 100	0,64	0,89	0,28	0,29

Les résultats sont exprimés en absorbance. Le PNPGal est à la concentration de 1 mg/ml. Le lactose est à la concentration de 40 mg/ml. Les activités vis-à-vis du PNPGal et du lactose ne sont pas comparables entre elles.

C - Inactivation

Nous avons effectué des expériences montrant qu'un extrait brut de la souche 2011 L⁺i3 a le même comportement à 48°C qu'un extrait de la souche 2011 L⁻i (voir figure 5). Ce comportement est très différent chez la souche 2011 Str3.

Il en est de même en ce qui concerne l'inactivation par l'urée. En présence d'urée 3 M par exemple, l'extrait brut de la souche 2011 Str3 n'a conservé que 2,5 % de son activité contre 30 % et 34 % respectivement pour

les extraits bruts des souches 2011 L⁻i et 2011 L⁺i3.

Ces résultats sont des arguments très puissants en faveur du fait que la souche 2011 L⁺i3, comme 2011 L⁻i, posséderait l'enzyme B comme unique enzyme à activité β -galactosidasique. Il y aurait donc un même équipement enzymatique malgré la différence de phénotype entre les deux souches. Pour mettre ceci en évidence de manière directe, nous avons utilisé l'électrophorèse en gel d'agar.

D - Electrophorèse en gel d'agar

Le comportement d'un extrait brut de la souche 2011 L⁺i3 soumis à une électrophorèse en gel d'agar est identique à celui d'un extrait de la souche 2011 L⁻i (voir figure 7), révélant une seule bande d'activité β -galactosidasique correspondant à l'enzyme B.

III - MESURE DE LA PENETRATION DU LACTOSE ET DE L'IPTG DANS LES CELLULES

A - Temps courts

Etant donnée la similitude des β -galactosidasases des souches 2011 L⁻i et 2011 L⁺i3, il était indispensable de savoir si la première ou la seconde mutation n'avait pas affecté un gène impliqué dans le système de pénétration au lactose dans les cellules, éventuellement un gène codant pour une perméase au lactose s'il en existe une chez Rhizobium meliloti.

Aussi, avons nous mesuré à l'aide de lactose radioactif, la pénétration du lactose dans des cellules entières non perméabilisées des trois souches 2011 Str3, 2011 L⁻i et 2011 L⁺i3.

La figure 11 montre que le lactose pénètre rapidement dans les cellules quelle que soit la souche considérée et que les différences observées pendant les cinq premières minutes de pénétration sont tout à fait minimales.

Ce flux d'entrée est constant en fonction du temps et ne se tarit pas après 20 heures chez 2011 L⁻i (figure 12).

Ce flux entrant de lactose peut être stoppé dès le départ par addition de lactose non radioactif en large excès ou d'azoture de sodium (0,05 %) (figure 13).

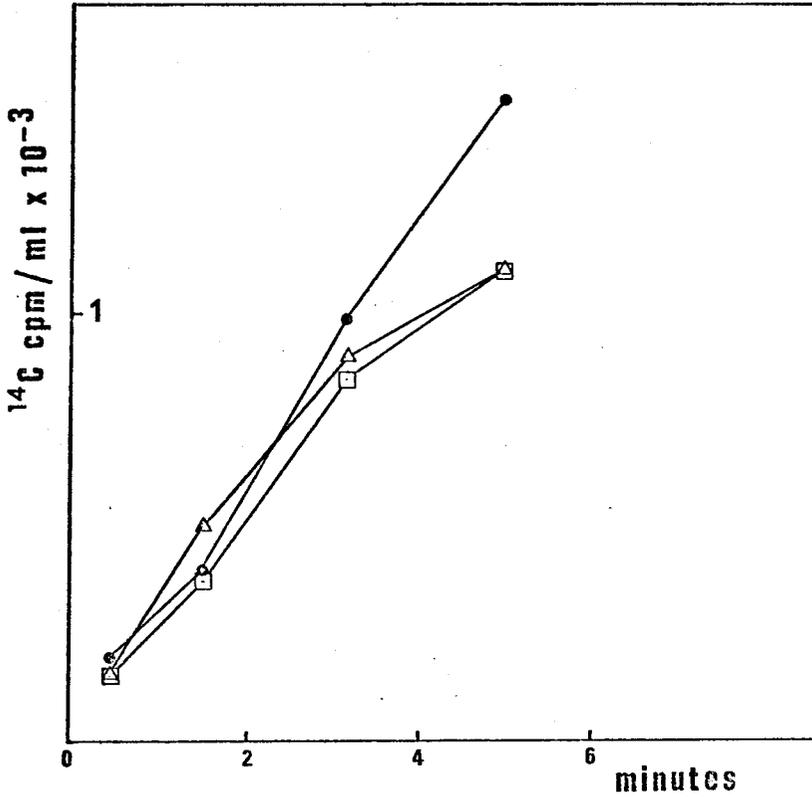


Figure 11.
Entrée du lactose en fonction du temps dans les cellules des souches 2011 Str3 (Δ - Δ), 2011 L⁻ⁱ (\bullet - \bullet) et 2011 L⁺ⁱ3 (\square - \square). Le lactose non radioactif à 5mM et le lactose radioactif à 0,2 μ Ci/ml sont ajoutés au temps 0. Environ $8 \cdot 10^8$ bactéries sont prélevées et filtrées aux différents temps.

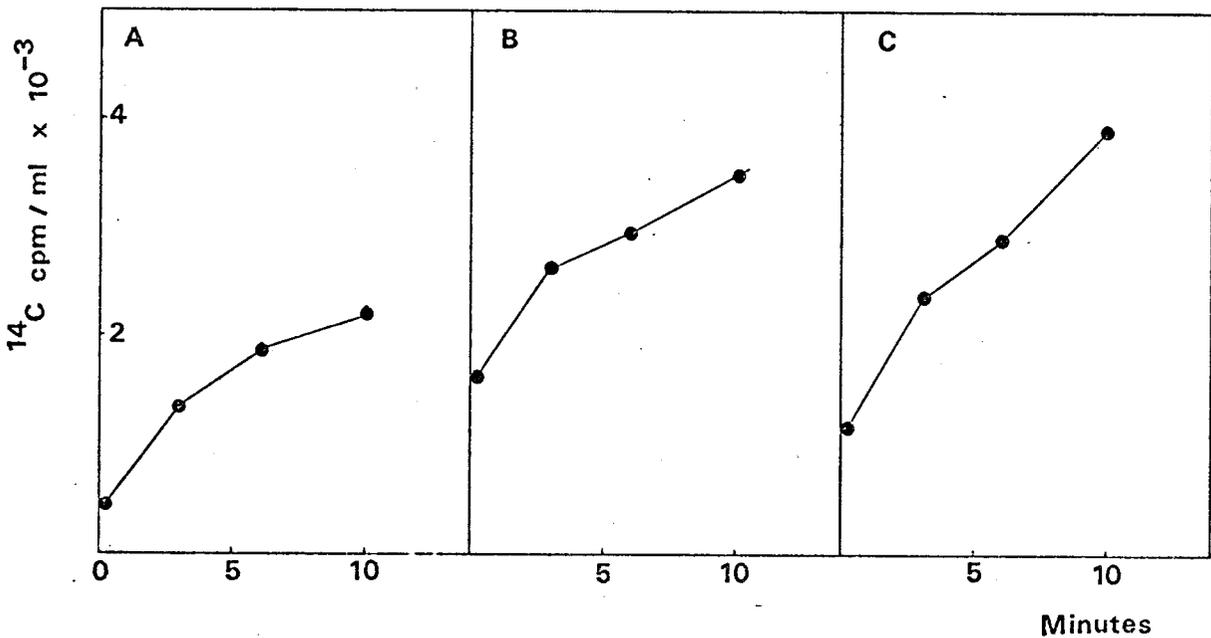


Figure 12. Entrée du lactose en fonction du temps dans les cellules de la souche 2011 L⁻ⁱ. Le lactose non radioactif à 2mM est ajouté au temps 0.
A. Addition de lactose radioactif à 0,2 μ Ci/ml au temps 0.
B. Addition de lactose radioactif à 0,2 μ Ci/ml après 4 heures.
C. Addition de lactose radioactif à 0,2 μ Ci/ml après 20 heures.
Environ $8 \cdot 10^8$ bactéries sont prélevées et filtrées aux différents temps.

