

N° d'ordre : 31

50376
1986
9

50376
1986
9

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

THÈSE

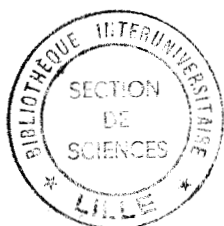
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

PANAYOTIS THEODOROPOULOS

LE TRANSPORT DU GLUCOSE ET SA REGULATION CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI*



Présentée le 26 Février 1986 devant le Jury composé de :

Président :	J.B.	GUILLAUME, Professeur
Rapporteurs :	C.	BURSTEIN, Professeur
	J.C.	DERIEUX, Professeur
Examineurs :	C.	BONNIER, Professeur
	A.	VERBERT, Professeur

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Monsieur le Professeur J.B. GUILLAUME. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir permis, par ses précieux conseils, de réaliser ce travail.

Toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX pour m'avoir intégré dans son équipe, avoir suivi nos travaux avec intérêt et pour être rapporteur de cette thèse.

Que Monsieur le Professeur C. BURSTEIN soit assuré de ma reconnaissance pour sa participation à l'élaboration de ces travaux et de ce mémoire et de me faire l'honneur d'être rapporteur de ce travail.

Toute ma gratitude à l'ensemble des Membres du Jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur J.P. HORNEZ pour son excellente collaboration et disponibilité, ainsi que pour son aide et conseils, tant scientifiques que personnels, que j'ai beaucoup appréciés.

Je remercie très sincèrement :

- Monsieur A. DANCHIN et Madame N. GUISSO, de l'Institut Pasteur Paris, d'avoir collaboré à ces travaux avec beaucoup de gentillesse
- Monsieur R. CACAN pour son accueil sympathique et ses nombreux conseils
- Mademoiselle F. GAVINI de m'avoir permis d'utiliser le biophotomètre
- Monsieur Y. KARAMANOS de son aide et ses conseils techniques
- L'ensemble du personnel du Laboratoire et en particulier Messieurs A. DECQ et M. BECHET

- Madame F. ROUSSEZ de s'être chargée de la dactylographie de ce mémoire.

Je tiens enfin à exprimer ma profonde reconnaissance à toute ma famille pour son soutien financier et moral tout au long de mes études.

ABREVIATIONS

AMPc	: Adénosine 3'-5' Monophosphate cyclique
ATFA	: Acide Trifluoro Acétique
C.C.C.P.	: Carbonyl Cyanurée-m-Chlorophénylhydrazone
CRP	: Cyclic AMP receptor protein
2 DG	: 2-désoxy-glucose
D.O.	: Densité optique
EDTA	: Ethylène Diamine Tétracétique Acide
α MeG	: α -méthyl-D-glucoside
NaN ₃	: Azide de sodium
NEM	: N-Ethyl Maléimide
nm	: nanomètres
PEP	: Phospho enolpyruvate
PTS	: Système phosphotransferase
Po	: Produits à l'origine
TCA	: Acide Trichloroacétique
TMG	: Thio Méthyl Galactoside
TNP	: Tampon de Non Prolifération

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS	1
GENERALITES	3
I - PRESENTATION DU GENRE <u>RHIZOBIUM</u> ET DE LA SYMBIOSE	3
1.1. Le genre <u>Rhizobium</u>	3
1.2. La symbiose	3
II - LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE EXTERNE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF	5
2.1. Les canaux de diffusion non spécifique : les porines	6
2.2. Les canaux de diffusion spécifique	8
2.2.1. Exemple du maltose et dérivés	8
2.2.2. Exemple du glucose	8
2.3. Conclusion	9
III - LE TRANSPORT DES HYDRATES DE CARBONE A TRAVERS LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE ET SA REGULATION	9
3.1. La diffusion facilitée	9
3.2. Le transport actif	11
3.2.1. Les systèmes à transporteur mobile	11

3.2.1.1. La lactose perméase	11
3.2.1.2. La mélibiose perméase	14
3.2.2. Les systèmes à protéine périplasmique	15
3.2.3. Les systèmes phosphotransférases (PTS)	18
3.2.3.1. Le fonctionnement du système PTS	18
3.2.3.2. La distribution du PTS chez les bactéries	19
3.3. La régulation des systèmes perméasiques	21
3.3.1. Les "effets glucose"	21
3.3.1.1. La répression catabolique	22
3.3.1.2. La relation entre répression catabolique et exclusion d'inducteur	23
3.3.2. L'inhibition des systèmes de transport non-PTS par le système PTS	27
IV - LE TRANSPORT ET SA REGULATION CHEZ <u>RHIZOBIUM</u>	30
4.1. Le transport des hexoses	30
4.1.1. Le transport des hexoses chez les cellules libres de <u>Rhizobium</u>	30
4.1.1.1. L'énergisation du transport	30
4.1.1.2. Caractère inductible ou constitutif de ces systèmes	32

4.1.1.3. La spécificité de ces systèmes	33
4.1.1.4. La régulation de ces systèmes	34
4.1.2. Le transport des hexoses chez les bactéroïdes	35
4.2. Le transport du succinate et du malate	37
4.3. Conclusion	40
MATERIELS ET METHODES	42
I - SOUCHE BACTERIENNE	42
II - TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE	42
2.1. Milieu RHB ₁	42
2.2. Milieu complet RC	42
2.3. Tampon de non prolifération (TNP)	43
III - CONDITIONS DE CULTURE	43
3.1. Cultures sur table d'agitation rotative	43
3.2. Cultures en biophotomètre	43
3.2.1. Préparation de l'inoculum	43
3.2.2. Cultures	44

3.3. Cultures en fermenteur	44
3.3.1. Description du matériel	44
3.3.2. Protocole d'ensemencement du fermenteur	46
3.3.2.1. Réalisation d'une pré-culture	46
3.3.2.2. Ensemencement du fermenteur	46
3.3.3. Conditions de culture	47
IV - METHODES DE DOSAGE	47
4.1. Dosage du glucose	47
4.2. Dosage de protéines	47
V - ETUDE DES ECHANGES CELLULAIRES A TRAVERS LA MEMBRANE PLASMIQUE	48
5.1. Préparation des cellules pour des essais d'accumulation	48
5.2. Les produits radiomarqués	48
5.3. Accumulation des substrats	48
5.3.1. Technique d'accumulation	49
5.3.2. Expression des résultats	49
5.4. Efflux des produits accumulés	49

VI - ETUDE DE LA NATURE DES PRODUITS ACCUMULES	50
6.1. Extraction du matériel accumulé	50
6.2. Techniques de chromatographie et d'électrophorèse	50
6.2.1. Chromatographie sur papier	50
6.2.2. Chromatographie sur couche mince	50
6.2.3. Electrophorèse sur papier	51
6.3. Hydrolyse acide	51
RESULTATS ET DISCUSSION	52
I - MISE EN EVIDENCE D'UN TRANSPORT ACTIF DU GLUCOSE CHEZ <u>R. MELILOTI</u> M_5N_1	52
1.1. Cinétiques d'accumulation du glucose, α -méthyl glucose et 2-désoxy glucose	52
1.2. Effet du chloramphénicol sur l'accumulation du glucose	52
1.3. Nature du "pool" accumulé	54
1.4. Action des inhibiteurs métaboliques	57
1.5. Effet du pH sur l'accumulation	63
1.6. Stabilité de la perméase au chauffage	63

1.7. Etude de la nature "enzymatique" du système de transport	66
1.7.1. Détermination d'une concentration cellulaire optimale	66
1.7.2. Détermination des paramètres cinétiques du système	67
II - DEVENIR DU GLUCOSE ACCUMULE	67
2.1. Mise en évidence des plateaux de fin d'accumulation	67
2.2. Action de l'azide de sodium au cours de l'accumulation	71
2.3. Efflux des produits intracellulaires après une accumulation du glucose, du 2-désoxy-glucose et de l' α -méthyl-glucose	71
2.4. Analyse du matériel accumulé	74
2.4.1. Cinétiques d'accumulation	74
2.4.2. Analyse des extraits obtenus	79
III - SPECIFICITE ET REGULATION DU SYSTEME PERMEASIQUE	90
3.1. Spécificité du système perméasique	90
3.2. Etude de l'induction du système	92
3.3. Etude de la répression du système	95
3.3.1. Mise en évidence d'une courbe de croissance diauxique	95
3.3.2. Contrôle de l'activité enzymatique lors de la diauxie	96

3.3.2.1. Conception d'une méthode permettant de suivre la diauxie en fermenteur	96
3.3.2.2. Exploitation de la méthode	101
3.3.3. Effet de l'AMPc	104
3.3.4. Comportement d'autres substrats lors des cultures avec du glucose	104
CONCLUSION GENERALE	107
ANNEXES	110
BIBLIOGRAPHIE	115

AVANT - PROPOS

L'association symbiotique des bactéries du genre Rhizobium avec les plantes de la famille des Légumineuses se traduit par la fixation de l'azote atmosphérique comme source azotée pour la croissance. Lors de cette association, l'échange des nutriments entre les deux symbiontes est d'une importance capitale pour le développement et le maintien de la fixation de l'azote.

Les hexoses sont les hydrates de carbone les plus abondants dans les nodules (Antoniw et Sprent, 1978), mais leur rôle dans l'établissement de l'efficacité (c'est-à-dire la réduction de l'azote atmosphérique) n'est pas clairement défini.

En effet, des mutants de Rhizobium trifolii (Ronson et Primrose, 1979a) et Rhizobium leguminosarum (Glenn et coll., 1984b), incapables d'utiliser le glucose et le fructose, induisent la formation des nodules efficaces, alors que ceux formés par un mutant fructokinase négatif de Rhizobium meliloti (Duncan, 1981) sont inefficaces.

D'autre part, l'accumulation des hexoses tels que le glucose et le fructose, ne semble pas avoir lieu activement chez les bactéroïdes in vitro (De Vries et coll., 1982 ; Hooymans et Logman, 1984), mais il est concevable que leur diffusion passive puisse être suffisante pour fournir des hydrates de carbone essentiels au maintien et au fonctionnement de ces cellules (Mc Kay et coll., 1985).

Dans notre laboratoire, nous étudions particulièrement le métabolisme énergétique et hydrocarboné de ces bactéries du sol à l'état libre, afin de mieux comprendre leur fonctionnement lors de la symbiose.

Nous avons montré que Rhizobium synthétise d'importantes quantités d'exopolysaccharides (Courtois, 1984). Certains auteurs (Dazzo, 1980 ; Graham, 1981) attribuent à ces macromolécules un rôle éventuel dans le mécanisme de reconnaissance bactérie - plante. Cependant, une étude récente dans notre laboratoire (Nicolaidis - Struzyk, 1985) a montré que, pour certains couples légumineuse - bactérie, l'intervention des exopolysaccharides est mineure voire même nulle.

La croissance des Rhizobia peut avoir lieu en présence de substrats carbonés variables (Graham, 1969). Lorsque Rhizobium meliloti est cultivé en présence de fructose, beaucoup d'exopolysaccharides sont synthétisés et le pH du milieu reste constant. Par contre, en présence de glucose, il y a peu de polysaccharides synthétisés, le pH diminue rapidement (Hornez et coll., 1976) et, plus la concentration en glucose est élevée, plus il y a accumulation d'acide 2-cétogluconique (Derieux et coll., 1983). Les conditions d'aération des milieux sont également importantes (Hornez et coll., 1982) : l'acide organique ne s'accumule qu'en condition de limitation en oxygène.

On a montré (Remy, 1980) que la production de cet acide est effectuée à partir du glucose par un système enzymatique à deux deshydrogenases situées au niveau de la membrane bactérienne.

Au vu de ces travaux, il semble que la différence d'utilisation du glucose et du fructose pourrait se situer au niveau de leur vitesse de pénétration à l'intérieur du cytoplasme.

Enfin, la présence de quantités importantes d'hexoses dans les nodules et leur rôle apparemment essentiel lors de la symbiose nous ont amenés à étudier le transport du glucose et sa régulation chez les cellules libres de Rhizobium meliloti.

GENERALITES

I - PRESENTATION DU GENRE RHIZOBIUM ET DE LA SYMBIOSE

1.1. Le genre Rhizobium

Le genre Rhizobium regroupe l'ensemble des bactéries capables d'induire la formation de nodules morphologiquement bien distincts, sur les racines des plantes de la famille des Légumineuses.

Les Rhizobia sont des bacilles à Gram négatif qui contiennent souvent un nombre important de granules de poly- β -hydroxybutyrate.

Le genre est divisé en deux catégories d'espèces :

- les espèces à croissance rapide qui ont un temps de génération variant de 2 à 4 heures.
- les espèces à croissance lente qui ont un temps de génération de 6 à 8 heures.

Chaque espèce est définie par rapport à un ensemble de Légumineuses qu'elle infecte spécifiquement et avec lequel elle entretient des relations symbiotiques se traduisant par la fixation de l'azote atmosphérique (tableau 1).

1.2. La symbiose

Le phénomène de la symbiose se caractérise par différentes étapes qui conduisent à un nodule efficient.

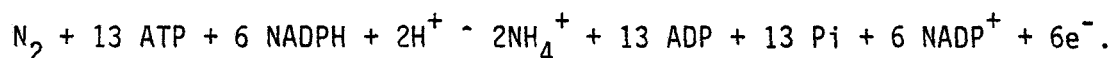
Dans un premier temps, les Rhizobia s'attachent aux poils radiculaires et forment, par la suite, un cordon infectieux qui progresse dans le poil radiculaire en se ramifiant. Le cordon infectieux pénètre alors dans les cellules végétales où il se désagrège en libérant les bactéries. Les cellules de Rhizobium se différencient en "bactéroïdes" : elles adoptent une morphologie très variable (pleiomorphe) et très différente de la forme bacillaire qu'elles

Tableau 1 : Taxonomie du genre *Rhizobium*

! Croissance !	! Genre !	! Espèce !	! Groupe d'inoculation !
! lente !	! <i>Rhizobium</i> !	! Japonicum !	! Soja !
! " !	! " !	! lupini !	! Lupin !
! " !	! " !	! du "Cowpea-group" !	! Cowpea !
! rapide !	! " !	! leguminosarum !	! Pois !
! " !	! " !	! meliloti !	! Luzerne !
! " !	! " !	! phaseoli !	! Haricot !
! " !	! " !	! trifolii !	! Trèfle !

possèdent habituellement. Elles sont capables par ailleurs de fixer l'azote atmosphérique.

D'une manière générale, *Rhizobium* ne fixe l'azote in vivo que sous la forme bactéroïde grâce à l'activité d'une enzyme particulière, la nitrogénase. La réduction de l'azote en ammonium peut se résumer comme suit :



Cette réaction nécessite 355 KJ/ion ammonium formé. La nitrogenase est très rapidement inactivée par l'oxygène et son fonctionnement n'est possible que grâce à la régulation par la

l'églobine de la tension en oxygène au niveau des sites de fixation.

Une partie de l'ammonium produit est utilisée pour la croissance et le maintien du fonctionnement des bactéroïdes, la plus grande proportion est exportée dans le cytosol de la plante hôte.

II - LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE EXTERNE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF

La paroi des bactéries à Gram négatif est constituée d'une couche de muréine et d'une couche supplémentaire située à l'extérieur de celle-ci, la membrane externe (figure 1).

Cette membrane, vue en microscopie électronique, a une structure bilamellaire et elle joue un rôle très important dans la physiologie de ces bactéries. En effet, elle confère une résistance à différents agents comme le lysozyme et elle permet l'entrée plus ou moins spécifique des nutriments et l'efflux des produits biosynthétiques.

Il existe deux types de diffusion à travers la membrane externe :

- la diffusion non spécifique,
- la diffusion spécifique.

Tous les deux sont effectués par l'intermédiaire des protéines, dont l'arrangement spatial forme des pores ou canaux :

- certains sont responsables de la perméabilité non sélective de petites molécules hydrophiles,

- d'autres sont responsables de la perméabilité sélective (diffusion spécifique) des substances telles que le maltose et les maltodextrines, les nucléosides et la vitamine B₁₂.

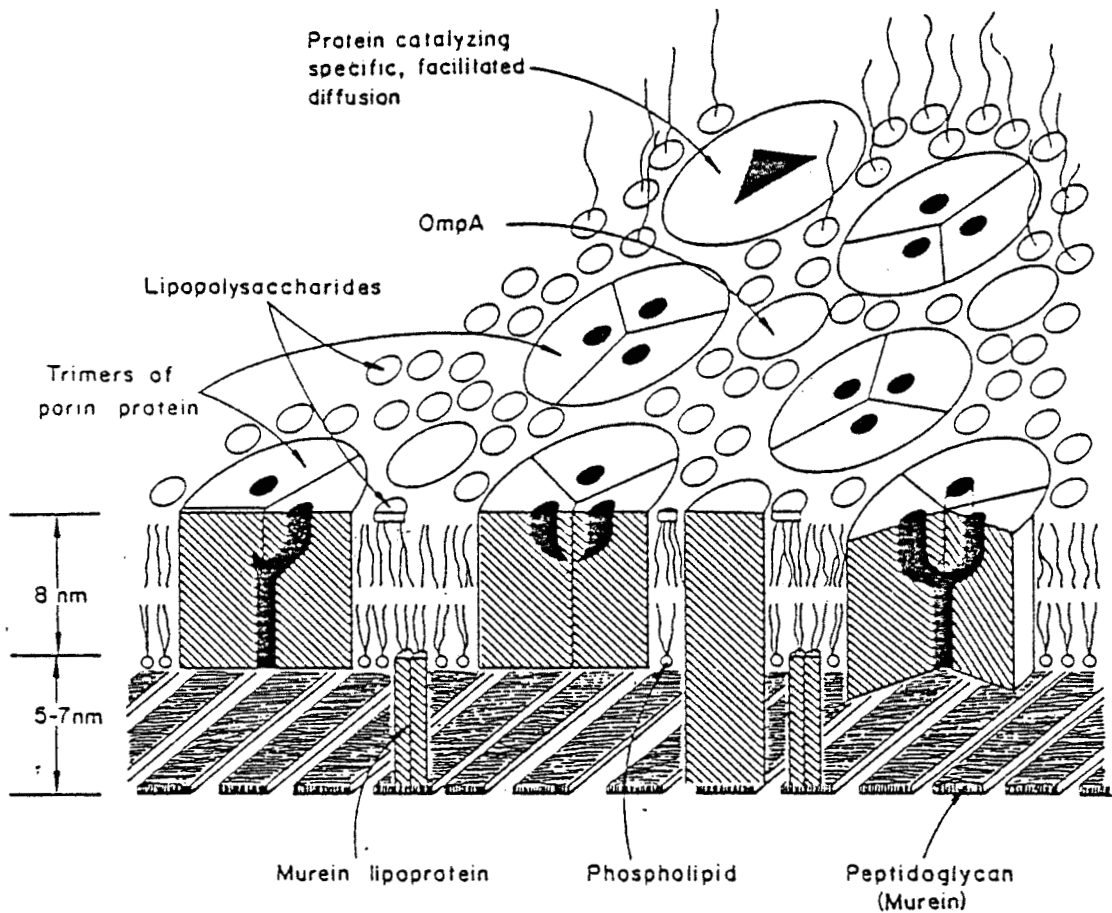


Figure 1 : Modèle schématique de la membrane externe d'Escherichia coli et Salmonella typhimurium (d'après Nikaido et Vaara, 1985)

OmpA : outer membrane protein A

2.1. Les canaux de diffusion non spécifique : les porines

Les protéines qui sont codées par les gènes OmpF, OmpC et PhoE d'Escherichia coli ont été appelées porines car leur arrangement conduit à la mise en place de pores non spécifiques qui permettent le passage à travers la membrane externe de petites molécules hydrophiles de dimension inférieure à 600 daltons (Decad et Nikaido, 1976 ; Nakae et Nikaido, 1975).

Il a été démontré, en utilisant la microscopie électronique et la reconstitution d'images, que les trois canaux situés au niveau de la surface externe, que l'on observe sur le dessin de la figure 1, émergent en un canal unique au niveau de l'espace périplasmique (Engel et coll., 1985).

Récemment, Alves et coll. (1985) ont abordé l'étude du rôle de la membrane externe sur le transport de peptides en étudiant les paramètres cinétiques de celui-ci chez des cellules sauvages et chez des mutants d'E. coli déficients en protéines de la membrane externe. Ils ont observé que les porines interviennent en facilitant la diffusion des divers peptides et que la protéine OmpF joue un rôle plus important que les protéines OmpC ou PhoE lors de ce transport.

Le fonctionnement de ces canaux est lié à la présence, d'une part, des lipopolysaccharides (L.P.S.) et, d'autre part, des protéines périplasmiques. Ces dernières sont situées dans l'espace périplasmique délimité par la membrane cytoplasmique et la paroi. Certaines d'entre elles ont une forte affinité pour un substrat donné et, dans ce cas, elles sont appelées protéines de liaison ou "binding proteins" (B.P.).

En ce qui concerne les L.P.S., divers auteurs (Furukawa et coll., 1979 ; Overbeeke et coll., 1980 ; Schindler et Rosenbusch, 1978) ont remarqué que les porines ont une forte affinité pour ces macromolécules. Celles-ci peuvent jouer de plus un rôle important au niveau de l'ouverture et de la fermeture de ces canaux.

En ce qui concerne les protéines périplasmiques, cette diffusion non spécifique du canal emprunté semble en général favorisée par l'activité de protéine de liaison spécifique d'un substrat et dont la fixation sur la porine réorganise le canal en faveur d'un passage accéléré de ce substrat (Lo et Sanwal, 1975 ; Lo et Bewick, 1981).

2.2. Les canaux de diffusion spécifique

2.2.1. Exemple du maltose et dérivés

Le maltose et les maltodextrines diffusent chez les entérobactéries par un canal formé par la protéine LamB (protéine réceptrice du phage λ) (Nikaido et Vaara, 1985).

Ce canal est appelé aussi "malto porine" car il achemine également d'autres substances comme des amino acides et d'autres hydrates de carbone (Lo et Sanwal, 1975 ; Luckey et Nikaido, 1980). En effet, ce canal LamB laisse diffuser facilement des monosaccharides mais il est plus discriminatoire pour des saccharides de plus en plus grands. Néanmoins, ce canal est complètement spécifique pour les trisaccharides. Par exemple, le maltotriose diffuse 100 fois plus vite que d'autres trisaccharides de structure différente comme le raffinose (Lo et Sanwal, 1975).

Des études du transport des maltodextrines avec des mutants MBP⁻ (maltose "binding protein" déficient) et des expériences de compétition (Overbeeke et coll., 1980) ont montré que l'interaction physique entre la protéine LamB et la MBP joue un rôle important et est nécessaire pour le transport "efficace" des maltodextrines à travers le canal.

2.2.2. Exemple du glucose

Mizumo et Kageyama (1978) ont remarqué que Pseudomonas aeruginosa, cultivé en présence du glucose, produit une protéine D, située au niveau de la membrane externe. L'analyse de cette protéine a montré qu'elle est constituée de deux éléments appelés D₁ et D₂. Seul D₁ permet le passage spécifique du glucose au travers du canal de diffusion qu'il présente (Hancock et Carey, 1980).

2.3. Conclusion

Mis à part le transport du glucose ou de certains trisaccharides, il semble que, d'une façon générale, les différents nutriments et, en particulier, les monosaccharides, atteignent l'espace périplasmique par diffusion passive non spécifique au travers de la membrane externe.

III - LE TRANSPORT DES HYDRATES DE CARBONE A TRAVERS LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE ET SA REGULATION

La membrane cytoplasmique est une barrière sélective qui permet la pénétration sélective de nutriments nécessaires à la cellule.

L'acquisition des nutriments est une fonction primordiale de tous les organismes vivants car la plupart des activités cellulaires sont dirigées à travers celle-ci. Une étape essentielle de cette acquisition est leur transport du milieu extérieur vers le cytoplasme où le métabolisme a lieu.

Les systèmes de transport des hydrates de carbone ont été largement étudiés chez les bactéries, en particulier chez E. coli et Salmonella typhimurium. On en distingue deux types :

- le transport passif ou diffusion facilitée,
- le transport actif.

3.1. La diffusion facilitée

Dans ce cas, le substrat diffuse à travers la membrane cytoplasmique jusqu'à atteindre l'équilibre entre la concentration cytoplasmique et la concentration du milieu extérieur. Ce processus ne nécessite pas l'apport d'énergie.

Le seul hydrate de carbone accumulé par diffusion facilitée et actuellement connu est le glycérol. Son transport et son utilisation ont été décrits chez plusieurs genres bactériens (Lin, 1976).

Son mécanisme est connu : des études effectuées chez *E. coli* (Sanno et coll., 1968 ; Hayashi et Lin, 1965) ont montré que la capture du glycérol est réalisée par une protéine membranaire qui fonctionne en association avec une kinase cytoplasmique (figure 2). Le transporteur du glycérol est induit lors des cultures sur ce substrat et la glycérokinase, qui est la première enzyme de sa dégradation, joue un rôle très important lors du transport. En effet, des mutants qui ne possèdent pas cette enzyme sont incapables d'accumuler le glycérol.

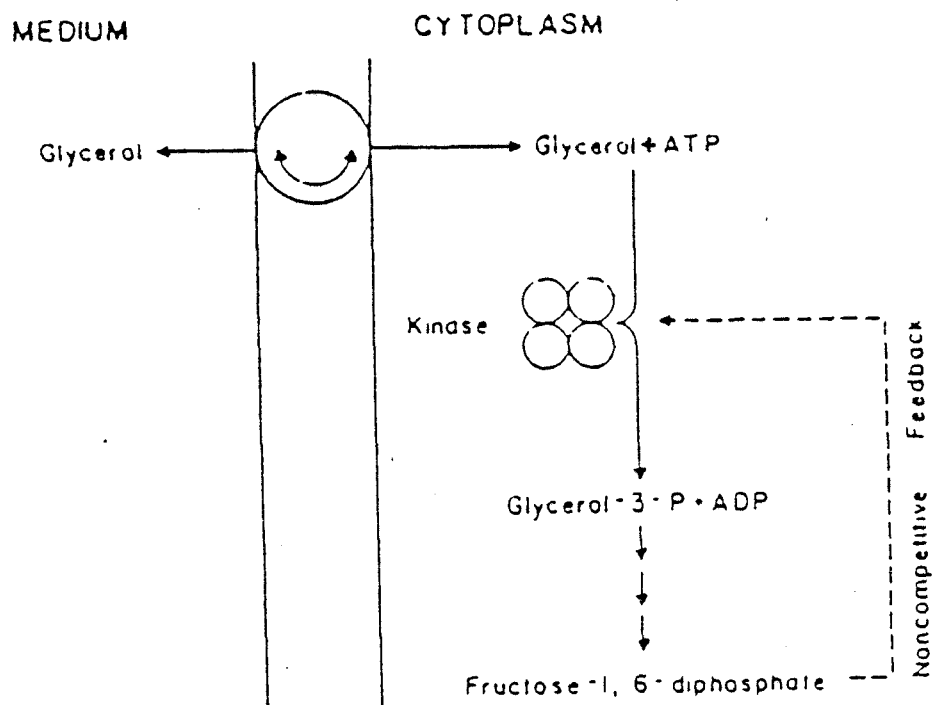


Figure 2 : Le système de transport du glycérol
(d'après Andrews et Lin, 1976)

D'autre part, le k_m de la glycérokinase pour son substrat et le k_m du système de transport pour le glycérol sont très proches, indiquant ainsi que l'accumulation de ce substrat est liée à l'action de la glycérokinase.

3.2. Le transport actif

Ce type de transport est réalisé par des perméases qui sont des macromolécules spécifiques ou des assemblages moléculaires limités et spécialisés dans le transport des métabolites à travers les membranes.

L'étude du mécanisme des transports actifs chez les bactéries n'a pas permis de dégager un principe universel et aucune des perméases étudiées n'est à ce jour pleinement comprise quant à son mécanisme moléculaire.

Exceptée la diffusion facilitée du glycérol, tous les systèmes de transport des hydrates de carbone explorés chez les bactéries effectuent un transport actif contre un gradient de concentration.

On distingue au moins trois grandes classes de mécanismes (Kepes, 1973).

3.2.1. Les systèmes à transporteur mobile

Ces systèmes font appel à une seule et unique protéine membranaire qui est responsable de la reconnaissance et de la translocation des substrats. D'autre part, ces derniers sont accumulés à travers une membrane énergisée par un gradient des protons.

3.2.1.1. La lactose perméase

La lactose perméase fut le premier système de transport décrit et étudié (Cohen et Rickenberg, 1955 ; Rickenberg et coll., 1956), mais elle reste la plus controversée des perméases (Kepes, 1971).

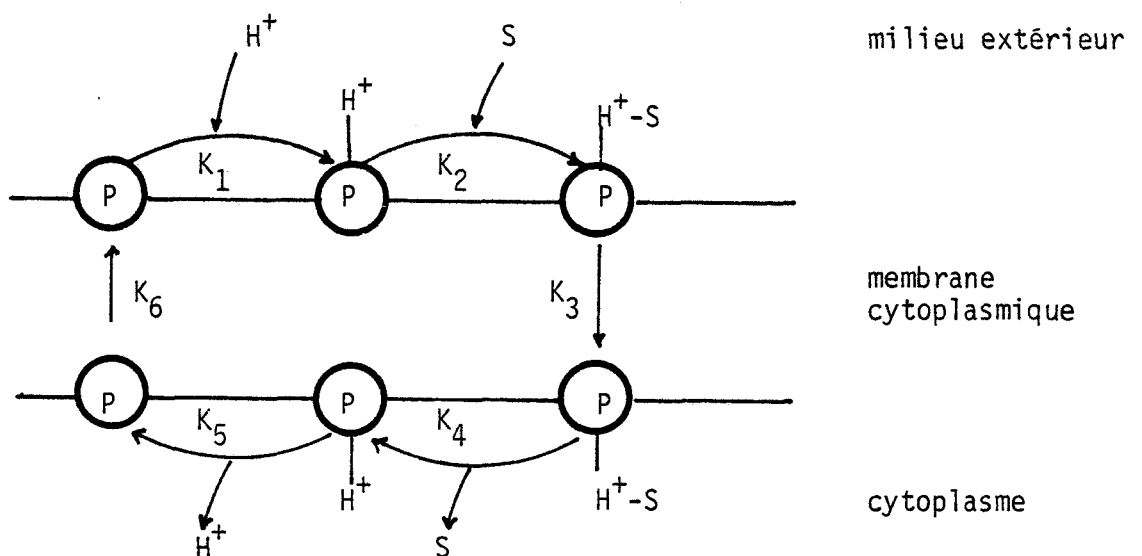
Ce système, qui est composé par une unique protéine membranaire, la protéine M codée par le gène LacY chez E. coli, peut transporter le lactose mais également le mélibiose et des analogues structuraux de ceux-ci.