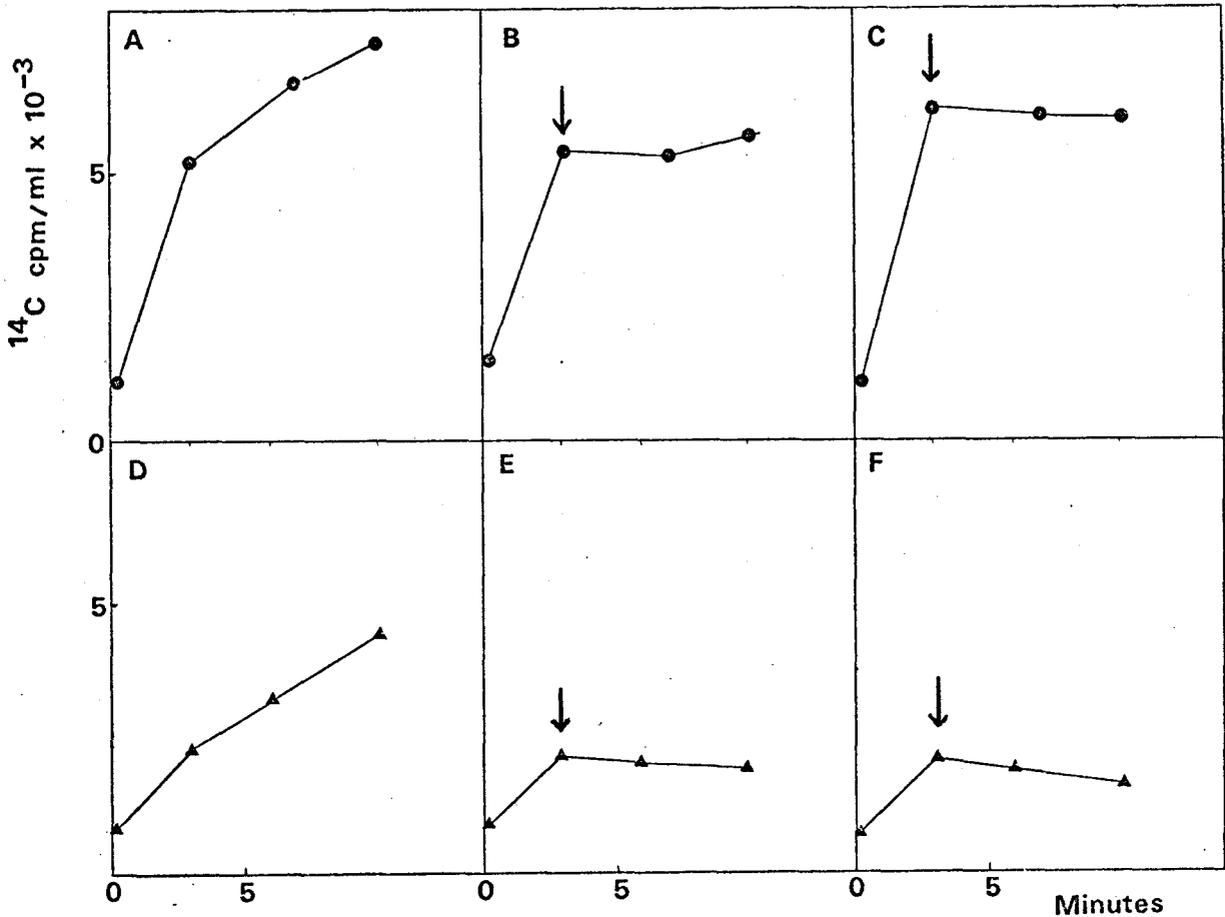


Figure 13. Entrée du lactose en fonction du temps dans les cellules des souches 2011 Str3 (A,B,C) et 2011 L⁻i (D,E,F). Le lactose non radioactif à 2mM et le lactose radioactif à 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ sont ajoutés au temps 0. En B et E, la flèche indique l'addition de lactose non radioactif à 50mM. En C et F, la flèche indique l'addition d'azoture de sodium à 0,05%

Par contre, aucune entrée d'IPTG n'a été détectée après 15 mn chez 2011 Str3, ni chez 2011 L⁺i3.

L'entrée de l'IPTG ou d'un de ses dérivés a lieu "in vivo" puisqu'il y a induction de la synthèse de l'enzyme A par addition d'IPTG ; cette entrée est vraisemblablement due à un phénomène lent qui pourrait se produire par diffusion simple.

B - Temps longs

L'expérience d'accumulation de métabolites marqués dans les cellules après addition de lactose radioactif a été renouvelée sur des temps longs et dans les conditions de culture, c'est-à-dire que les souches ont été inoculées dans le milieu minimum RHB₁ additionné de lactose non radioactif à 2 mM et de lactose radioactif à 0,02 μ Ci/ml soit environ 40000 cpm/ml. La figure 14 montre que l'accumulation de produits marqués est un reflet exact de la croissance dans le même milieu, les courbes d'accumulation étant superposables aux courbes de croissance.

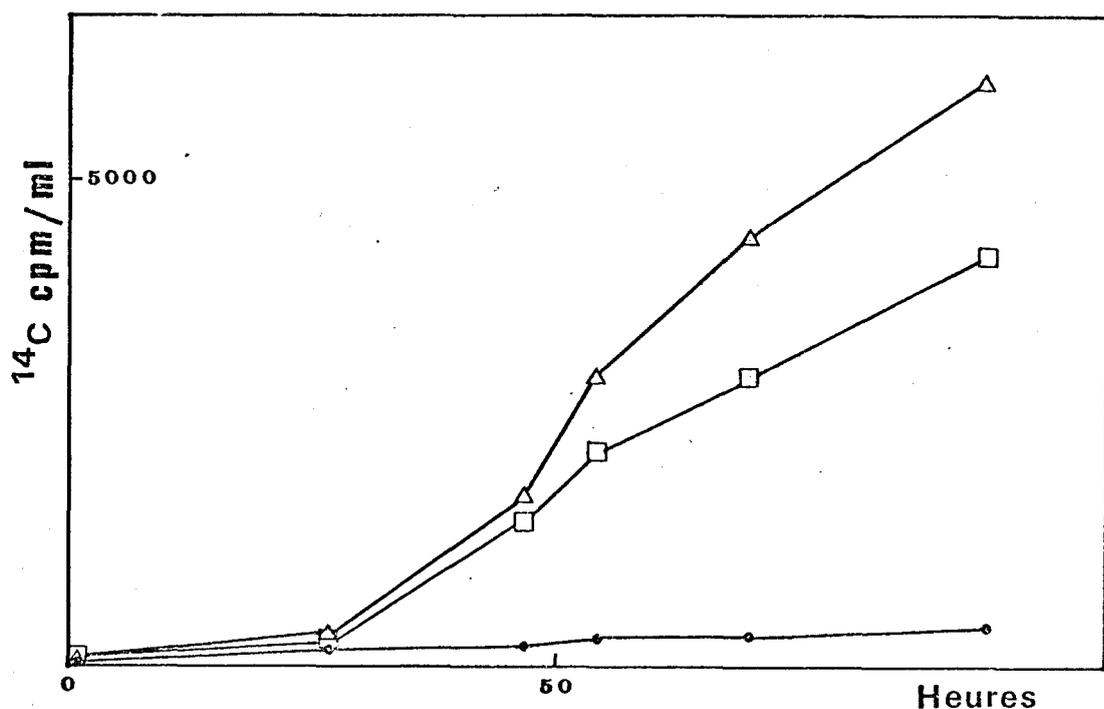


Figure 14. Radioactivité accumulée dans les cellules des souches 2011 Str3 (Δ - Δ), 2011 L⁻i (\bullet - \bullet) et 2011 L⁺i3 (\square - \square) lors de leur croissance dans le milieu minimum RHB₁ additionné de lactose à 2mM et de lactose radioactif à 0,02 μ Ci/ml.