Cette protéine présente une asymétrie, elle fonctionne différemment en fonction de la disponibilité de l'énergie dans la cellule.

Quand la bactérie est privée d'énergie, la fonction de la protéine M est réduite à celle d'un transport passif du substrat à travers la membrane cytoplasmique.

Dans des conditions énergétiques favorables, résultant de la formation d'un gradient de pH à travers la membrane cellulaire, le substrat s'accumule (Harold, 1972 ; Kaback, 1974) (figure 3). L'affinité de la protéine M pour son substrat est augmentée quand celle-ci est protonée. La perméase ainsi complexée change de conformation et peut présenter, de ce fait, le substrat et le proton au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique, qui sont tous deux relargués dans le cytoplasme.

Les différentes étapes de ce mécanisme peuvent être représentées par l'équation suivante (d'après Page et West, 1984) :



où (P) représente la perméase, H⁺ le proton, S le substrat, en l'occurrence un galactoside.

Pour que le système puisse continuer de fonctionner, il faut que les protons intracellulaires sortent du cytoplasme. Cette sortie est l'évènement premier de ce type de transport et l'accumulation du substrat est un effet secondaire directement lié.

L'efflux des protons du cytoplasme est réalisé activement (Konings et coll., 1984) (figure 3) :

- dans des conditions d'aérobiose il est lié à la fois au système de transport d'électrons et au complexe ATPasique (C. Burstein, communication personnelle),

- dans des conditions d'anaérobiose, il est lié soit à l'activité du complexe ATPasique, soit à l'installation d'un gradient des produits finaux lors de leur excrétion dans le milieu extérieur.

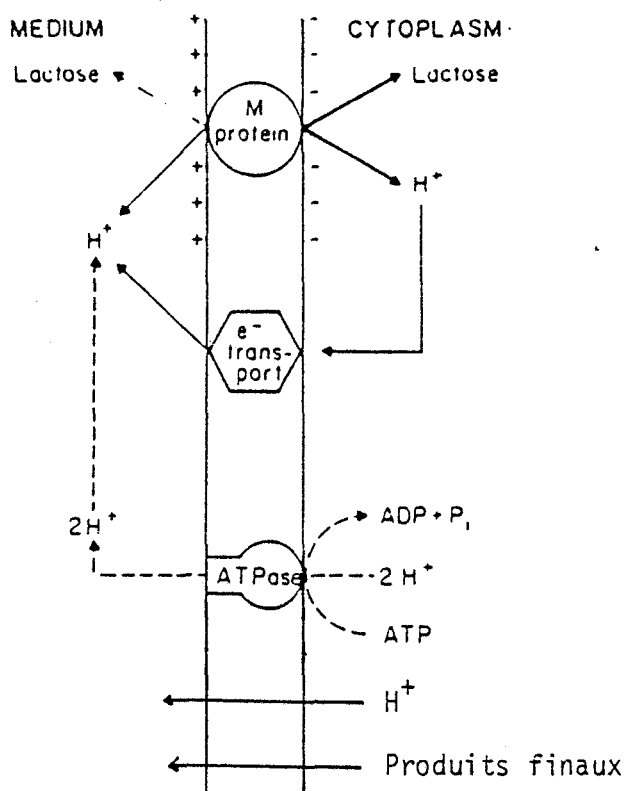


Figure 3 : La lactose perméase

Sachant, d'une part, que l'hydrolyse d'une molécule d'ATP est capable de transférer à travers la membrane cytoplasmique deux protons et, d'autre part, que l'entrée d'une molécule de substrat est accompagnée d'un proton, on déduit que le coût énergétique pour l'accumulation d'une molécule de substrat par ce système de transport est équivalent à la moitié de l'énergie d'une liaison pyrophosphate (Simoni et Roseman, 1973).

Ce processus d'entrée peut être inhibé par trois classes d'inhibiteurs :

- par un substrat compétitif, qui agit en occupant le site de fixation,

- par un découplant énergétique, qui agit en dissipant l'énergie créée par le flux des protons,

- par des agents chimiques complexants tels que le N-éthylmaléimide (NEM). Celui-ci agit directement sur le système de transport du lactose en bloquant les fonctions -SH libres.

3.2.1.2. La mélibiose perméase

La mélibiose perméase est un système de transport inductible décrit pour la première fois chez S. typhimurium (Stock et Roseman, 1971). L'étude de ce système a été entreprise en utilisant le TMG analogue structural non métabolisable du mélibiose, qui est son substrat naturel.

Ce système est distinct de la lactose perméase qui peut également transporter le TMG, par le fait qu'il dépend de la présence d'ions sodium (Na^+) ou lithium (Li^+). En effet, l'accumulation intracellulaire du TMG n'est pas effectuée par couplage avec des protons mais avec celui d'ions Na^+ .

Une étude comparative récente (Burstein et Kepes, 1985) de ces deux systèmes chez E. coli a montré que le système mélibiose perméase

est étroitement dépendant du pH, alors que celui du lactose présente un spectre plus large. Cette étude a également montré que le système d'accumulation du lactose est plus résistant au chauffage que celui du mélibiose.

L'étude de l'effet d'inhibiteurs métaboliques sur le transport du TMG par la mélibiose perméase a permis de définir le mode d'énergisation de celle-ci. Cette étude a été réalisée avec des cellules entières ou des vésicules membranaires d'E. coli ne possédant pas la lactose perméase (Lopilato et coll., 1978). Les auteurs ont observé que l'accumulation est fortement inhibée par le NEM et le CCCP démontrant ainsi que, d'une part la protéine de transport possède à son site actif des groupements -SH et que, d'autre part le transport est énergisé par un gradient de protons. L'iodoacétate, inhibiteur de la voie glycolytique, n'a pas affecté l'accumulation du TMG.

Ces observations démontrent que le gradient des protons joue un rôle très important au niveau de la création du gradient chimique de Na^+ nécessaire au transport du TMG. La sortie des protons du cytoplasme aurait pour rôle de fournir l'énergie nécessaire pour effectuer l'accumulation et l'expulsion des ions sodium. Quant à l'énergie nécessaire pour l'efflux des protons, elle est, au moins en partie, fournie par le système ATPasique (Van Thienen et coll., 1978).

3.2.2. Les systèmes à protéine périplasmique

Ces systèmes de transport font appel à des protéines de liaison (Binding Proteins) porteuses de sites d'affinité pour le substrat transporté (voir 2.1.). Ils sont illustrés par la figure 4.

Lorsque la membrane externe des bactéries à Gram négatif est partiellement désagrégée par des traitements différents, selon les auteurs (Leive, 1965 ; Neu et Heppel, 1965 ; Stinson et coll., 1976), on assiste à une libération des protéines périplasmiques dans le milieu et à une perte de l'activité perméasique. On a pu ainsi mettre en évidence et étudier un bon nombre de tels systèmes accumulant des hydrates de carbone. Le tableau 2 montre la répartition de ceux-ci chez E. coli.

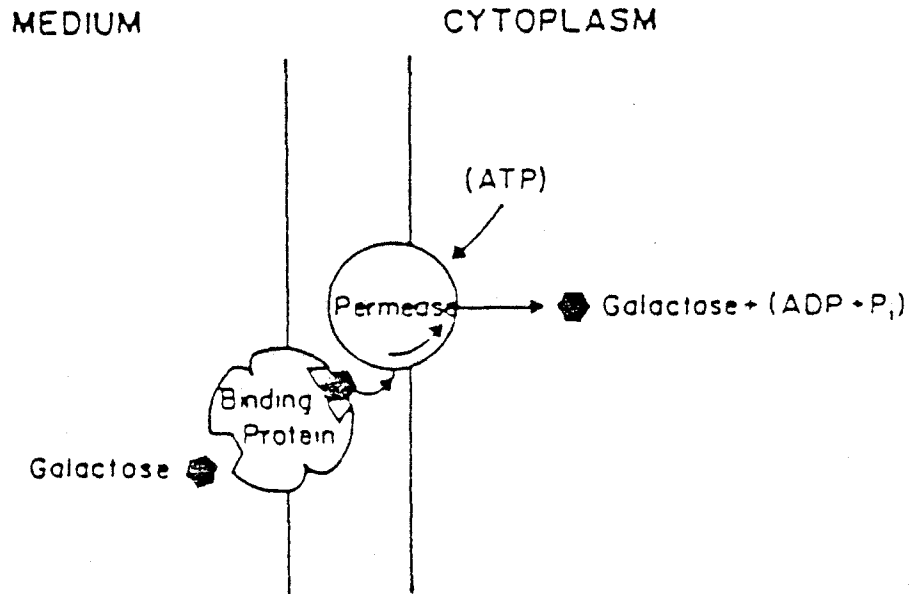


Figure 4 : Les systèmes de transport à protéine périplasmique.

Exemple de la β -méthyl-galactoside perméase

(d'après Andrews et Lin, 1976 modifié)

Des études concernant l'action des divers inhibiteurs métaboliques sur ce type de transport ont permis de cerner son mode d'énergisation.

- Les découplants énergétiques inhibent partiellement l'accumulation de maltose par la maltose perméase (Ferenci et coll., 1977). Cette observation est en défaveur de l'existence d'un système énergisé par flux de protons. Henderson et coll. (1977), étudiant le changement du pH durant le transport des substrats de la β -méthyl galactoside perméase chez E. coli, concluent également que ce système ne fait pas intervenir un flux des protons.

- L'arséniate inhibe fortement le fonctionnement de ces systèmes (Ferenci et coll., 1977 ; Parnes et Boos, 1973), par une réduction importante du "pool" intracellulaire de l'ATP (Klein et Boyer, 1972). Il semble donc que tous les systèmes de transport à protéine périplasmique sont énergisés par l'ATP ou par un composé riche en énergie dont la synthèse dépend de l'ATP.

Tableau 2 : Les systèmes de transport à protéines périplasmiques des hydrates de carbone chez E. coli (d'après Dills et coll., 1980)

! Système	! :	! Substrats	! :	! Locus	! :	! Binding	! :
!	!	!	!	! génétique	!	! protein	!
!	!	!	!	!	!	! (M.M.)	!
! Arabinose	!	! L-Arabinose, D-fucose, D-ga	!	! araE	!	! 38 000	!
!	!	! lactose, β -methyl-L-arabino:	!	!	!	!	!
!	!	! side, D-xylose, β -methyl-D-	!	!	!	!	!
!	!	! galactoside, lactose	!	!	!	!	!
!	!	!	!	!	!	!	!
! Maltose	!	! Maltose, maltotriose et	!	! malB	!	! 37 000	!
!	!	! maltodextrines	!	!	!	!	!
!	!	!	!	!	!	!	!
! Methyl- β -	!	! D-glucose, D-galactose, β -	!	! mglA, mglB,	!	! 35 000	!
! galactose	!	! glycerol-galactoside, L-ara:	!	! mglC	!	!	!
!	!	! binose, 6-deoxy-D-glucose,	!	!	!	!	!
!	!	! D-fucose, β -methylgalacto	!	!	!	!	!
!	!	! side xylose	!	!	!	!	!
!	!	!	!	!	!	!	!
! Ribose	!	! Ribose, ribulose	!	! rbsP	!	! 30 000	!
!	!	!	!	!	!	!	!
! Xylose	!	! Xylose	!	! xylT	!	! ND	!
!	!	!	!	!	!	!	!

ND : Non Déterminé



3.2.3. Les systèmes phosphotransférases (PTS)

3.2.3.1. Le fonctionnement du système PTS

Il s'agit d'un système de transport particulier, puisque le substrat puisé dans le milieu n'apparaît pas tel quel dans le cytoplasme mais apparaît à sa place un produit chimiquement transformé : un hexose phosphate dans l'exemple d'un système hexose PTS (Kundig et coll., 1964).

Le transport des hydrates de carbone PTS et leur phosphorylation nécessite la participation d'un certain nombre d'enzymes solubles et membranaires (figure 5).

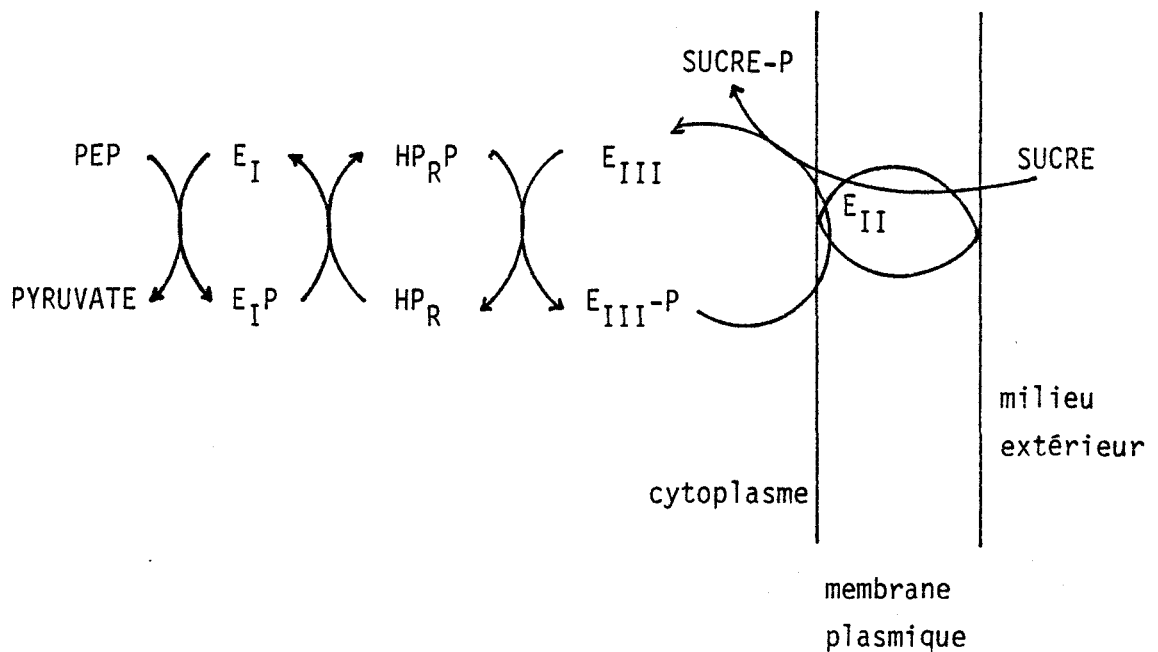


Figure 5 : Le système hexose - PTS chez E. coli et S. typhimurium (d'après Dills et coll., 1980)

Ces protéines catalysent le transfert d'une molécule de phosphate du phosphoénolpyruvate (PEP) à l'hydrate de carbone transporté. Cette réaction nécessite la présence d'ions Mg^{2+} et les produits formés sont le pyruvate et le substrat phosphorylé.

L'initiation du transfert est réalisée par deux protéines solubles qui sont l'enzyme I et une protéine de faible poids moléculaire l'Hpr. Ces constituants du PTS ne sont pas spécifiques de chaque substrat accumulé et ils ont été purifiés et caractérisés chez plusieurs souches bactériennes (Postma et Roseman, 1976).

La seconde étape du transfert est effectuée par les enzymes II et III, qui sont des protéines spécifiques de chaque hydrate de carbone transporté. L'enzyme III est située sur la face interne de la membrane cytoplasmique, tandis que l'enzyme II y est totalement intégrée.

Les résultats obtenus, suite à l'étude de l'inhibition chimique de ce système de transport, sont différents de ceux décrits pour les autres systèmes perméasiques. En effet, les découplants énergétiques stimulent l'accumulation des substrats (Haguenauer et Kepes, 1971 ; Reider et coll., 1979), par contre, le fluorure, inhibiteur dans certaines conditions de la synthèse du PEP, limite ce transport (Haguenauer et Kepes, 1972).

3.2.3.2. La distribution du PTS chez les bactéries

Le transport des hydrates de carbone par le système PTS est un processus très répandu chez les bactéries (tableau 3). D'une façon générale, les bactéries anaérobies possèdent ce système à condition que l'hydrate de carbone accumulé soit métabolisé par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (voie glycolytique). Les hexoses ainsi métabolisés fournissent deux molécules de PEP par molécule d'hexose utilisé.

D'autre part, les bactéries aérobies strictes, en général, ne possèdent pas ce système. En effet, la majorité de ces organismes utilisent les hexoses et les hexitols par la voie d'Entner-Doudoroff

et, de ce fait, génèrent de l'énergie sous forme d'ATP ou de gradient électrochimique de protons. Dès lors, il est plus avantageux, pour ces souches aérobies, d'utiliser directement cette forme d'énergie pour activer leur mécanisme de transport plutôt que de faire appel à d'autres voies métaboliques conduisant à la synthèse de PEP.

Néanmoins, des exceptions existent : certaines espèces de Bacillus et d'Arthrobacter dégradent les hydrates de carbone par voie glycolytique et développent, de ce fait, des systèmes de transport PTS, bien adaptés dans ce cas.

Tableau 3 : Distribution du système de transport PTS chez les procaryotes (d'après Dills et coll., 1980)

Genres	Réaction Gram	Substrats
Rhodopseudomonas	-	Fructose
Rhodospirillum	-	Fructose
Thiocapsa	-	Fructose
Thiocystis	-	Fructose
Ancalomicrobium	-	General
Spirochaeta	-	Mannitol
Pseudomonas	-	Fructose
Alcaligenes	-	Fructose
Beneckea	-	General
Escherichia	-	General
Klebsiella	-	General
Photobacterium	-	General
Salmonella	-	General
Serratia	-	General
Fusobacterium	-	Fructose
Megasphaera	-	Glucose, Fructose
Staphylococcus	+	General
Streptococcus	+	General
Bacillus	+	General
Clostridium	+	Fructose, Mannitol
Brochotrix	+	General
Lactobacillus	+	General
Arthrobacter	+	Fructose, Rhamnose
Mycoplasma		General

3.3. La régulation des systèmes perméasiques

Le bon fonctionnement d'une perméase est indispensable pour l'utilisation optimale d'un hydrate de carbone. En effet, son transport est la première étape de son utilisation. Il est en général assuré par des protéines enzymatiques, qui, comme les autres enzymes, sont régulées génétiquement au niveau de leur synthèse ou chimiquement au niveau de leur fonctionnement.

Deux aspects de régulation sont ici abordés : l'un est commun à l'ensemble des systèmes enzymatiques (effets glucose), l'autre est spécifique de la régulation des perméases autres que les PTS.

3.3.1. Les "effets glucose"

Chez de nombreux genres bactériens, le glucose joue un rôle régulateur métabolique important. En effet, il peut inhiber l'utilisation de divers substrats selon deux mécanismes majeurs :

- la répression catabolique permanente ou transitoire.

* La répression catabolique permanente est un processus de régulation qui consiste à une répression plus ou moins sévère des enzymes cataboliques par le glucose. Dans certains cas, d'autres substrats, rapidement métabolisables, ont le même effet.

* La répression catabolique transitoire est un phénomène selon lequel le glucose inhibe immédiatement, mais transitoirement, la synthèse enzymatique quand il est additionné à une culture utilisant un substrat qui est consommé plus lentement.

- l'exclusion d'inducteur. Ce phénomène désigne le mécanisme selon lequel le glucose inhibe l'entrée de substrats dont l'utilisation nécessite la synthèse d'enzymes inductibles, ou entraîne leur sortie du cytoplasme.

3.3.1.1. La répression catabolique

Malgré de nombreuses recherches, le mécanisme très complexe de la répression catabolique n'est pas encore élucidé.

Des travaux effectués (présentés en annexe 1), entre 1942 et 1981, ont permis de définir le mécanisme de la répression catabolique dépendante de l'AMPc.

D'après ces travaux, il apparaît que :

- des substrats, rapidement métabolisables, provoquent la diminution de l'AMPc intracellulaire, ce qui entraîne une inhibition de l'expression de certains gènes inductibles ou constitutifs ;

- cette inhibition est levée par l'addition d'AMPc, qui, en s'associant avec la "Cyclic AMP Receptor Protein" (CRP), agit au niveau de l'ADN en facilitant la fixation de l'ARN polymérase et, de ce fait, la transcription (figure 6).

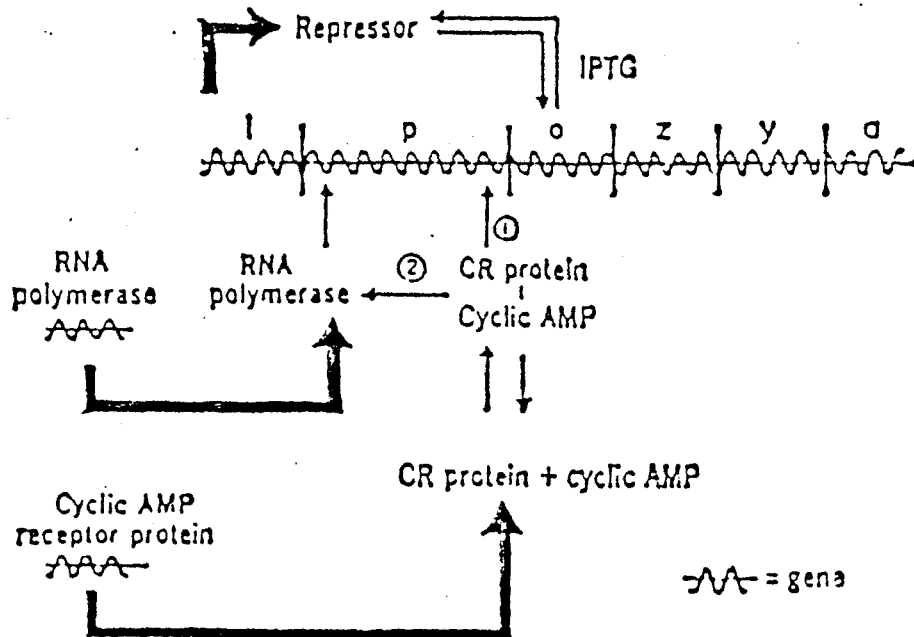


Figure 6 : Mode d'action de l'AMPc sur l'opéron lactose (d'après Pastan et Perlman, 1970)

Cependant, d'autres faits ont amené les chercheurs à considérer que le complexe AMPc - CRP n'est pas le régulateur exclusif de la répression catabolique.

Ces travaux (présentés en annexe 2) ont montré que :

- la répression catabolique, telle qu'elle a été décrite chez E. coli, n'est pas toujours vérifiée chez les autres bactéries ;

- cette répression, due à des intermédiaires cataboliques, n'est pas un phénomène du "tout ou rien". Certains opérons sont plus réprimés que d'autres ;

- l'AMPc n'est pas le seul modulateur et les taux intracellulaires de ce nucléotide sont plutôt la conséquence et non la cause de la répression catabolique (Ullmann, 1985).

L'hypothèse la plus récente est proposée par Ullmann (1985), qui suggère que l'expression des gènes est régulée, soit négativement par des catabolites, soit positivement par le complexe AMPc - CRP (figure 7).

3.3.1.2. La relation entre répression catabolique et exclusion d'inducteur

L'inhibition de l'expression des gènes cataboliques peut être également effectuée par un mécanisme d'exclusion de l'inducteur du cytoplasme. Le mécanisme exact de cette inhibition n'est pas défini et certains auteurs (Dills et coll., 1980) ont soutenu que la répression des enzymes cataboliques par le glucose doit être due, en premier lieu, à un manque d'entrée du substrat inducteur dans les cellules. Ceci, certainement exact pour des enzymes inductibles, n'est pas le cas pour les systèmes constitutifs. En effet, la comparaison des systèmes constitutifs et inductibles a permis de dissocier la contribution de chacun de ces deux phénomènes au niveau de l'inhibition des activités enzymatiques par le glucose (Hefferman et coll., 1976 ; Joseph et coll., 1981 ; Taylor et Yudkin, 1978).

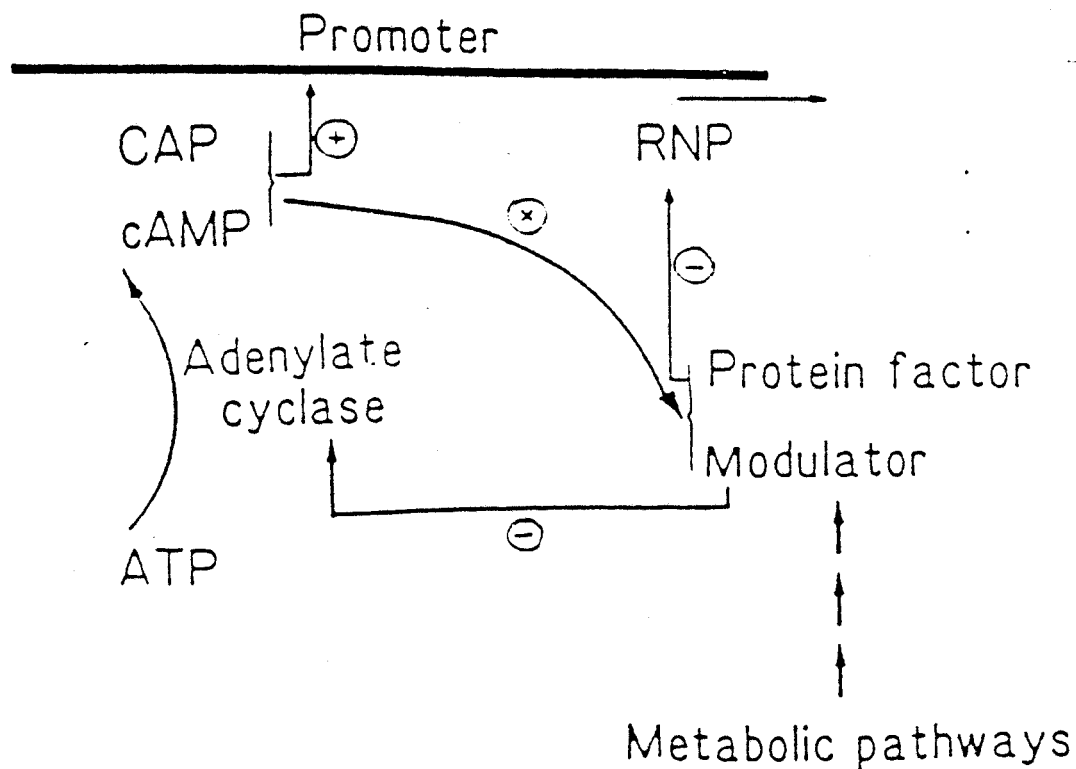


Figure 7 : Modèle schématique de la relation entre le contrôle positif de l'expression des gènes et la régulation négative de la répression catabolique.
(d'après Ullmann, 1985).

Ces travaux ont été résumés (Ullmann, 1985) dans le tableau 4, qui montre la comparaison de cinq systèmes cataboliques.

Dans le cas de la β -galactosidase et de la tryptophanase, l'effet du glucose est très proche, quelque soit la souche étudiée. On conclut donc que le seul "effet glucose" est la répression catabolique.

Par contre, si on considère l'activité de l'amylomaltase et de l'UDP-Gal-épimérase, on remarque que les pourcentages des activités enzymatiques sont très différents selon les souches. En effet, l'inhibition causée par le glucose chez les souches sauvages inductibles est en grande partie ou totalement supprimée chez les souches constitutives. Dans ce cas, l'exclusion d'inducteur apparaît être le majeur ou seul effet inhibiteur de ces enzymes.

En ce qui concerne enfin la L-arabinose épimérase, les deux effets doivent être impliqués dans la régulation de l'expression de l'opéron arabinose.

Tableau 4 : Comparaison des quelques activités enzymatiques chez des souches sauvages et constitutives d'E. coli.
 Les résultats sont exprimés en % de l'activité enzymatique chez des cellules cultivées sur glucose par rapport à l'activité mesurée chez les cellules cultivées sur glycérol (d'après Ullmann, 1985, modifié)

	Souche sauvage (inductible)	Souche constitutive	Nature de l'inhibition
! β -galactosidase (lac)!	40	40	Répression catabolique
! Amylomaltase (mal):	4	60	Exclusion d'inducteur
! UDP-Gal-épimérase (gal):	35	100	Exclusion d'inducteur
! Tryptophanase (tna):	3,7	3,2	Répression catabolique
! L-arabinose-épimérase : (ara):	25	60	Répression catabolique et Exclusion d'inducteur



3.3.2. L'inhibition des systèmes de transport non-PTS par le système PTS

Le système PTS intervient dans la régulation du transport des hydrates de carbone qui ne sont pas accumulés par ce système (Dills et coll., 1980 ; Saier, 1977). En effet, une protéine régulatrice du système PTS, qui est l'enzyme III^{Glc} inhibe les perméases non-PTS en s'y associant à un site allostérique. Quand elle est phosphorylée par la chaîne PTS (figure 8), elle est incapable de les inhiber. Les substrats du PTS diminuent le taux de phosphorylation de l'enzyme III^{Glc} en enlevant le phosphate de la voie PTS et, dès lors, ils causent une inhibition de l'activité perméasique non-PTS.

Osumi et Saier (1982) ont proposé un modèle, qui représente l'interaction allostérique entre les composants du PTS et la lactose perméase chez E. coli (figure 9).

Selon ces auteurs, l'enzyme III^{Glc} déphosphorylé se lie à la lactose perméase en formant un complexe avec le composant Hpr du système PTS.

Quand le lactose se fixe sur sa perméase, il altère la conformation de celle-ci, qui devient plus affine pour l'enzyme III^{Glc} . Ce changement conformationnel induit alors une nouvelle conformation de l'enzyme III^{Glc} , qui voit son affinité diminuer pour l'Hpr.

Dans cet état (complexe lactose-lactose perméase-enzyme III^{Glc}), la perméase se trouve sous une forme moins active que celle observée pour le complexe lactose-lactose perméase.

A l'opposé, la phosphorylation de l'enzyme III^{Glc} modifie son état conformationnel de telle sorte que son affinité pour la lactose perméase diminue, ainsi par conséquent, que son effet inhibiteur.