Le surnageant de culture est récupéré en fin de croissance, après 95 heures, et compté en scintillation liquide. Les résultats sont les suivants : par millilitre 8460 cpm pour le surnageant de la culture de 2011 Str3, 38860 cpm pour 2011 L⁻i et 6610 pour 2011 L⁺i3. Si l'on tient compte des

excrétions réjetées dans le milieu par les cellules, on peut conclure que les souches 2011 Str3 et 2011 L⁺i3 ont utilisé la quasi totalité du lactose ; les cellules de la souche 2011 L⁻i ont absorbé très peu de lactose.

Dès lors, si l'on admet un équipement identique pour l'hydrolyse du lactose (β -galactosidase) et la pénétration de ce dernier dans les cellules (perméases ?), comment expliquer l'utilisation du lactose par 2011 L⁺i3 pour sa croissance ou plutôt sa non-utilisation par 2011 L⁻i ? Plusieurs hypothèses subsistent, et dans le dernier paragraphe, nous présentons un certain nombre de résultats expérimentaux et nous discutons ces hypothèses.

IV - ETUDE ET DISCUSSION DU PROBLEME POSE PAR LA DIFFERENCE DE CROISSANCE

ENTRE LES MUTANTS 2011 L⁻i ET 2011 L⁺i3 SUR MILIEU MINIMUM LACTOSE

Si l'on reprend les faits expérimentaux importants déjà énoncés sur ce problème, on peut dégager quatre points principaux :

1) La mutation conduisant de la souche 2011 L⁻i à 2011 L⁺i3 est une mutation spontanée survenant selon toute vraisemblance en une seule étape. En effet, la fréquence de mutation est plus élevée que la normale et de plus, le délai d'apparition des mutants, 4 ou 5 jours, est le délai moyen habituel. Nous avons par ailleurs mesuré la croissance de la souche 2011 L⁺i3 sur un grand nombre d'oses et osides (expérience analogue à celle du tableau 1). La croissance est la même que celle de la souche mère 2011 L⁻i pour tous les glucides essayés autres que les β -galactosides, la mutation n'est donc pas pléiotrope, au moins en ce qui concerne les glucides.

2) La vitesse initiale de pénétration du lactose dans les cellules vivantes est identique chez les souches 2011 L⁻i et 2011 L⁺i3, cette vitesse est constante dans le temps chez la souche 2011 L⁻i.

3) Les deux souches possèdent une seule enzyme à activité β -galactosidase, appelée enzyme B. Cette enzyme est en fait une β -glucosidase à activité β -galactosidasique.

4) Dès lors, faut-il penser que le fonctionnement de l'enzyme B est bloqué pendant la croissance chez 2011 L⁻i ? C'est ce que nous avons voulu

examiner par l'expérience suivante, qui constitue la quatrième observation.

Puisqu'il n'est pas possible de cultiver la souche 2011 L⁻i sur lactose comme seule source de carbone, nous avons cultivé les deux souches sur glucose plus galactose, qui sont ses produits d'hydrolyse. Des prélèvements sont effectués à différents temps, les bactéries sont centrifugées et leur activité β -galactosidasiq (vis-à-vis du PNPGal) est mesurée dans le tampon phosphate de potassium après perméabilisation des cellules.

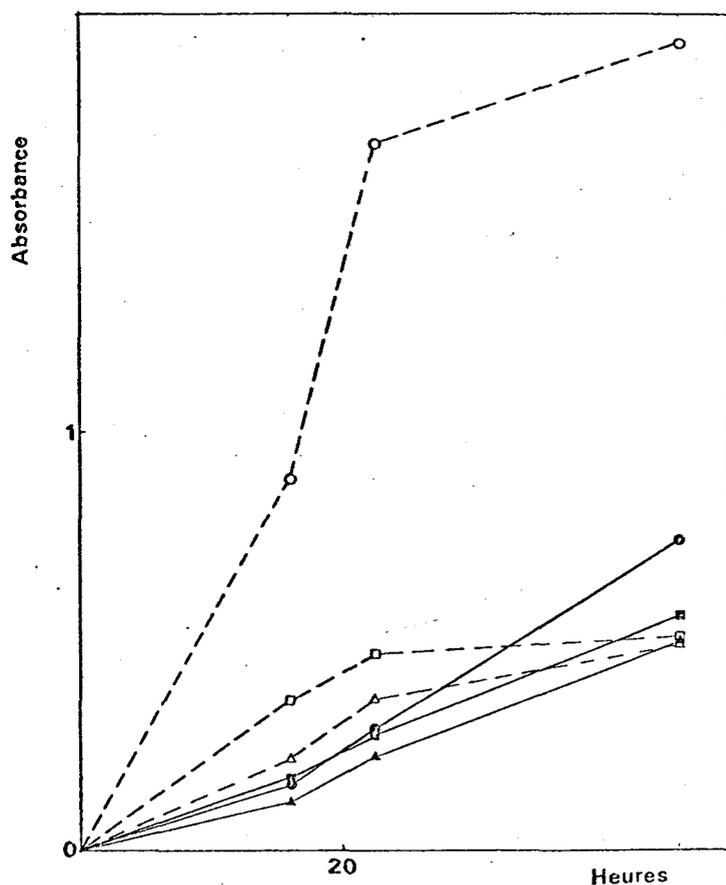


Figure 15
Les courbes en trait plein représentent la croissance des souches 2011 Str3 (●—●), 2011 L⁻i (▲—▲) et 2011 L⁺i3 (■—■) dans le milieu minimum RHB₁ additionné de glucose plus galactose. Les courbes en pointillé et les symboles creux représentent l'activité β -galactosidasiq de ces souches pendant leur croissance. L'absorbance est mesurée à 600 nm pour les croissances et à 400 nm pour les activités β -galactosidasiq (libération de paranitrophénol).

La figure 15 montre la croissance des souches étudiées sur le milieu RBH₁ additionné de glucose 0,5 % et de galactose 0,5 %, et le taux d'activité β -galactosidasiq pendant cette croissance. Les taux d'activité β -galactosidasiq des souches 2011 L⁻i et 2011 L⁺i3 sont très voisins ; bien entendu, le taux d'activité de la souche 2011 Str3 est très supérieur. On remarquera

que pour les trois souches, l'activité spécifique diminue fortement pendant le deuxième jour de culture (activité spécifique divisée par 2).

En tenant compte de ces quatre observations, et si l'on veut expliquer pourquoi la souche 2011 L⁺i3 est capable de se développer sur milieu minimum lactosé ou pourquoi la souche 2011 L⁻i n'en est pas capable, on peut envisager l'une des hypothèses suivantes :

- Le lactose est un mauvais substrat énergétique chez 2011 L⁻i.
- L'enzyme B est rétro-inhibée par un métabolite chez 2011 L⁻i.
- Une répression catabolique empêche la synthèse d'enzymes du catabolisme chez 2011 L⁻i.

A - Rendement énergétique

Dans cette hypothèse, le lactose est utilisé mais sa dégradation ne libère pas suffisamment d'énergie pour permettre la croissance chez la souche 2011 L⁻i. Deux faits expérimentaux infirment cette hypothèse :

1) La croissance de la souche 2011 L⁻i sur milieu minimum RHB₁ additionné de glucose plus galactose est identique à celle de la souche 2011 L⁺i3 (figure 15).