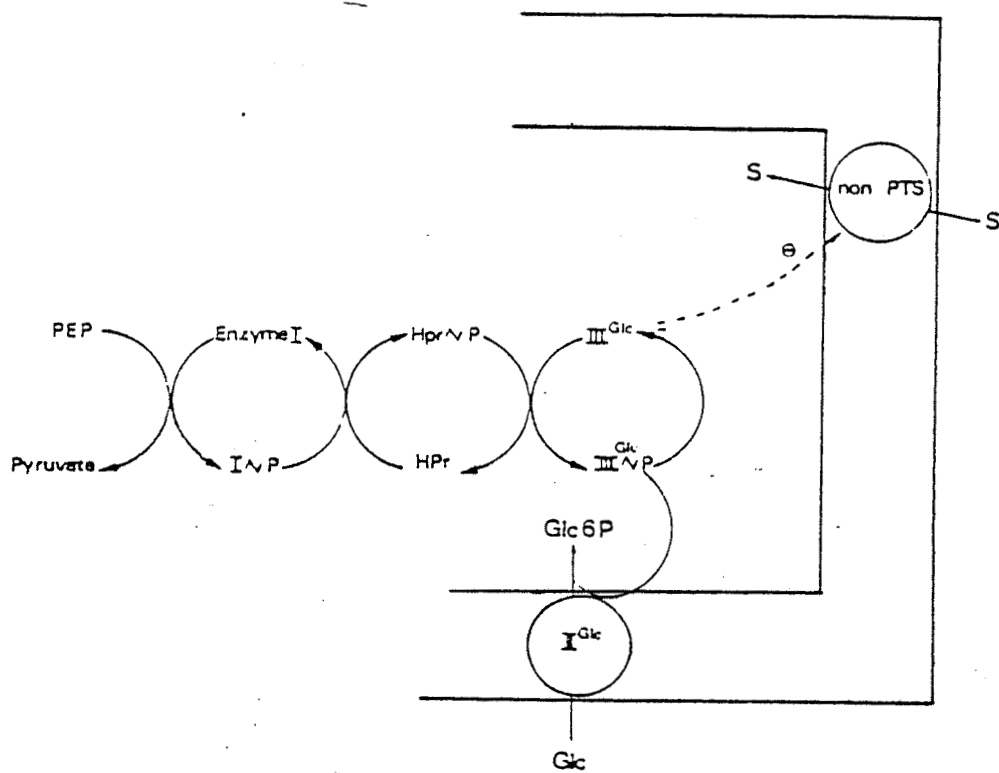


Figure 8 : Régulation des systèmes non-PTS par le système PTS
(d'après Ullmann et Danchin, 1983 modifié).



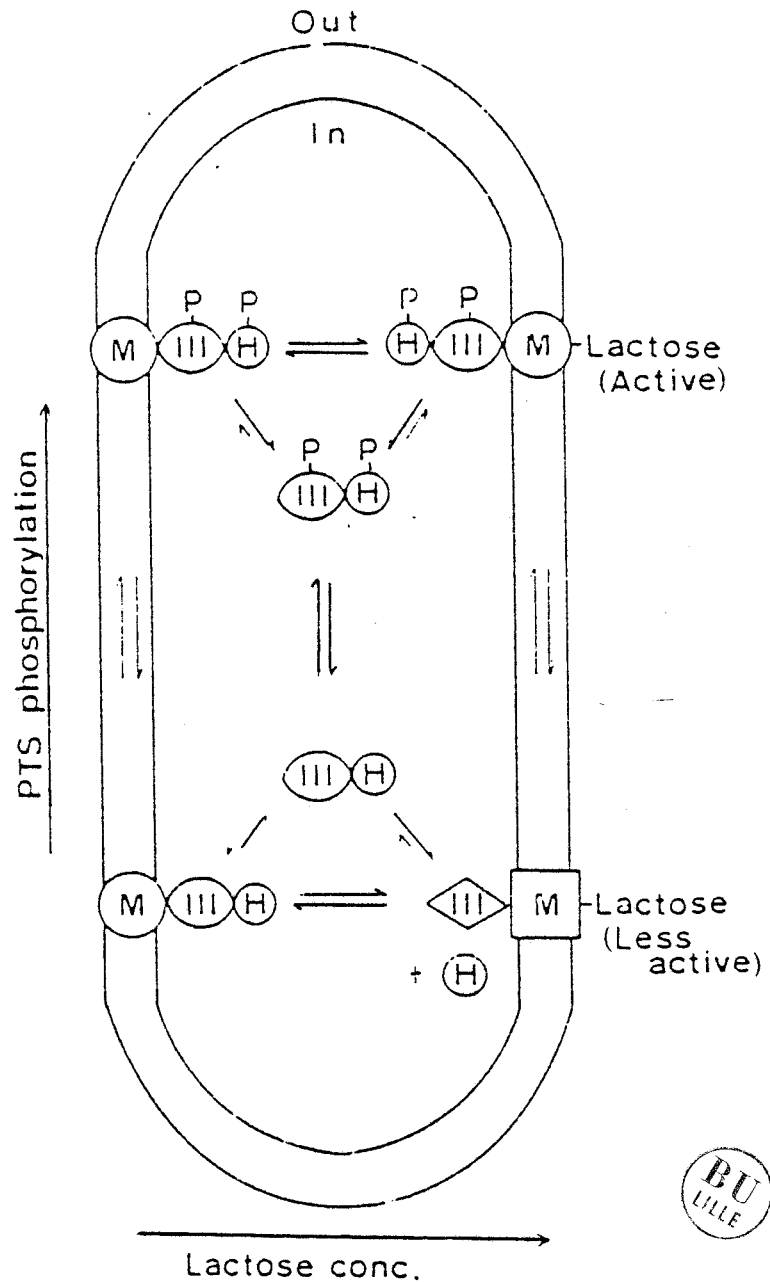


Figure 9 : Interaction allostérique entre composants du système PTS et la lactose perméase chez *E. coli*.

(d'après Osumi et Saier, 1982)

Les symboles M, III et H indiquent respectivement la lactose perméase, l'enzyme III^{Glc} et l'Hpr.

IV - LE TRANSPORT ET SA REGULATION CHEZ RHIZOBIUM

L'étude des mécanismes de transport chez Rhizobium est récente. Les travaux ont été effectués pour la plupart chez les cellules libres de Rhizobium, l'espèce la plus étudiée étant R. leguminosarum. Le transport des hexoses (tels que glucose, fructose et mannose) et de certains de leurs dérivés (comme le malate et le succinate) sont les mieux étudiés.

4.1. Le transport des hexoses

4.1.1. Le transport des hexoses chez les cellules libres de Rhizobium

Le transport du glucose et du fructose ont été décrits chez R. leguminosarum et R. cowpea et celui du mannose et du fructose chez R. meliloti. Les caractéristiques importantes de chacun de ces transports sont résumés dans le tableau 5.

4.1.1.1. L'énergisation du transport

La définition du mode de transport, passif ou actif, ainsi que la nature de l'énergie nécessaire lors d'un transport actif, a été systématiquement abordée par les différents auteurs avec l'étude de l'effet des différents inhibiteurs sur l'accumulation des hexoses (tableau 6).

Les découplants énergétiques, ainsi que le cyanure, inhibiteur du transport d'électrons, provoquent l'inhibition très sévère de tous les systèmes de transport étudiés, indiquant que le glucose, le fructose et le mannose sont transportés chez Rhizobium par un mécanisme actif et à travers une membrane énergisée par un gradient de protons. Il apparaît que, chez Rhizobium, les hexoses, contrairement à la plupart des autres espèces bactériennes, sont transportés par un système non-PTS. Ils s'accumulent chimiquement inaltérés dans le cytoplasme. Ceci a pu être

Tableau 5 : Les différents systèmes de transport des hexoses et leurs caractéristiques chez les cellules libres de Rhizobium

Espèce et Souche étudiée	Paramètres cinétiques				Inhibition du transport par				Nature de l'accumulation	Nature du Système	Références	
	Substrat transporté	Km (a) Km ₁	Vmax (b) Vmax ₁	Vmax (c) Vmax ₂	Découplants énergétiques	NEM	Cyanure	Fluorure				Arseniate
<u>R. leguminosarum</u> WU 235	glucose αMeG	1670 297	ND ND		++ ++	++ ++	++ ++	- -	- -	Active par : énergisa- tion de la membrane	Consti- tutif	Hudmann et Glenn, 1980
RBL 1	glucose 2DG αMeG	2,3 54 12,2	29 5800 146	7,6 20,5 2,9	11,5 6,1 12,5	++ ++	++ ND	ND ND	ND ND	"	"	DeVries et coll., 1982
MNF 3841	fructose	ND	ND		++	ND	ND	ND	ND	"	"	Glenn et coll., 1984
<u>R. meliloti</u> L 5-30 L 5-30	fructose mannose	2	ND		++ ++	ND ++	ND ++	ND -	ND -	" "	Inductible Consti- tutif	Gardiol et coll., 1980 Arias et coll., 1982
<u>R. cowpea</u> 32 H ₁ NCR 234	glucose fructose	ND ND	ND ND		++ ++	++ ND	++ ND	ND ND	ND ND	" "	ND Inductible	Stowers et Elkan, 1983 Saroso et coll., 1984

Abréviations utilisées : ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ; + : inhibition entre 55 et 80 % ;
+ : inhibition entre 45 et 55 % ; - : pas d'inhibition ; (a) valeurs exprimées en μMolaire ;
(b) valeurs exprimées en nmoles/min X mg de protéines ; (c) quand un système multiple de
transport existe, "1" est le système de forte affinité, "2", de faible affinité.



démontré d'une façon plus directe, en extrayant et en identifiant le "pool" accumulé. Pour cela, les auteurs ont, soit utilisé des analogues structuraux de l'hexose, non métabolisables par la souche étudiée, soit des mutants incapables de dégrader l'hexose transporté. Il a été démontré que l' α -methyl glucose (analogue non métabolisable du glucose chez R. leguminosarum WU 235 (Hudmann et Glenn, 1980), ainsi que le fructose (chez un mutant fructokinase négative de la souche MNF 3841 (Glenn et coll., 1984) de la même espèce, et chez R. meliloti L 5-30 (Gardiol et coll., 1980)) sont accumulés sous une forme non phosphorylée.

D'autre part, il semble que ces systèmes ne sont pas énergisés directement par l'ATP. En effet, l'arseniate, qui inhibe la constitution d'un "pool" intracellulaire d'ATP issu du métabolisme intermédiaire, a peu ou pas d'effet sur l'accumulation des hexoses.

Récemment, Smart et coll. (1984) ont observé, chez R. cowpea NCR 234, que l'arseniate est accumulé par le système de transport du phosphate. Ils suggèrent alors que la non-inhibition des systèmes de transport des hexoses par l'arseniate peut être due à l'impossibilité de ce composé de pénétrer dans le cytoplasme. Ceci serait provoqué par la présence importante d'ions phosphate (au moins 1,5 mM) dans le milieu réactionnel, qui entrent en compétition avec l'arseniate.

Enfin, des études d'inhibition, effectuées en présence du NEM ou d'EDTA (Ethylène diamine tétraacétique acide), ont montré que le site actif des perméases possède des groupements thiols et que son fonctionnement nécessite quelquefois la présence d'ions bivalents.

4.1.1.2. Caractère inductible ou constitutif de ces systèmes

La nature de chacune des perméases a été décrite (tableau 5). A cet effet, les différentes souches ont été cultivées sur divers substrats et ensuite l'hexose étudié a été accumulé par des cellules issues de ces différentes cultures. Les résultats obtenus par les différents auteurs ont montré que, chez R. leguminosarum, la glucose et la fructose perméase, ainsi que la mannose perméase de R. meliloti sont

constitutives. Par contre, le système d'accumulation du fructose, chez R. cowpea NCR 234 et chez R. meliloti L 5-30, est inductible, puisque des cellules cultivées sur différents autres substrats sont incapables de transporter le fructose.

4.1.1.3. La spécificité de ces systèmes

L'accumulation du glucose et du fructose, chez R. leguminosarum, et celle du fructose, chez R. cowpea, semble être réalisée par des systèmes spécifiques. Ces perméases ne transportent pas les polyols et les disaccharides et ont une faible ou moyenne affinité pour les autres hexoses. Cependant, certains composés ont une forte affinité pour ces systèmes. Par exemple, le sorbose est transporté par la fructose perméase chez R. leguminosarum MNF 3841 et chez R. cowpea NNG 234. Egalement, le galactose, d'une part, et le xylose et le mannose, d'autre part, semblent être accumulés par la glucose perméase chez R. leguminosarum WU 235 et RBL₁, respectivement.

Des études concernant la compétition entre le glucose et ses analogues, α -methyl-glucose et 2-desoxy-glucose, pour la glucose perméase de R. leguminosarum RBL₁, ont montré que, d'une part, ces composés exercent une inhibition mutuelle du transport, d'autre part, que les analogues ont une affinité plus faible que le glucose pour la perméase. En effet, il faut une concentration en analogues 100 fois supérieure à celle du glucose pour inhiber l'accumulation de celui-ci, tandis qu'une concentration en glucose 10 fois supérieure à celle des analogues suffit pour inhiber complètement l'accumulation de ces derniers.

L'étude des paramètres cinétiques du système a montré que le glucose et ses analogues sont transportés chez cette souche par au moins deux mécanismes, un de forte affinité et l'autre de faible affinité, pour ces substrats. D'autre part, les valeurs du km observées sont plus fortes pour les analogues démontrant ainsi que ces composés ont une affinité plus faible que le glucose pour le système perméasique.

4.1.1.4. La régulation de ces systèmes

Des travaux ont montré que le fonctionnement des perméases chez Rhizobium est réprimé lorsque les cellules sont cultivées en présence de malate ou de succinate, comme seules sources de carbone. En effet, l'accumulation du mannose chez R. meliloti (Arias et coll., 1982), ainsi que celle du glucose chez R. leguminosarum WU 235 (Hudmann et Glenn, 1980) et chez R. cowpea 32 H₁ (Stowers et Elkan, 1983) est inhibée par le succinate. Par ailleurs, lors des cultures de R. leguminosarum RBL₁, en présence de glucose et de malate, ce dernier est utilisé d'abord en réprimant le fonctionnement de la glucose perméase et, par conséquent, l'utilisation du glucose.

Plusieurs autres travaux ont été publiés quant à la répression des activités enzymatiques, ainsi que l'utilisation simultanée des différents substrats chez Rhizobium. Les résultats rapportés sont différents selon les sources de carbone et les souches utilisées.

Ainsi, Dilworth et coll. (1983) concluent en l'absence de répression et l'utilisation simultanée des mélanges des substrats tels que histidine / glucose, histidine / succinate, parahydroxybenzoate / glucose et parahydroxybenzoate / succinate, chez R. leguminosarum. Il faut cependant noter que les consommations d'histidine et de parahydroxybenzoate sont très fortement diminuées en présence de succinate.

Chez R. trifolii, De Hollander et Stouthamer (1979) concluent également en l'utilisation simultanée de lactose et de glucose présents à des concentrations variables.

Contrairement à ces auteurs, d'autres ont décrit la présence des croissances diauxiques lors des cultures binaires ainsi que des phénomènes de répression des activités cataboliques (Lim et Shanmugan, 1979 ; Mc Getrick et coll., 1985 ; Röhm et Werner, 1985 ; Ronson et Primrose, 1979 ; Ucker et Signer, 1978).

Ucker et Signer (1978) décrivent un phénomène semblable à la répression catabolique chez R. meliloti. Ces auteurs rapportent des

croissances diauxiques pour des mélanges de succinate / maltose, succinate / cellobiose et succinate / lactose, diauxies qui, d'ailleurs, ne sont pas levées par l'addition d'AMPc dans le milieu de culture.

Lim et Shanmugan (1979) observent que l'accumulation de l'hydrogène est inhibée par le malate chez R. japonicum et que cette répression est levée spécifiquement par l'addition d'AMPc. D'autre part, la mesure de la concentration intracellulaire d'AMPc a montré que la quantité de ce nucléotide est proportionnelle à l'activité perméasique.

Chez la même espèce, Röhm et Werner (1985) montrent que le succinate exerce une répression catabolique sévère sur l'utilisation du phénol.