2) Nous avons mesuré la croissance des deux souches sur milieu minimum RHB₁ additionné de glucose ou de fructose en quantité limitante, inférieure ou égale à 500 µg/ml. Le glucose est un des oses libérés par l'hydrolyse du lactose et le fructose a été choisi car on sait que son métabolisme est très différent de celui du glucose chez Rhizobium meliloti (93), il induit notamment la synthèse d'exopolysides. Les courbes de la figure 16 montrent que les croissances observées sont identiques chez les deux souches.

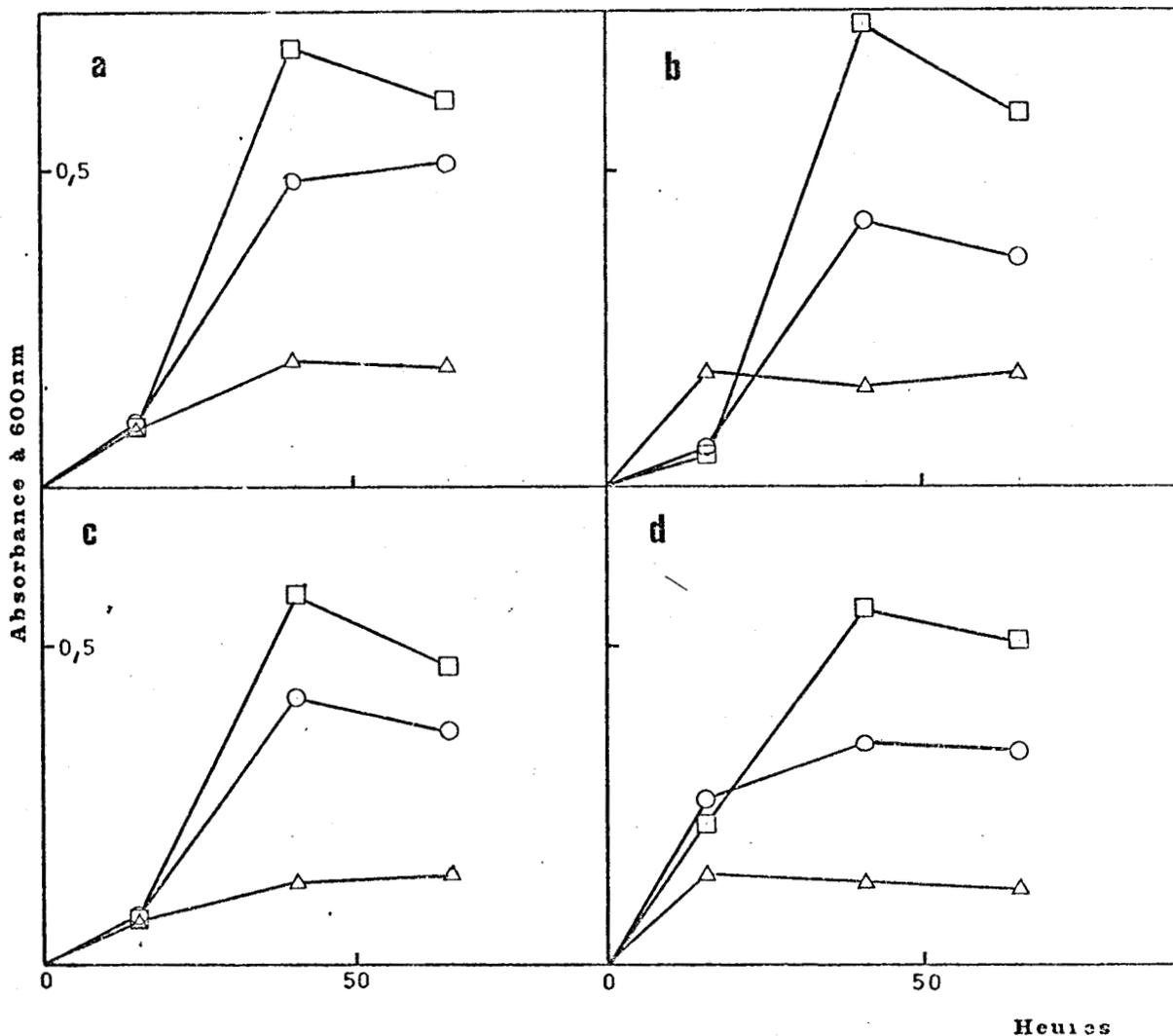


Figure 16. Courbes de croissance dans le milieu minimum RHB₁ additionné d'un ose en concentration limitante. Les inocula sont d'environ 10⁷ bactéries/ml.

- a. Souche 2011 L⁻i, glucose
 - b. Souche 2011 L⁻i, fructose
 - c. Souche 2011 L⁺i3, glucose
 - d. Souche 2011 L⁺i3, fructose
- △ Concentration en ose, 100 µg/ml
○ Concentration en ose, 300 µg/ml
□ Concentration en ose, 500 µg/ml



B - Rétro-inhibition

Si le lactose n'est pas utilisé, ce peut être parce que l'enzyme B est inhibée par un métabolite rétro-inhibiteur. Si c'est le cas, ce métabolite existe dans le cytoplasme des cellules et si l'on lyse les cellules, il doit être libéré dans le milieu extérieur, et donc se retrouver dans le lysat. Au cours des premières étapes de la purification enzymatique, ce métabolite inhibiteur doit être rapidement éliminé. En ajoutant à une fraction enzymatique purifiée un certain volume de lysat, on devrait non pas augmenter l'activité β -galactosidase bien que ce lysat contienne aussi l'enzyme B, mais au contraire, la diminuer. C'est le principe d'une expérience dont les résultats sont présentés ci-dessous. Le lysat est très dilué pour que son activité soit inférieure à celle de l'enzyme B purifié : les résultats sont exprimés en absorbance à 400 nm. Tous les chiffres sont comparables.

1ère expérience

	Enzyme	Lysat	Enzyme + Lysat
2011 L ⁻ i	4,54	1,99	10,25
2011 L ⁺ i3	6,92	1,46	8,92
Enzyme 2011 L ⁻ i + lysat 2011 L ⁺ i3 :		9,53	
Enzyme 2011 L ⁺ i3 + lysat 2011 L ⁻ i :		10,17	

2ème expérience

	Enzyme	Lysat	Enzyme + lysat
2011 L ⁻ i	6,62	1,99	14,51
2011 L ⁺ i3	N.D.	1,80	10,57
Enzyme 2011 L ⁻ i + lysat 2011 L ⁺ i3 :		12,07	
Enzyme 2011 L ⁺ i3 + lysat 2011 L ⁻ i :		13,97	

Enzyme signifie enzyme B purifié . Le substrat est le PNPGal.

N.D. : non déterminé.

Les valeurs expérimentales enzyme + lysat ne sont jamais inférieures aux valeurs théoriques calculées en additionnant la valeur enzyme seul à la valeur lysat seul. Ceci n'est pas en faveur d'une inhibition par un métabolite contenu dans le lysat.

C - Répression catabolique

UCKER et SIGNER (85) travaillant sur Rhizobium meliloti type sauvage 2011 Str3, ont montré que le succinate avait un rôle très proche de celui d'un répresseur catabolique chez cette souche. Nous avons mis en évidence une activité β -galactosidasique chez des cellules de 2011 L⁻i cultivées sur succinate comme seule source de carbone. Il est donc impossible que le succinate réprime totalement la synthèse de l'enzyme B ; néanmoins, l'utilisation du succinate devait nous apporter des éléments importants de réflexion.

Nous avons d'abord vérifié que le succinate, le fumarate et le glutamate n'étaient pas inhibiteurs des activités β -galactosidasiques A et B, puis que les activités β -galactosidasiques des cellules de 2011 L⁻i et 2011 L⁺i3 cultivées en milieu minimum additionné de succinate étaient faibles et identiques. Mais, l'expérience la plus intéressante est schématisée sur la figure 17. Elle consiste à mesurer la croissance des trois souches étudiées principalement sur milieu minimum additionné de succinate en concentration limitante et de lactose. La figure 17a montre que la souche de type sauvage 2011 Str3 présente une croissance diauxique ; dans un premier temps, elle dégrade le succinate, puis celui-ci étant épuisé, elle dégrade le lactose pendant sa deuxième phase de croissance. La souche 2011 L⁻i qui ne dégrade pratiquement pas le lactose ne présente que la phase de croissance correspondant à l'utilisation du succinate (fig. 17b). La souche 2011 L⁺i3 montre également deux phases de croissance (fig. 17c). Toutefois, la différence de pente observée entre les deux phases est faible et la phase de latence très courte, contrairement à la souche de type sauvage où elle dure au moins quatre heures.

L'ensemble de ces résultats peut s'interpréter de la façon suivante.

Chez la souche 2011 Str3, lorsque le succinate est entièrement utilisé, le lactose présent induit la synthèse de l'enzyme A et on observe durant cette induction, une phase de latence longue. L'enzyme B serait incapable d'hydrolyser le lactose chez cette souche. Par contre, chez la souche 2011 L⁺i3, l'enzyme A serait inexistant et l'enzyme B serait capable d'hydrolyser le lactose, la synthèse de cette enzyme fonctionnelle serait constitutive.

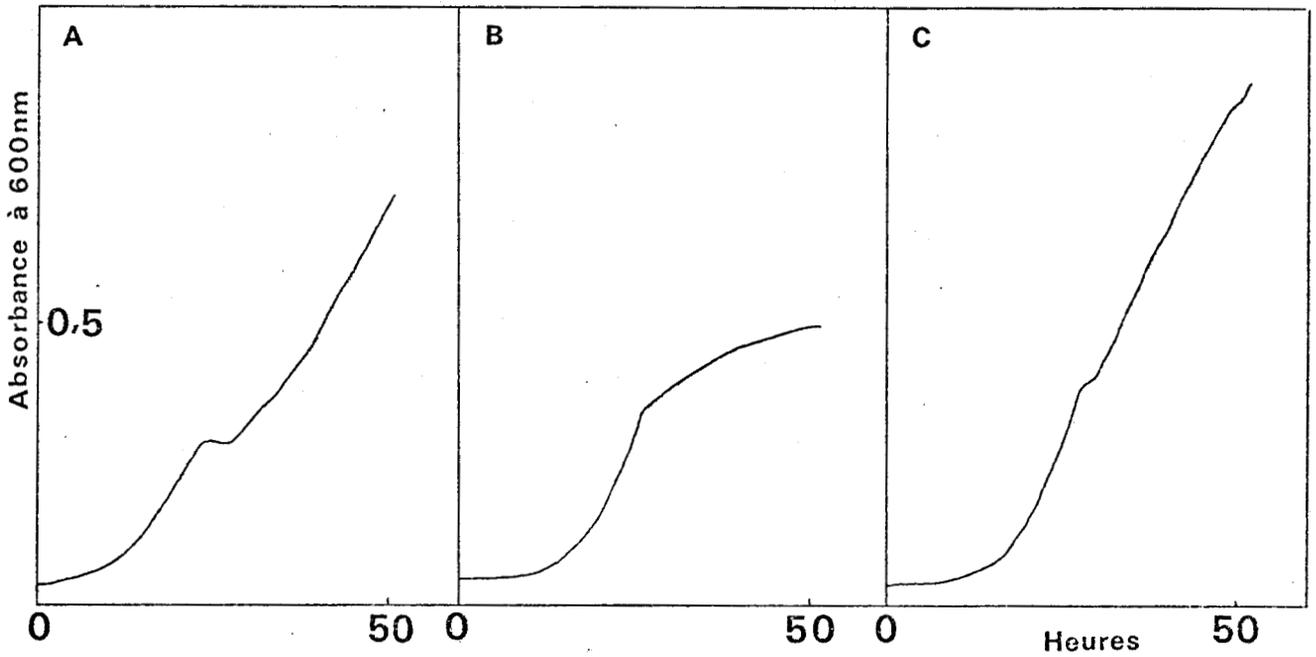


Figure 17. Courbes de croissance des souches 2011 Str3 (A), 2011 L⁻i (B) et 2011 L⁺i3 (C) dans le milieu minimum M9A additionné de succinate à 0,1% et de lactose à 0,1%

La légère différence de pente observée dans la courbe de la figure 17c marquerait l'épuisement du succinate suivi peu après par l'hydrolyse du lactose par l'enzyme B.

Discussion

Ce travail a d'abord consisté à isoler et à étudier deux mutants de Rhizobium meliloti sur le caractère lactose. En étudiant chez ces mutants le devenir du lactose ajouté comme source de carbone, nous avons pu tirer un certain nombre d'enseignements valables pour la souche de type sauvage 2011 Str3.

Le premier de ces mutants, 2011 L⁻i, est un mutant se développant très lentement sur milieu minimum lactosé et incapable de se développer avec le lactulose ou le 1-O-méthyl- β -D-galactoside comme seule source de carbone. Cette première mutation n'a pas affecté la possibilité pour Rhizobium meliloti de se développer sur un grand nombre d'oses ou osides, présentant ainsi de grandes capacités cataboliques.

Le second mutant étudié, 2011 L⁺i 3, est le représentant de la classe la plus nombreuse parmi les mutants Lac⁺. Dans cette classe, se situent tous les mutants Lac⁺ dont l'activité β -galactosidasique des cellules entières vis-à-vis du paranitrophényl- β -D-galactopyranoside est la même que celle des cellules 2011 L⁻i.

L'étude simultanée de ces deux mutants et de la souche de type sauvage nous ont permis de mettre en évidence chez cette dernière, deux enzymes à activité β -galactosidasique A et B.

Dans les expériences destinées à déterminer l'inductibilité de la synthèse des enzymes A et B, les inducteurs ajoutés dans le milieu de culture l'ont toujours été à haute concentration : 10^{-3} M. Chez la souche de type sauvage, l'activité β -galactosidasique est 6 ou 7 fois supérieure quand cette souche est cultivée sur milieu minimum lactosé, plutôt que sur milieu minimum glucosé ou fructosé. L'addition de lactose comme source de carbone induit donc la synthèse d'au moins une des enzymes à activité β -galactosidasique présentes chez cette souche.

Quand le lactose est ajouté à la concentration de 10^{-3} M à un milieu minimum dont la principale source de carbone est le fructose ou le glycérol, le taux d'activité β -galactosidasique est moins élevé qu'avec le lactose seul. Le fructose se distingue du glycérol par des taux d'activité toujours plus faibles.

Quand l'IPTG est ajouté à un milieu minimum fructosé, il n'y a plus aucune induction alors que l'IPTG est un inducteur chez cette même souche cultivée en milieu riche contenant de l'extrait de levure ou dans une moindre mesure en milieu minimum glycérolé. Il semble donc que le fructose agit comme un répresseur dans la synthèse d'au moins une des enzymes. UCKER et SIGNER (85) indiquent que le succinate exerce un effet analogue à la répression catabolique sur l'activité β -galactosidasique et sur d'autres activités. Ces auteurs ont travaillé sur la souche de type sauvage 2011 Str3 et ont montré que, cultivée dans le milieu minimum lactosé plus succinate en concentration limitante, elle présentait une croissance diauxique. Nous avons fait des expériences similaires avec le lactose plus fructose en concentration limitante, la courbe de croissance n'est alors pas diauxique.