Enfin, Mc Getrick et coll. (1985) ont récemment étudié la répression de la fixation du CO₂, chez R. meliloti et la répression catabolique de l'utilisation de l'H₂ chez R. japonicum. Ils ont montré que, chez R. meliloti, l'addition d'AMPc, ainsi que l'introduction chez ces cellules de plusieurs copies du gène de l'adenyl cyclase n'affectent pas le taux de fixation du CO₂. D'autre part, ils ont observé une levée partielle de la répression catabolique de l'utilisation de l'H₂, chez R. japonicum, lorsque ces cellules contiennent des copies du gène de l'adenyl cyclase de R. meliloti.

4.1.2. Le transport des hexoses chez les bactéroïdes

L'accumulation des hexoses chez les bactéroïdes est très faible ou absente (tableau 6). La plupart de ces accumulations ont été réalisées en anaérobiose, mais celle du glucose, chez R. leguminosarum (De Vries et coll., 1982) a été effectuée dans des conditions aérobies, anaérobies ou microaérobies. Cette étude a montré que, quelle que soit l'aération du milieu, le transport du glucose reste très faible.

Cette perte de l'activité perméasique chez les bactéroïdes pourrait être due à l'endommagement de la perméase durant leur isolement à l'inaccessibilité de cette protéine pour son substrat causée par la déformation des cellules lors de la vie symbiotique.

Sur un mutant pléiomorphe de R. meliloti, isolé par Mroz (1984) nous avons montré que ces bactéries, qui ont l'aspect des bactéroïdes en culture libre, accumulent les hexoses mais beaucoup plus faiblement que les cellules non déformées.

L'absence d'activité perméasique chez les bactéroïdes peut être donc partiellement attribuée à des changements membranaires qui altèrent l'accessibilité de la perméase.

Tableau 6 : Le transport des hexoses chez les bactéroïdes isolés des nodules

Bactéroïdes	Substrat	Nature de	Références
	transport	l'accumulation:	
<u>R. leguminosarum</u>	:	:	:
WU 235	: glucose	: passive	: Hudmann et
	:	:	: Glenn, 1980
RBL 1	: glucose	: passive	: De Vries et
	:	:	: coll., 1982
MNF 3841	: fructose	: passive	: Glenn et
	:	:	: coll., 1984
RPL 1003	: glucose	: passive	: Hooymans et
	: fructose	: passive	: Logman, 1984
	:	:	:
<u>R. cowpea</u>	:	:	:
NCR 234	: fructose	: passive	: Saroso et
	:	:	: coll., 1984
	:	:	:
<u>R. japonicum</u>	:	:	:
USDA 110, USDA 138,	: glucose	: passive	: Reibach et
8-D et 8-T	:	:	: Streeter, 1984
	:	:	:



4.2. Le transport du succinate et du malate

La succinate et la malate perméase ont été étudiées chez les cellules libres et les bactéroïdes de R. leguminosarum, R. japonicum, R. trifolii et R. cowpea (tableaux 7 et 8). L'organisation et la régulation des gènes de structure du système de transport des acides dicarboxyliques ont été même caractérisés chez R. leguminosarum (Ronson et coll., 1984).

Le processus d'accumulation de ces acides est saturable et la vitesse initiale de leur transport est dépendante de leur concentration externe selon une relation de Michaelis. Les Km apparents observés chez les cellules libres sont de l'ordre du micromolaire (μM) et varient en fonction des espèces étudiées, selon un facteur de 1 à 4. Chez les bactéroïdes, une affinité plus faible de ces perméases pour leurs substrats respectifs a été généralement observée et les vitesses maximales (V_{max}) d'accumulation sont également inférieures à celles calculées pour des cellules libres.

Ces études ont, par ailleurs, montré que le transport du succinate et du malate est réalisé par un mécanisme actif, qui dépend de l'état de l'énergisation de la membrane semblable à celui du transport des hexoses.

Quant à la nature inductible ou constitutive de ces perméases, les études effectuées ont montré des différences en fonction des espèces et des souches étudiées. Ainsi, chez R. leguminosarum WU 235, R. japonicum USDA I-110 et R. cowpea USDA 3278, la succinate et la malate perméase sont constitutives.

Par contre, chez R. leguminosarum GF 160 et GF 252, R. trifolii CF 7012 et R. japonicum USDA 110 et USDA 217, le système de transport du succinate est inductible. En effet, les auteurs ont observé une très faible accumulation de ce composé, lorsque les cellules ont été cultivées sur bon nombre d'autres substrats, comme des hexoses, polyols, pentoses, disaccharides ou autres acides organiques, exceptés le malate ou le fumarate. Il faut cependant noter que, pour la souche USDA 110, l'accumulation du succinate par des cellules cultivées sur divers autres

Tableau 7 : Les différents systèmes de transport des intermédiaires du cycle de Krebs et leurs caractéristiques chez les cellules libres de *Rhizobium*

Espèce et Souche étudiée	Paramètres cinétiques							Inhibition du transport par :			Nature du Système	Références	
	Substrat transporté	Km (a)	Vmax (b)	Découplants énergétiques	NEM	Cyanure	Arseniate	Nature de l'accumulation					
<u>R. leguminosarum</u>													
GF 160	succinate	2,6	78								Active par énergie de la membrane		Finan et coll., 1981
CFS 18	malate	1,9	36	++	ND	ND	-				Inductible		
WU 235	succinate	ND	ND	++	++	++	-				Constitutif		Glenn et coll., 1980
<u>R. cowpea</u>													
NGR 234	succinate	ND	ND	++	ND	ND	ND				"		Saroso et coll., 1984
USDA 3278	succinate	10	23	++	++	++	-				"		SanFrancisco
	malate	6,1	7,7	++	++	++	-				"		et Jacobson, 1985
<u>R. japonicum</u>													
USDA I-110	succinate	7,5	22,5	++	++	++	-				"		San Francisco
	malate	6,7	12,6	++	++	++	-				"		et Jacobson, 1985
USDA 110	succinate	3,8	1,6	++	ND	++	-						Plutot inductible
USDA 217	succinate	1,8	3,3	++	ND	++	-						Mc Allister et Lepo, 1983
<u>R. trifolii</u>													
CF 7012	succinate	ND	ND	ND	ND	ND	ND				ND		Ronson et coll., 1981

Abréviations utilisées : ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ; + : inhibition entre 45 et 55 % ; - : pas d'inhibition ; (a) valeurs exprimées en nmoles/min x mg de protéines ; (b) valeurs exprimées en µMolaire ; = : inhibition entre 55 et 80 % ;



Tableau 8 : Les différents systèmes de transport des intermédiaires du cycle de Krebs et leurs caractéristiques chez des bactéroïdes isolés des nodules

Bactéroïdes	Paramètres cinétiques				Inhibition du transport par :			Nature de l'accumulation	Nature du Système	Références
	Substrat transporté	Km (a)	Vmax (b)	Découplants énergétiques	NEM	Cyanure	Arseniate			
<i>R. leguminosarum</i>										
WU 235	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	Active	Constitutif	Glenn et coll., 1980
RBL 1	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	"	"	DeVries et coll., 1982
MNF 3841	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	"	"	Glenn et coll., 1984
GF 160	succinate	1,5	23	+	ND	ND	-	"	Inductible	Finan et coll., 1983
GF 252	succinate	2,5	9,2	ND	ND	ND	ND	"	"	Finan et coll., 1983
<i>R. japonicum</i>										
USDA I-110	succinate	10,1	3	+ -	++	++	-	"	Constitutif	San Francisco et Jacobson, 1985
USDA I-110	malate	20,4	2	+ -	++	++	-	"	"	Jacobson, 1985
USDA 111, USDA 138, 8-D et 8-T	succinate	40	(c) 2,72	+	ND	ND	ND	"	ND	Reibach et Streeter, 1984
	malate	40	(c) 1,05	ND	ND	ND	ND	"	ND	
	-ceto-glutamate	388	(c) 71,9	ND	ND	ND	ND	"	ND	
<i>R. cowpea</i>										
USDA 3278	succinate	10,4	0,7	++	++	++	-	"	Inductible	San Francisco et Jacobson, 1985
	malate	15,1	0,27	+	++	++	-	"	"	Jacobson, 1985

Abréviations utilisées : ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ; + : inhibition entre 45 et 55 % ; - : pas d'inhibition ; (a) valeurs exprimées en $\mu\text{Molaire}$; (b) valeurs exprimées en $\text{nmoles}/\text{min X mg}$ de protéines ; (c) valeurs exprimées en $\text{nmoles}/\text{min X mg}$ de bactéroïdes.



substrats était toujours supérieure au quart de celle observée lorsque les cellules ont été cultivées sur succinate. Dans ce cas, les auteurs ont défini ce système comme plutôt inductible que constitutif.

Enfin, il ne semble pas que ces systèmes soient réprimés par le glucose ou d'autres sources de carbone.

4.3. Conclusion

L'analyse des résultats publiés concernant les différents systèmes de transport chez les bactéries montre qu'il en existe plusieurs types actifs que l'on peut regrouper en trois grandes classes :

- les systèmes à transporteur mobile
- les systèmes à protéine périplasmique
- les systèmes phosphotransférases (PTS).

L'étude de leur régulation a montré que les non-PTS comme la lactose perméase d'E. coli sont réprimés par le glucose.

Chez Rhizobium, l'étude des perméases n'a jamais mis en évidence l'accumulation des hexoses par un mécanisme PTS, contrairement à la presque totalité des autres genres bactériens. Certains de ces systèmes sont réprimés par les acides dicarboxyliques tels que le succinate et le malate.

Dans notre travail nous avons recherché la nature et la régulation de l'accumulation du glucose chez R. meliloti, espèce peu étudiée de ce point de vue.

Nous avons utilisé des analogues du glucose tels que le 2-désoxy-glucose, l' α -méthyl glucose et le 3-O-méthyl glucose. Nous avons constaté qu'ils pénétraient moins rapidement que le glucose dans la cellule mais que, comme lui, ils étaient métabolisés. En conséquence et, en absence des mutants métaboliques, la plupart de nos travaux ont été réalisés avec le glucose lui-même. Les paramètres du transport mesurés sont de ce fait des valeurs apparentes car dépendantes non

seulement du système perméasique mais aussi de la dégradation du substrat dès son entrée dans le cytoplasme.

Nous mettons ainsi en évidence, en accord avec les travaux déjà publiés pour d'autres espèces, l'accumulation active du glucose au travers de la membrane cytoplasmique énergisée. Par ailleurs, nous décrivons un système original de régulation de ce mécanisme. En effet, nous montrons qu'il subit la répression catabolique, AMPc dépendante, par le succinate.

MATERIELS

ET

METHODES

I - SOUCHE BACTERIENNE

Il s'agit de la souche M_5N_1 de R. meliloti (RmM_5N_1), efficiente pour la luzerne (Medicago sativa).

La congélation à -20°C d'une suspension cellulaire en milieu complet fructose renfermant 20 % de glycérol permet de conserver la souche pendant un an.

II - TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE

2.1. Milieu RHB₁

Milieu minimum de croissance constitué de :

- Milieu R (pH 7,2)

K_2HPO_4	0,5 g
NH_4NO_3	0,5 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g
Eau distillée qsp	1 l

- Facteurs de croissance :

Vitamine H	0,01 mg/ml
Vitamine B ₁	0,5 mg/ml

2.2. Milieu complet RC (pH 7 à 7,5)

K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g

Extrait de levures	1	g
Eau distillée qsp	1	l

2.3. Tampon de non prolifération (TNP) (pH 7)

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2	g
K ₂ HPO ₄	1	g
Eau distillée qsp	1	l

III - CONDITIONS DE CULTURE

3.1. Cultures sur table d'agitation rotative

On réalise des cultures sur milieu RHB₁, additionné d'une source de carbone à 10 g/l, dans des erlens et des fioles à toxine, placés sur une table d'agitation rotative ayant un excentrique de 20 mm et tournant à 105 tours/min. La croissance est réalisée à 30°C durant 48 heures.

3.2. Cultures en biophotomètre

Les cultures sont réalisées dans des tubes qui sont placés dans un appareil, le biophotomètre (Marais et coll., 1981). Celui-ci permet le suivi de croissances, par la mesure automatique de la densité optique (D.O.), dans des conditions précises d'agitation et de température.

3.2.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est réalisé à partir d'une préculture effectuée sur milieu RHB₁ additionné de glucose à 10 g/l et incubé à 30°C durant 36 heures. Les cellules sont récupérées après centrifugation (8 000 g, 20 min), lavées dans du TNP, centrifugées à nouveau et reprises dans du TNP afin d'obtenir une suspension cellulaire de D.O. (mesurée à 600 nm)

égale à 1 (environ $1,2 \times 10^9$ cellules/ml). Les milieux sont inoculés avec 1 % de leur volume de cette suspension cellulaire.

3.2.2. Cultures

Elles sont réalisées en incubant 10 ml de RHB₁ 60 heures à 30°C. L'agitation est de type "Vortex" de 500 rpm. La D.O. est mesurée automatiquement à 700 nm toutes les 15 min. Les substrats sont ajoutés à des concentrations variables.

3.3. Cultures en fermenteur

Lors d'une étude précédente (Theodoropoulos, 1982), on a constaté que des cellules, issues des cultures en fiole sur milieu RHB₁ glucosé, accumulent faiblement le glucose. Dans ces conditions de culture, les cellules sont dans un état physiologique mauvais dû à l'acidification du milieu.

En effet, lorsqu'on cultive notre souche sur RHB₁ glucosé en fermenteur avec régulation du pH, on obtient des cellules qui accumulent le glucose très rapidement et en quantités importantes.

Pour cette raison, mais également afin de pouvoir contrôler certains paramètres de la culture, on a réalisé des croissances bactériennes en fermenteur.

3.3.1. Description du matériel

Deux types de fermenteurs ont été utilisés :

- le fermenteur "Setric" ayant un volume utile de trois litres (fig. 10),
- le fermenteur "New-Brunswick" ayant un volume utile de dix litres.

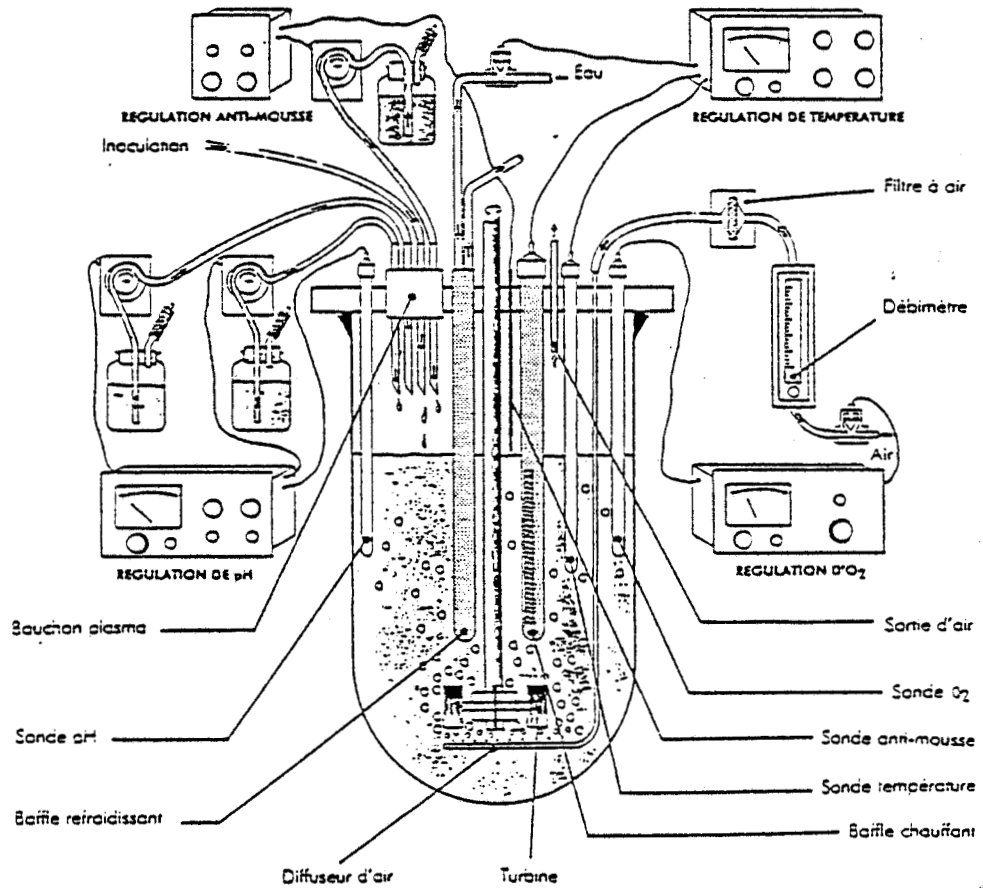


Figure 10 : Représentation schématique d'un fermenteur SETRIC

Sur ces appareils sont fixés les capteurs suivants :

- une électrode pH,
- une sonde de température,
- un détecteur de mousse,
- une sonde d'oxygène dissous.