Chez la souche 2011 L⁻i, l'activité β -galactosidasique des cellules cultivées en milieu minimum RHB₁ est toujours sensiblement la même quelle que soit la ou les sources de carbone. Donc, la synthèse de l'enzyme B, unique β -galactosidase chez cette souche, n'est pas inductible par les composés essayés. Le taux de base dû à cette enzyme est de 0,52 unité β -galactosidasique en milieu minimum fructosé. Comme chez la souche 2011 Str3 le taux mesuré pour ce même milieu est de 0,6, il semble que dans ces conditions, l'activité due à l'enzyme A soit très faible ou nulle. En présence d'autres sucres et sans inducteur, l'activité β -galactosidasique du mutant est presque égale à celle du type sauvage. On peut donc considérer que l'activité de base de l'enzyme A est faible ; le lactose, le lactulose, l'IPTG, le TMG et le MG apparaissent alors comme des inducteurs puissants et l'enzyme A comme une β -galactosidase typique. Cette enzyme n'a pas d'activité β -glucosidasique. Son Km pour le lactose 4,1 mM, est proche de celui de la β -galactosidase lacZ d'Escherichia coli (2 mM). C'est certainement l'enzyme A qui hydrolyse le 1-0-méthyl- β -D-galactoside puisque les mutants Lac⁺ qui n'en sont pas pourvus ne peuvent croître sur ce substrat, l'enzyme B semble donc incapable d'une telle hydrolyse.

La première mutation n'affecte pas le système de pénétration du lactose dans la cellule, elle se traduit simplement par la perte de la β -galactosidase A.

Quant à l'enzyme B, nous montrons dans ce mémoire qu'il ne s'agit pas

d'une β -galactosidase, mais d'une β -glucosidase à activité β -galactosidase et nous décrivons quelques unes de ses propriétés, d'autres ont été décrites par DELMAERE (103) et JOTTARD (104). Cette enzyme est un nouvel exemple d'enzyme possédant deux activités β -glycosidasiques, telles les β -galactosidases d'amande (105, 106) et d'épididyme du rat (107). L'enzyme B a une affinité bien plus grande pour le PNPGlc que pour le PNPGal (Km respectivement de 0,135 et 6,4 mM), c'est pourquoi nous la considérons comme une β -glucosidase, toutefois sa vitesse maximale d'hydrolyse pour le PNPGlc est inférieure à celle du PNPGal.

La deuxième mutation conduisant au phénotype Lac⁺ ne semble affecter ni les enzymes A et B, ni le système de pénétration au lactose dans les cellules. Avec un Km de 30 mM pour le lactose et en quantité suffisante dans les cellules, l'enzyme B devrait permettre à toute souche qui en est pourvue de se développer normalement sur milieu minimum lactosé. Or, la souche 2011 L⁻i en est incapable et nous avons cherché à savoir pourquoi. On peut éliminer l'hypothèse selon laquelle le mutant 2011 L⁻i ne laisserait pas pénétrer le lactose dans la cellule, et l'hypothèse selon laquelle l'enzyme B serait rétro-inhibée. Il n'est pas question de penser que la synthèse de l'enzyme B pourrait être réprimée, puisqu'on met constamment cette enzyme en évidence chez la souche 2011 L⁻i, contrairement à l'enzyme A qui est soumise à régulation chez la souche de type sauvage. C'est cependant l'étude de la répression catabolique au moyen du phénomène de diauxie qui nous donne les résultats les plus intéressants. En effet, ils démontrent que chez la souche de type sauvage, l'enzyme B n'est pas fonctionnelle "in vivo" pour l'hydrolyse du lactose. Le mutant 2011 L⁻i dérive par mutation simple de cette souche, il a perdu l'activité enzymatique A et chez lui, comme chez la souche de type sauvage, l'enzyme B ne peut servir à utiliser le lactose pour la croissance. Quant à la mutation simple qui donne à partir de la souche 2011 L⁻i le mutant 2011 L⁺i 3, elle consiste à rendre l'enzyme B capable de fonctionner "in vivo" sans que nous ayons pu en déterminer la raison.

Bibliographie

- (1) QUISPÉL A. 1974. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam. North Holland Pub. Co.
- (2) KONDOROSI A., Z. SVAB, G.B. KISS and DIXON R.A. 1977. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. Molec. gen. Genet., 151 : 221-226.
- (3) BECHET M. et GUILLAUME J.B. 1978. Mise en évidence d'ADN extra-chromosomique chez Rhizobium meliloti. Can. J. Microbiol. 24 : 960-966.
- (4) DILWORTH M.J. and PARKER C.A. 1969. Development of the nitrogen-fixing system in legumes. J. Theoret. Biol. 25 : 208-242.
- (5) HOLSTEN R.D., BURNS R.C., HARDY R.W.F. and HEBERT R.R. 1971. Establishment of symbiosis between Rhizobium and plant cells "in vitro". Nature, 232 : 173-176.
- (6) HARDY R.W.F., HOLSTEN R.D., JACKSON E.K. and BURNS R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol., 43 : 1185-1207.
- (7) GIBSON A.H., SCOWCROFT W.R., CHILD J.J. and PAGAN J.D. 1976. Nitrogenase activity in cultured Rhizobium sp. strain 32H1. Nutritional and physical considerations. Arch. Microbiol., 108 : 45-54.

- (8) KURZ W.G.W. and LARUE T.A. 1975. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature*, 256 : 407-409.
- (9) Mc COMB J.A., ELLIOT J. and DILWORTH M.J. 1975. Acetylene reduction by Rhizobium in pure culture. *Nature*, 256 : 409-410.
- (10) PAGAN J.D., CHILD J.J., SCOWCROFT W.R. and GIBSON A.H. 1975. Nitrogen fixation by Rhizobium cultured on a defined medium. *Nature*, 256 : 406-407.
- (11) MAIER R.J. and BRILL W.J. 1976. Ineffective and non-nodulating mutant strain of Rhizobium japonicum. *J. Bacteriol.* 127 : 763-769.
- (12) BEDMAR E.J. and OLIVARES J. 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living Rhizobium meliloti. *Current Microbiology*, 2 : 11-14.
- (13) WILCOCKSON J. and WERNER D. 1978. Nitrogenase activity of Rhizobium japonicum growing on agar surfaces in relation to slime production, growth and survival. *J. Gen. Microbiol.* 108 : 151-160.
- (14) BEDNARSKI M.A. and REPORTER M. 1978. Expression of rhizobial nitrogenase: influence of plant cell-conditioned medium. *Appl. environment. Microbiol.*, 36 : 115-120.
- (15) ZELAZNA-KOWALSKA I. and LORKIEWICZ Z. 1971. Conditions for genetical transformation in Rhizobium meliloti. *Acta microbiol. polon.* 3 : 21-28.

- (16) O'GARA F. and DUNICAN L.K. 1973. Transformation and physical properties of R factor RP4 transferred from Escherichia coli to Rhizobium trifolii. J. Bacteriol., 116 : 1177-1180.
- (17) DUNICAN L.K. and TIERNEY A.B. 1973. Transformation of an R factor from Pseudomonas aeruginosa into Rhizobium trifolii. Molec. gen. Genet. 126 : 187-190.
- (18) DROZANSKA D. and LORKIEWICZ Z. 1978. Genetic transformation in Rhizobium trifolii. Acta microbiol. polon., 27 : 81-88.
- (19) DANDEKAR A.M., VASAVADA H.A. and MODI V.V. 1978. Partial purification of a competence factor from Rhizobium japonicum. Arch. Microbiol., 118 : 253-256.
- (20) PAGE W.J. 1978. Transformation of Azotobacter vinelandii strains unable to fix nitrogen with Rhizobium spp. DNA. Can. J. Microbiol., 24 : 282-288.
- (21) KOWALSKI M. 1967. Transduction by Rhizobium meliloti. Acta microbiol. polon., 16 : 7-12.
- (22) SVAB Z., KONDOROSI A. and OROSZ L. 1978. Specialized transduction of a cystein marker by Rhizobium meliloti phage 16-3. J. Gen. Microbiol., 106 : 321-327.

- (23) BERINGER J.E., BEYNON J.L., BUCHANAN-WOLLASTON A.V. and JOHNSTON A.W.B. 1978. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to Rhizobium. Nature, 276 : 633-634.
- (24) BERINGER J.E. 1974. R factor transfer in Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 84 : 188-198.
- (25) BERINGER J.E. and HOPWOOD D.A. 1976. Chromosomal recombination and mapping in Rhizobium leguminosarum. Nature, 264 : 291-293.
- (26) DOCTOR F. and MODI V.V. 1976. Genetic mapping of leucine and isoleucine-valine loci in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 126 : 997-998.
- (27) DOGRA R.C. and VYAS S.R. 1977. Genetic mapping of pigmented mutants of Rhizobium meliloti. Ind. J. Microbiol., 17 : 79-84.
- (28) JOHNSTON A.W.B. and BERINGER J.E. 1977. Chromosomal recombination between Rhizobium species. Nature, 267 : 611-613.
- (29) KONDOROSI A., KISS G.B., FORRAI T., VINCZE E. and BANFALVI Z. 1977. Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome. Nature, 268 : 525-527.
- (30) MEADE H.M. and SIGNER E.R. 1977. Genetic mapping of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74 : 2076-2078.

- (31) BERINGER J.E., HOGGAN S.A. and JOHNSTON A.W.B. 1978. Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of R plasmid-mediated conjugation. J. Gen. Microbiol., 104 : 201-208.
- (32) JOHNSTON A.W.B., SETCHELL S.M. and BERINGER J.E. 1978. Interspecific crosses between Rhizobium leguminosarum and Rhizobium meliloti, formation of haploid recombinants and of R-primes. J. Gen. Microbiol., 104 : 209-218.
- (33) JOHNSTON A.W.B., BIBB M.J. and BERINGER J.E. 1978. Tryptophan genes in Rhizobium. Their organization and their transfer to other bacterial genera. Molec. gen. Genet., 165 : 323-330.
- (34) DENARIE J. 1969. Une mutation provoquant l'auxotrophie pour l'adénine et la perte du pouvoir fixateur d'azote chez Rhizobium meliloti. C. R. Acad. Sci. 269 : 2464-2466.
- (35) PANKHURST C.E. 1974. Ineffective Rhizobium trifolii examined by immunodiffusion, gel-electrophoresis and electron microscopy. J. Gen. Microbiol., 82 : 405-413.
- (36) BERINGER J.E., JOHNSTON A.W.B. and WELLS B. 1977. The isolation of conditional ineffective mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 98 : 339-343.
- (37) O'GARA F. and SHANMUGAM K.T. 1977. Regulation of nitrogen fixation in Rhizobium spp. Isolation of mutants of Rhizobium trifolii which induce nitrogenase activity. Biochim. biophys. Acta, 500 : 277-290.

- (38) O'GARA F. and SHANMUGAM K.T. 1978. Mutant strains of clover Rhizobium (Rhizobium trifolii) that form nodules on soybean (Glycine max). Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 75 : 2343-2347.
- (39) MAIER R.J. and BRILL W.J. 1978. Mutant strains of Rhizobium japonicum with increased ability to fix nitrogen for soybean. Science, 201 : 448-450.
- (40) HIGASHI S. 1967. Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor. J. Gen. Appl. Microbiol., 13 : 391-403.
- (41) BISHOP P.E., DAZZO F.B., APPELBAUM E.R., MAIER R.J. and BRILL W.J. 1977. Intergeneric transfer of genes involved in the Rhizobium-legume symbiosis. Science, 198 : 938-940.
- (42) SKOTNICKI M.L. and ROLFE B.G. 1978. Transfer of nitrogen fixation genes from a bacterium with the characteristics of both Rhizobium and Agrobacterium. J. Bacteriol., 133 : 518-526.
- (43) MAIER R.J., BISHOP P.E. and BRILL W.J. 1978. Transfer from Rhizobium japonicum to Azotobacter vinelandii of genes required for nodulation. J. Bacteriol., 134 : 1199-1201.
- (44) JOHNSTON A.W.B., BEYNON J.L., BUCHANAN-WOLLASTON A.V., SETCHELL S.M., HIRSCH P.R. and BERINGER J.E. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. Nature, 276 : 634-636.

- (45) KONDOROSI A., BARABAS I., SVAB Z., OROSZ L., SIK T. and HOTCHKISS R.D. 1973. Evidence for common genetic determinants of nitrogenase and nitrate reductase in Rhizobium meliloti. Nature new Biol., 246 : 153-154.
- (46) BROWN C.M. and DILWORTH M.J. 1975. Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol., 86 : 39-48.
- (47) O'GARA F. and SHANMUGAM K.T. 1976. Regulation of nitrogen fixation by rhizobia. Export of fixed N_2 as NH_4^+ . Biochim. biophys. Acta, 437 : 313-321.
- (48) BISHOP P.E., GUEVARA J.G., ENGELKE J.A. and EVANS H.J. 1976. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between Rhizobium japonicum and Glycine max. Plant Physiol., 57 : 542-546.
- (49) LUDWIG R.A. and SIGNER E.R. 1977. Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in Rhizobium. Nature, 267 : 245-248.
- (50) BISSELING T., VAN DEN BOS R.C., VAN KAMMEN A., VAN DEN PLOEG M., VAN DUIJN P. and HOUWERS A. 1977. Cytofluorometrical determination of the DNA contents of bacteroids and corresponding broth-cultured Rhizobium bacteria. J. Gen. Microbiol., 101 : 79-84.
- (51) PAAU A.S., LEE D. and COWLES J.R. 1977. Comparison of nucleic acid content in population of free-living and symbiotic Rhizobium meliloti by flow-microfluorometry. J. Bacteriol., 129 : 1156-1158.

- (52) REIJNDERS L., VISSER L., ALBERS A.M.J., VAN KAMMEN A. and HOUWERS A. 1975. A comparison of DNA from free-living and endosymbiotic Rhizobium leguminosarum (strain PRE). Biochim. biophys. Acta, 414 : 206-216.
- (53) JACOB F. and MONOD J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3 : 318-356.
- (54) MONOD J. 1970. Le hasard et la nécessité. p88. Editions du Seuil. Paris.
- (55) ZIPSER D. 1963. A study of the urea-produced subunits of β -galactosidase. J. Mol. Biol., 7 : 113-121.
- (56) CRAVEN G.R., STEERS E.Jr. and ANFINSEN C.B. 1965. Purification, composition and molecular weight of the β -galactosidase of Escherichia coli. K12. J. Biol. Chem., 240 : 2468-2477.
- (57) ULLMANN A., JACOB F. and MONOD J. 1968. On the subunit structure of wild-type versus complemented β -galactosidase of Escherichia coli. J. Mol. Biol., 32 : 1-13.
- (58) FOWLER A.V. and ZABIN I. 1977. The amino acid sequence of β -galactosidase of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74 : 1507-1510.
- (59) YON J.M. 1976. Spécificité dynamique en biologie. Biochimie, 58 : 61-69.

- (60) JOBE A. and BOURGEOIS S. 1972. lac repressor-operator interaction. VI. The natural inducer of the lac operon. J. Mol. Biol., 69 : 397-408.
- (61) RICKENBERG H.W., COHEN G.N., BUTTIN G. et MONOD J. 1956. La galactoside perméase d'Escherichia coli. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 91 : 829-857.
- (62) KENNEDY E.P. 1970. The lactose permease system of Escherichia coli. In "The lactose operon", BECKWITH J.R. and ZIPSER D., eds. pp49-92. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York.
- (63) KEPES A. 1978. La perméase à lactose. Dans "Aspects moléculaires des fonctions membranaires" pp114-150. MASSON éd. Paris.
- (64) ANDREWS K.J. and LIN E.C.C. 1976. Thiogalactoside transacetylase of the lactose operon as an enzyme for detoxification. J. Bacteriol., 128 : 510-513.
- (65) PERLMAN R. and PASTAN I. 1968. Cyclic 3'5'-AMP : stimulation of β -galactosidase and tryptophanase induction in Escherichia coli. Biochem. biophys. Res. Commun., 30 : 656-664.
- (66) WARREN R.A.J. 1972. Lactose-utilizing mutants of lac deletion strains of Escherichia coli. Can. J. Microbiol., 18 : 1439-1444.
- (67) CAMPBELL J.H., LENGYEL J.A. and LANGRIDGE J. 1973. Evolution of a second gene for β -galactosidase in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 70 : 1841-1845.