De plus, ils sont munis d'une régulation de température et de pH et d'un enregistreur papier indiquant l'évolution de l'oxygène dissous et du pH en fonction du temps.

3.3.2. Protocole d'ensemencement du fermenteur

3.3.2.1. Réalisation d'une préculture

Dans un premier temps, des tubes contenant 10 ml du milieu riche RC, additionné de fructose à 10 g/l sont inoculés avec une colonie isolée sur boîte. On réalise alors une culture pendant une nuit à 30°C.

Dans un deuxième temps, les fioles de préculture contenant du RHB₁ additionné du substrat à 10 g/l sont inoculés avec 10 % de leur volume de cette culture. La préculture est alors réalisée sur table d'agitation rotative à 30°C durant 24 heures.

3.3.2.2. Ensemencement du fermenteur

L'ensemencement varie selon l'utilisation du fermenteur.

En effet, lors de la production massive des cellules, les milieux sont inoculés avec 10 % de leur volume de la préculture.

Par contre, lorsqu'on suit des croissances diauxiques, il faut éliminer l'excédent du substrat de la préculture car celui-ci est ajouté à concentration limitante et sa consommation est mesurée durant ce type de croissance. Pour cela, les cellules sont récupérées après

centrifugation et reprises dans un petit volume de RHB₁. Le fermenteur est alorsensemencé de cette suspension cellulaire.

3.3.3. Conditions de culture

Le milieu de culture est toujours le milieu RHB₁.

Lors des cultures sur milieu additionné de glucose (10 g/l), la croissance est réalisée à 30°C durant 16 heures, le pH étant régulé entre 6,8 et 7,2 unités de pH durant toute la fermentation.

Lors des cultures binaires (en présence simultanée de deux substrats), chacun des substrats est ajouté à 1 g/l. La croissance est réalisée à 30°C sans régulation du pH.

IV - METHODES DE DOSAGE

4.1. Dosage du glucose

La concentration du glucose, dans le surnageant des échantillons prélevés lors des cultures, est déterminée enzymatiquement (coffret Boehringer).

4.2. Dosage de protéines

Il est effectué par la méthode de Lowry et coll. (1951), utilisant la sérum albumine bovine comme standard.

V - ETUDE DES ECHANGES CELLULAIRES A TRAVERS LA MEMBRANE PLASMIQUE

5.1. Préparation des cellules pour des essais d'accumulation

Les cellules utilisées pour des essais d'accumulation sont obtenues à partir des cultures en fin de phase exponentielle de croissance.

La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée dans des pots à centrifuger à 8 000 g durant 20 min. Le culot est lavé dans du TNP, centrifugé à nouveau et repris par un petit volume de ce même tampon. Son adsorbance est mesurée à 600 nm. Ces différentes manipulations, réalisées stérilement, permettent de conserver les suspensions cellulaires à + 4°C.

5.2. Les produits radiomarqués

Les produits radiomarqués utilisés sont obtenus par le centre radiochimique Amersham.

On a utilisé les produits suivants :

- D-(U-¹⁴C) glucose ; activité spécifique : 250 mCi/mmol,
- méthyl (αD-(U-¹⁴C) gluco) pyranoside ; activité spécifique : 279 mCi/mmol,
- 2-désoxy-D(1-³H) glucose ; activité spécifique : 15 Ci/mmol.

Selon la concentration du substrat utilisé, ces solutions mères sont, soit diluées, soit additionnées du substrat froid correspondant.

5.3. Accumulation des substrats

Il s'agit de mesurer, en scintillation liquide, la quantité de substrat radiomarqué retenu par les cellules bactériennes au cours du temps.

5.3.1. Technique d'accumulation

La suspension cellulaire (D.O. : 1 ; volume 1 ml) est pré-incubée à 30°C pendant 15 min, avant l'addition du substrat à la concentration de 0,1 mM. La perméation est réalisée à 30°C. Les prélèvements sont de 0,1 ml. Ils sont filtrés immédiatement sur membranes en nitrocellulose de 0,45 µm humides et rincés par 2 ml de TNP + NaCl à 5 % à + 0°C.

Les membranes sont séchées sous lampe infrarouge pendant 30 min, puis déposées dans des pots à scintillation. On ajoute 7,5 ml de liquide scintillant (Lipoluma) et on compte le nombre des cpm sur le compteur à scintillation liquide "Beckman".

5.3.2. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en nmoles de substrat accumulé par mg de protéines totales de la suspension cellulaire.

5.4. Efflux des produits accumulés

Plusieurs lots de cellules (0,1 ml) sont préparés à 30°C. Chaque série est additionnée d'un substrat radiomarqué : soit 1 µCi de glucose, soit 1 µCi de α-méthyl-D-glucoside ou de 5 µCi de 2-désoxy-D-glucose et incubée durant des temps variables. L'incorporation est stoppée en fin d'incubation par l'addition de 2 ml de TNP, additionné du substrat non radioactif respectif, à la concentration finale de 1 mM. Dès lors, on suit l'évolution du marquage intracellulaire en réalisant une cinétique durant 15 min sur des échantillons de 0,1 ml traités comme pour des essais d'accumulation.

VI - ETUDE DE LA NATURE DES PRODUITS ACCUMULES

6.1. Extraction du matériel accumulé

Des suspensions cellulaires de 5 ml à D.O. = 1 sont incubées à 30°C avec des concentrations différentes en glucose et en α -méthyl-D-glucoside et durant des temps variables. Elles sont ensuite filtrées à travers des filtres en nitrocellulose de 0,45 μ m et lavées avec du TNP. Les cellules sont remises en suspension dans 10 ml d'eau distillée et portées à 100°C durant 10 min. Le matériel est centrifugé à 10 000 g durant 20 min et le surnageant filtré à travers des filtres en nitrocellulose de 0,22 μ m. Il est par la suite évaporé par évaporateur rotatif, repris par 0,1 ml d'eau distillée et gardé à - 20°C pour l'analyse ultérieure.

6.2. Techniques de chromatographie et d'électrophorèse

6.2.1. Chromatographie sur papier

Les extraits obtenus sont chromatographiés sur papier W₃, le solvant de migration est celui de Patridge.

Les témoins sont révélés à l'oxalate d'aniline et les produits radioactifs sont détectés en découpant le papier tous les 1 cm et en les analysant en scintillation liquide après avoir ajouté 4 ml de liquide scintillant (Lipoluma).

6.2.2. Chromatographie sur couche mince

Les extraits sont chromatographiés sur couche mince en gel de silice (20 cm x 20 cm ; 0,2 mm d'épaisseur), durant 2 heures. Le solvant de migration est constitué d'éthanol / butanol / acide acétique / eau / pyridine (100 : 10 : 3 : 30 : 10). Les témoins non radiomarqués sont révélés à l'orcinol. Les témoins radiomarqués (UDP-glucose, α -méthyl glucose et acide gluconique) ainsi que les produits radioactifs sont

détectés en découpant le gel tous les 0,5 cm et en les analysant sur un spectromètre de scintillation liquide Beckman, après avoir ajouté 4 ml de liquide scintillant (Lipoluma).

6.2.3. Electrophorèse sur papier

L'électrophorèse est réalisée sur papier W_3 à 400 V durant 15 heures et 30 min. Le tampon de migration est constitué de pyridine / acide acétique / eau (3 : 10 : 400). La révélation des témoins ainsi que la détection des produits radioactifs sont effectuées comme cela a été décrit pour la chromatographie sur papier.

6.3. Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide est effectuée par l'acide trifluoroacétique (ATFA) 4N pendant 4 heures à 100°C.

L'ATFA est éliminé par co-évaporation avec de l'éthanol absolu.

Le résidu sec est enfin repris par une quantité appropriée d'eau et conservé au congélateur.

RESULTATS

ET DISCUSSION

I - MISE EN EVIDENCE D'UN TRANSPORT ACTIF DU GLUCOSE CHEZ R.MELILOTI M₅N₁

1.1. Cinétiques d'accumulation du glucose, α -méthyl glucose et 2-désoxy glucose

Les cinétiques d'accumulation du glucose ainsi que de 2 de ses analogues structuraux, l' α -méthyl-glucose (α MeG) et le 2-désoxy-glucose (2DG) par des cellules cultivées sur glucose, sont représentées par la figure 11.

On observe que le glucose est accumulé avec une vitesse initiale de 24 nmoles/mg de protéine x min. Son accumulation est linéaire jusqu'au temps 5 min, après lequel on remarque une diminution de la vitesse d'accumulation.

RmM₅N₁ accumule également de l' α MeG et le 2DG mais à des vitesses beaucoup plus faibles. En effet, les vitesses initiales d'accumulation de l' α MeG et du 2DG sont respectivement de 4 et 5 nmoles /mg de protéine x min. Ceci peut être dû à une plus faible affinité du système d'accumulation du glucose pour l' α MeG et le 2DG.

1.2. Effet du chloramphénicol sur l'accumulation du glucose

Nous avons voulu savoir si l'accumulation du glucose était effectuée par un système protéique et déterminer, si tel était le cas, le "turnover" de ce système. Pour cela, nous avons étudié l'effet du chloramphénicol sur l'accumulation du glucose.

Les cellules sont alors pré-incubées à 30°C durant des temps différents, avec du chloramphénicol à la concentration finale de 200 μ g/ml. Cette concentration est amplement suffisante puisque le chloramphénicol à 50 μ g/ml inhibe la synthèse protéique chez RmM₅N₁ (Courtois, 1984).

Les cellules ainsi pré-incubées sont additionnées de glucose radiomarqué. On effectue alors une cinétique d'accumulation pendant 10 min.

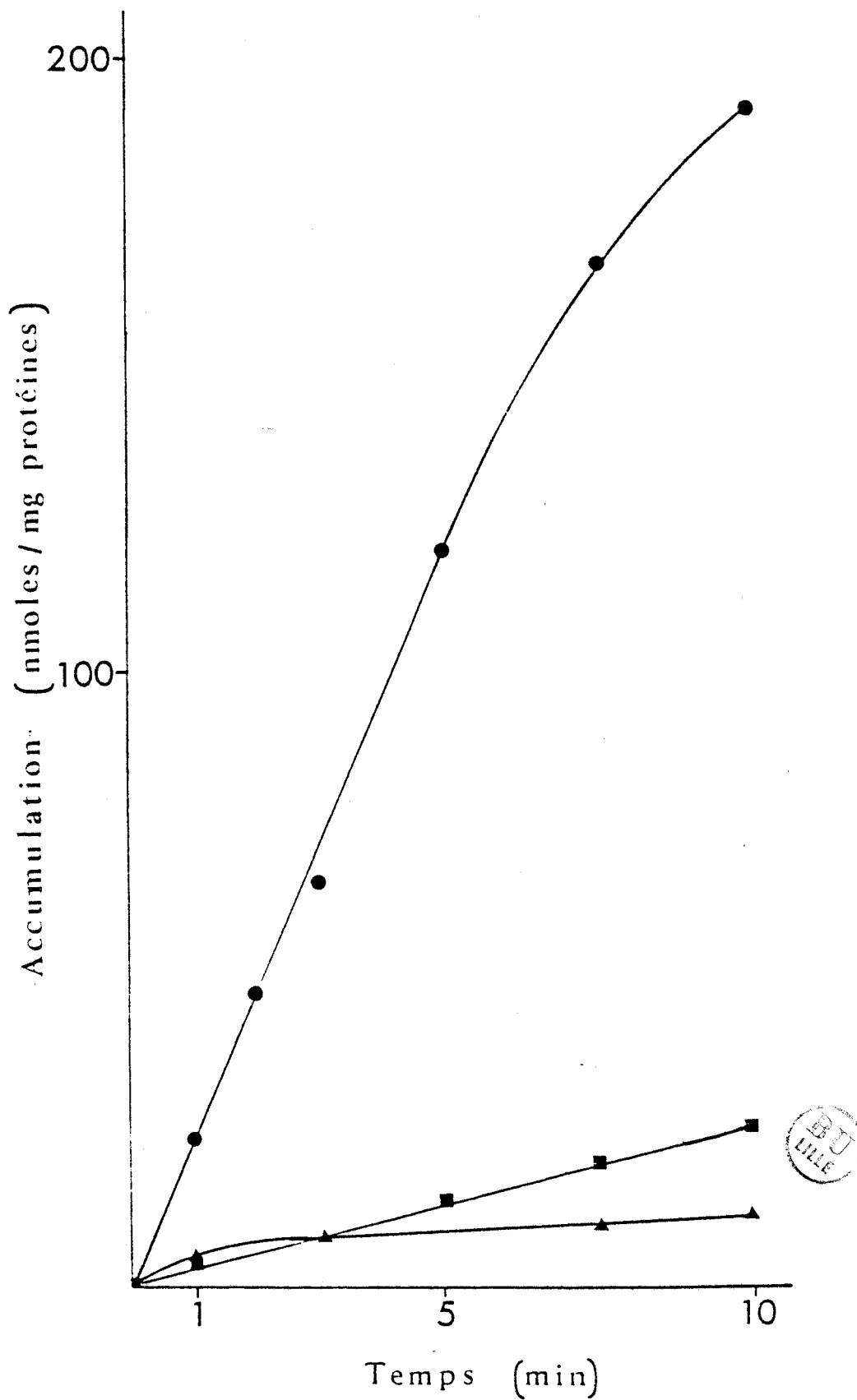


Figure 11 : Cinétiques d'accumulation du glucose (●-●) α -méthyl glucose (▲-▲) et 2-désoxy-glucose (■-■)

Parallèlement, on réalise des cinétiques témoins, c'est-à-dire avec des cellules pré-incubées durant des temps identiques aux cellules précédentes mais en l'absence du chloramphénicol (définition de 100 % d'accumulation).

La figure 12 montre le pourcentage de l'accumulation du glucose, déterminé après 5 min d'accumulation, en fonction du temps de la préincubation des cellules avec le chloramphénicol. On remarque que la capacité des cellules à accumuler le glucose diminue avec le temps de contact de ces cellules avec l'inhibiteur. L'inhibition optimale est obtenue avec une préincubation d'environ 6 heures.