- (68) HARTL D.L. and HALL B.G. 1974. Second naturally occurring β -galactosidase in Escherichia coli. *Nature*, 248 : 152-153.
- (69) ARRAJ J.A. and CAMPBELL J.H. 1975. Isolation and characterization of the newly evolved ebg β -galactosidase of Escherichia coli K12. *J. Bacteriol.*, 124 : 849-856.
- (70) HALL B.G. 1976. Experimental evolution of a new enzymatic function. I. Kinetic analysis of the ancestral (ebg^o) and evolved (ebg⁺) enzymes. *J. Mol. Biol.*, 107 : 71-84.
- (71) HALL B.G. and HARTL D.L. 1974. Regulation of newly evolved enzymes. I. Selection of a novel lactase regulated by lactose in Escherichia coli. *Genetics*, 76 : 391-400.
- (72) HALL B.G. and HARTL D.L. 1975. Regulation of newly evolved enzymes. II. The ebg repressor. *Genetics*, 81 : 427-435.
- (73) HALL B.G. 1977. Number of mutations required to evolve a new lactase function in Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 129 : 540-543.
- (74) HALL B.G. and CLARKE N.D. 1977. Regulation of newly evolved enzymes. III. Evolution of the ebg repressor during selection for enhanced lactase activity. *Genetics*, 85 : 193-201.
- (75) HALL B.G. 1976. Methyl galactosidase activity : an alternative evolutionary destination for the ebgA^o gene. *J. Bacteriol.*, 126 : 536-538.

- (76) HALL B.G. 1978. Experimental evolution of a new enzymatic function. II. Evolution of multiple functions for *ebg* enzyme in Escherichia coli. *Genetics*, 89 : 453-465.
- (77) HALL B.G. 1978. Regulation of newly evolved enzymes. IV. Directed evolution of the *ebg* repressor. *Genetics*, 90 : 673-681.
- (78) HALL B.G. and REEVE E.C.R. 1977. A third β -galactosidase in a strain of Klebsiella that possesses two *lac* genes. *J. Bacteriol.*, 132 : 219-223.
- (79) HIDALGO C., REYES J. and GOLDSCHMIDT R. 1977. Induction and general properties of β -galactosidase and β -galactoside permease in Pseudomonas BAL-31. *J. Bacteriol.*, 129 : 821-829.
- (80) HASAN N. and DURR I.F. 1974. Production of β -galactosidase in Lactobacillus plantarum. *J. Bacteriol.*, 120 : 66-73.
- (81) DELATTRE J.M. 1971. Introduction à une étude génétique du genre Rhizobium. Thèse de docteur ingénieur, Université de Lille I.
- (82) BERNAERTS M.J. and DE LEY J. 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature*, 197 : 406-407.
- (83) GAUR Y.D., SEN A.N. and SUBBA RAO N.S. 1973. Usefulness and limitation of ketolactose test to distinguish agrobacteria from rhizobia. *Curr. Sci.* 42 : 545-546.

- (84) GAUR Y.D. and MARECKOVA H. 1977. Absence of 3-ketolactose production by Rhizobium phaseoli. Folia Microbiol., 22 : 311-312.
- (85) UCKER D.S. and SIGNER E.R. 1978. Catabolite-repression-like phenomenon in Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 136 : 1197-1200.
- (86) UCKER D.S. 1977. Physiological and genetic studies of the symbiotic nitrogen fixing bacterium Rhizobium meliloti. Thesis. Massachussets Institute of Technology.
- (87) KEELE B.B.Jr., HAMILTON P.B. and ELKAN G.H. 1969. Glucose catabolism in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 97 : 1184-1191.
- (88) KEELE B.B., HAMILTON P.B. and ELKAN G.H. 1970. Gluconate catabolism in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 101 : 698-704.
- (89) MARTINEZ de DRETS G. and ARIAS A. 1970. Metabolism of some polyols by Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 103 : 97-103.
- (90) MARTINEZ de DRETS G. and ARIAS A. 1972. Enzymatic basis for differentiation of Rhizobium into fast- and slow-growing groups. J. Bacteriol., 109 : 467-470.
- (91) PEDROSA F.O. and ZANCAN G.T. 1974. Arabinose metabolism in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 113 : 336-338.

- (92) ARIAS A. and MARTINEZ de DRETS G. 1976. Glycerol metabolism in Rhizobium. Can. J. Microbiol., 22 : 150-153.
- (93) HORNEZ J.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C. 1976. Mise en évidence de voies de métabolisme différentes à partir du glucose et du fructose chez Rhizobium meliloti. C. Rend. Acad. Sci., Série D, 283 : 1559-1562.
- (94) MULONGOY K. and ELKAN G.H. 1977. Glucose catabolism in two derivatives of a Rhizobium japonicum strain, differing in nitrogen-fixing efficiency. J. Bacteriol., 131 : 179-187.
- (95) ARIAS A., CERVENANSKY C., GARDIOL A. and MARTINEZ de DRETS G. 1979. Phosphoglucose isomerase mutant of Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 137 : 409-414.
- (96) NIEL C., GUILLAUME J.B. et BECHET M. 1977. Mise en évidence de deux enzymes présentant une activité β -galactosidase chez Rhizobium meliloti. Can J. Microbiol., 23 : 1178-1181.
- (97) NIEL C., DELMAERE F. and GUILLAUME J.B. An inducible β -galactosidase and a β -glucosidase with β -galactosidase activity in Rhizobium meliloti. J. Gen. Microbiol., soumis pour publication.
- (98) NIEL C. 1975. Etude de la mutagenèse chez Rhizobium meliloti. Diplôme d'Etudes Approfondies de Biochimie. Université de Lille I.

- (99) BONNIER C. et BRAKEL J. 1969. Lutte biologique contre la faim. Presses Agronomiques de Gembloux, Belgique. ASBL éd. Duculot S.A.
- (100) DAHLQVIST A. 1964. Method for assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem., 7 : 18-25.
- (101) JOTTARD A. 1978. Etude biochimique de deux enzymes à activité β -galactosidasique chez Rhizobium meliloti. Mémoire de fin d'études d'ingénieur industriel, Anderlecht, Belgique.
- (102) DIXON M. and WEBBS E.C. 1964. In "Enzymes", second edition, p.85. London. Edited by Longmans, Green and Co. Ltd.
- (103) DELMAERE F. 1977. Etude des activités β -galactosidasiques chez Rhizobium meliloti. Diplôme d'Etudes Approfondies de Biochimie. Université de Lille I.
- (104) JOTTARD A. 1977. Etude des activités β -galactosidasiques et lactasiques de deux mutants de Rhizobium meliloti. Mémoire de fin d'études d'ingénieur-technicien chimiste. Institut Supérieur de l'Etat. Izel-sur-Semois, Belgique.
- (105) HEYWORTH R. and WALKER P.G. 1962. Almond emulsin β -D-glucosidase and β -D-galactosidase. Biochem. J., 83 : 331-335.
- (106) CONCHIE J., GELMAN A.L. and LEVY G.A. 1967. Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration. The C₄ and C₆ specificity of β -glucosidase and β -galactosidase. Biochem. J., 103 : 609-615.

- (107) LEVY G.A. and Mc ALLAN A. 1963. Mammalian fucosidases. 3. β -D-fucosidase and its relation to β -D-galactosidase. Biochem. J., 87 : 361-367.