Ces résultats suggèrent que le glucose est incorporé par un système protéique ayant un "turnover" d'environ 6 heures.

1.3. Nature du "pool" accumulé

Dans le but d'aborder le mécanisme de l'accumulation du glucose, nous avons examiné sa phosphorylation éventuelle lors de son transport.

Pour cela, nous avons utilisé l' α MeG qui, d'après la littérature, est un substrat analogue du glucose, non métabolisable ou faiblement métabolisé plus lentement que le glucose chez Rhizobium.

Nous avons d'abord réalisé une accumulation du α MeG à la concentration finale de 10 μ M (3 μ Ci) par des cellules de RmM₅N₁ (D.O. = 1) durant 5 et 60 min. Les produits radiomarqués ont été alors extraits et chromatographiés sur couche mince. Les profils de migration sont représentés par la figure 13.

Après 5 min d'accumulation, on constate que 76,6 % de la radioactivité totale est portée par l' α MeG et seulement 9 % des dérivés phosphorylés. On observe également un petit pic à l'origine qui correspond à 4 % de la radioactivité extraite totale.

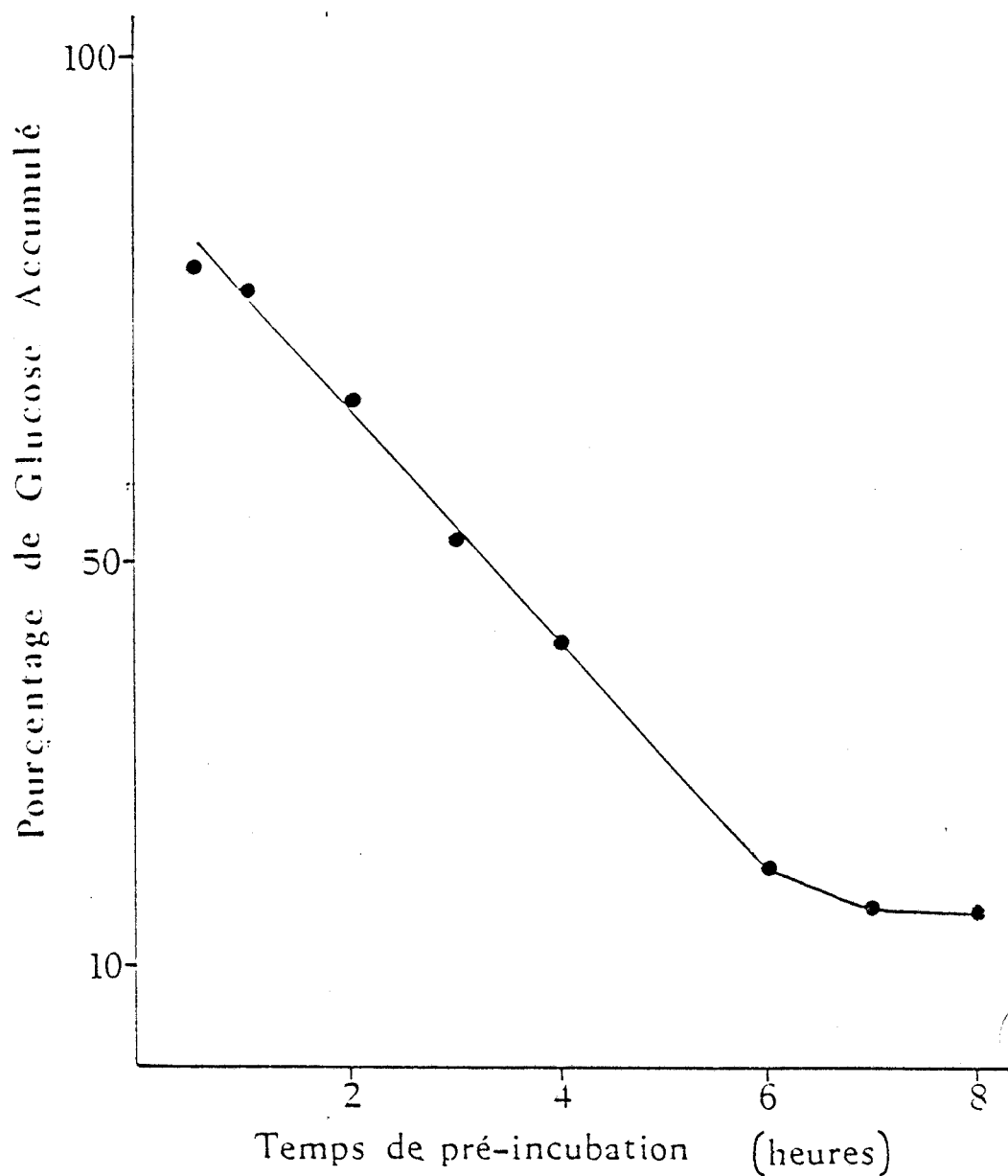


Figure 12 : Effet du chloramphénicol sur l'accumulation du glucose

Les cellules ont été pré-incubées avec du chloramphénicol (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durant des temps différents (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 7h, 8h) avant l'addition du ^{14}C -glucose. L'inhibition est déterminée après 5 min d'accumulation et en comparant à des échantillons sans chloramphénicol.

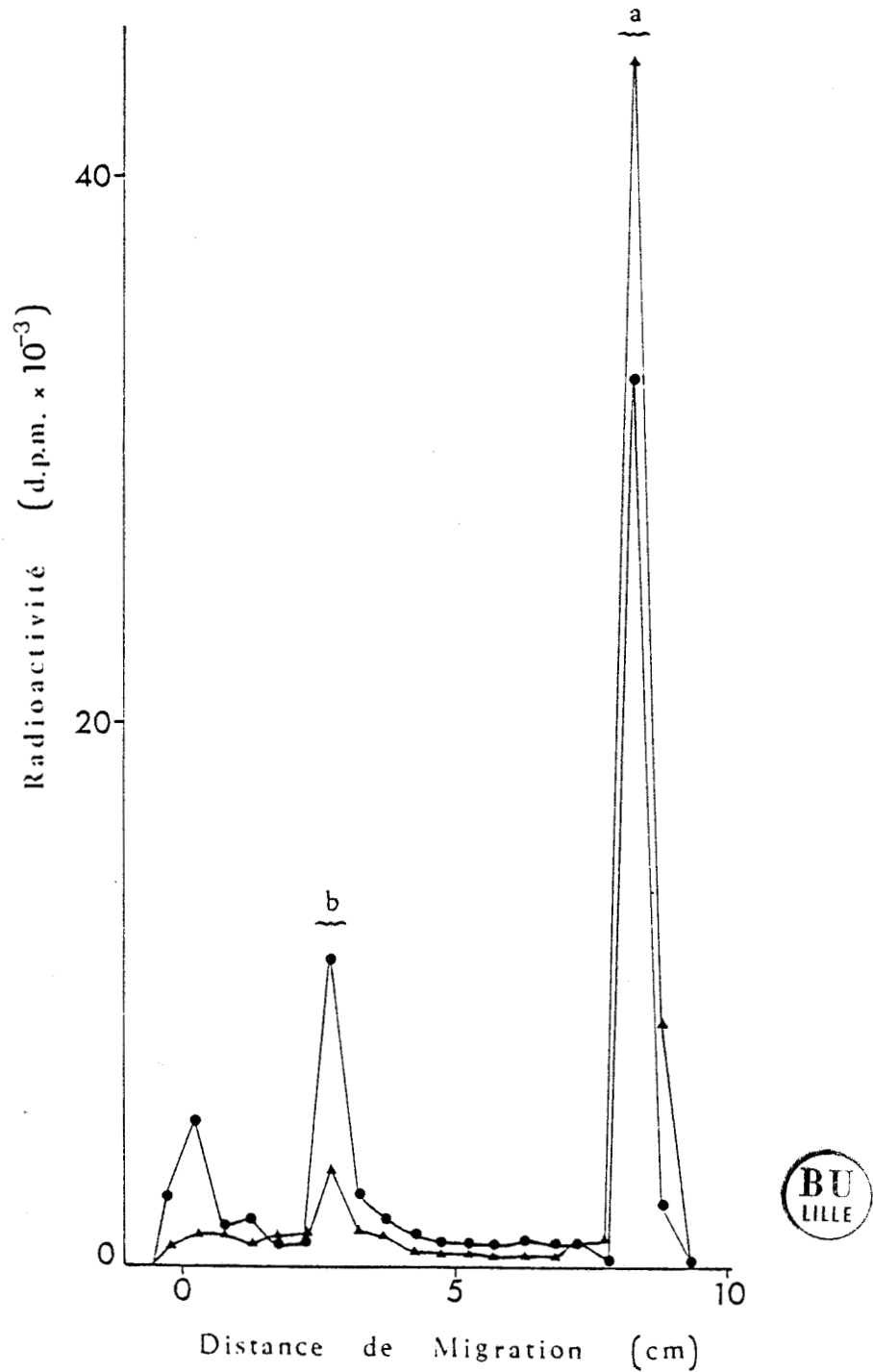


Figure 13 : Chromatographie sur couche mince des produits radiomarqués extraits après une accumulation du α MeG durant 5 min (▲—▲) et 60 min (●—●).

(a) correspond à la distance de migration de l' α MeG et
 (b) à celle du glucose-6-phosphate.

Le profil de migration, après 60 min d'accumulation, reste qualitativement le même que le précédent, mais on observe des variations quantitatives des produits présents. En effet, on remarque une diminution de la radioactivité correspondante à l' α MeG (50 % au lieu de 76,5 %) et une augmentation de celle de dérivés phosphates (21,5 % au lieu de 9 %) et du produit à l'origine (14 % au lieu de 4 %).

La présence d'un produit à l'origine a également été observée chez R. leguminosarum (Glenn et coll., 1984). Après une chromatographie dans un système solvant composé de butanol / éthanol / eau (4 : 3 : 2), ce produit représentait 15 % - 20 % de la radioactivité totale d'un extrait réalisé après une accumulation de α MeG (50 μ M) par cette souche durant 10 min. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ce pic serait composé de la radioactivité liée à des protéines.

D'après ces résultats, on peut conclure que :

- l' α MeG est métabolisé par notre souche,
- l' α MeG et probablement le glucose sont accumulés sous une forme inchangée et ne sont donc pas phosphorylés durant le transport.

1.4. Action des inhibiteurs métaboliques

L'action des inhibiteurs métaboliques lors de l'accumulation du glucose nous renseigne sur le besoin énergétique des cellules pour réaliser ce processus et, éventuellement, sur la nature des donateurs énergétiques impliqués.

Pour cette étude, on a réalisé des cinétiques d'accumulation du glucose en présence d'inhibiteurs à des concentrations variables, ajoutés 30 s avant l'addition de ce substrat.

Les résultats (figure 14) sont exprimés en accumulation relative déterminée après 5 min d'accumulation et par rapport à des cinétiques témoins sans inhibiteur.

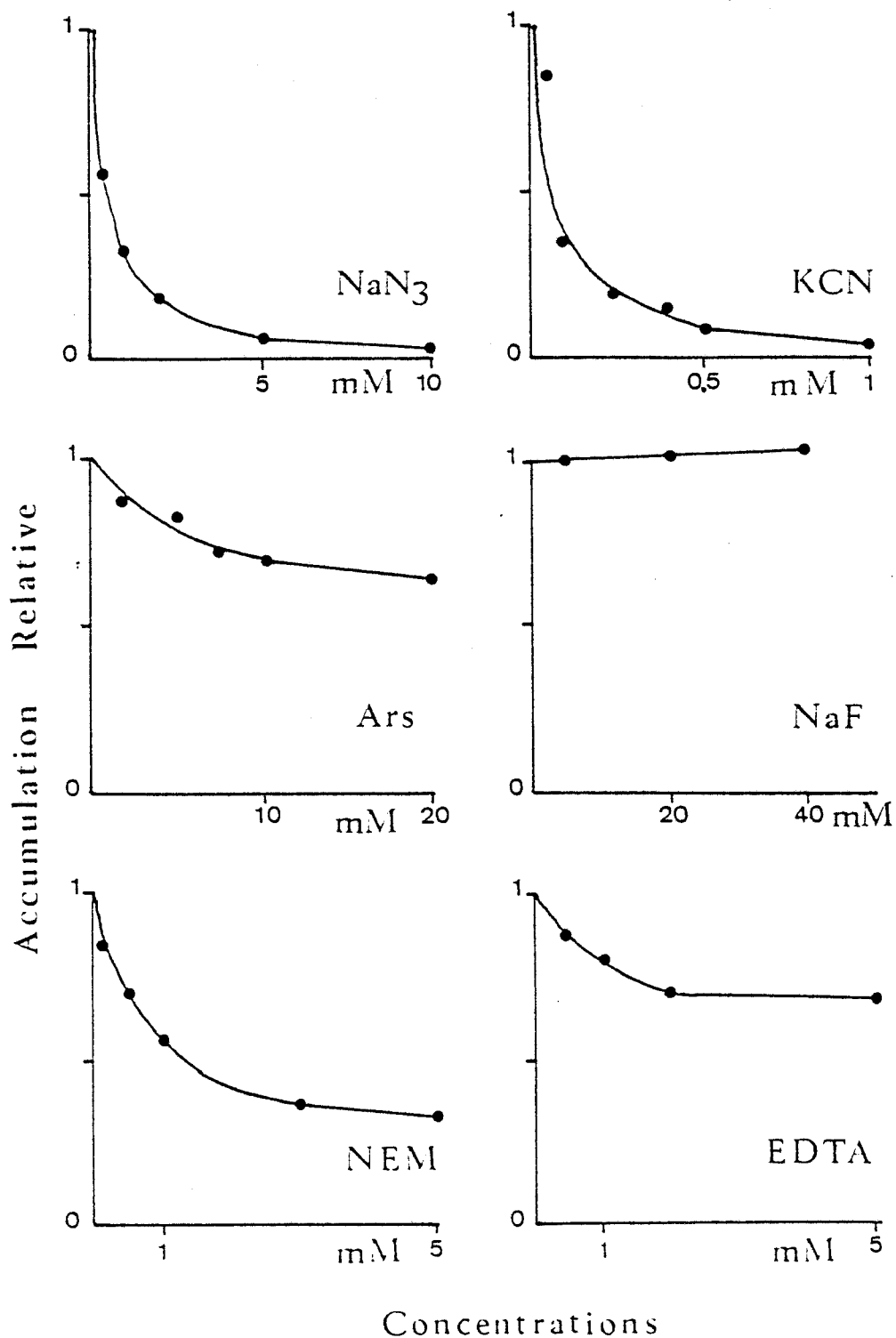


Figure 14 : Action des différents inhibiteurs métaboliques à concentration variable sur l'accumulation du glucose. Les inhibiteurs sont ajoutés 30 s avant l'addition du ¹⁴C-glucose. L'accumulation relative est déterminée après 5 min d'accumulation et par rapport à des cinétiques témoins.

On remarque une diminution rapide et importante de l'accumulation du glucose en présence des découplants énergétiques tels que l'azide de sodium (NaN_3) et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire tel que le cyanure de potassium (KCN). Ces composés présents à des concentrations faibles, 1 et 10 mM respectivement pour le KCN et le NaN_3 , inhibent complètement l'accumulation du glucose.

Par contre, le fluorure de sodium (NaF), même à des concentrations élevées, n'a pas d'action sur ce transport. De façon similaire, l'arseniate de sodium ne réduit pas celui-ci d'une manière importante. Smart et coll. (1984) suggèrent que ce manque d'inhibition par l'arseniate serait dû à l'impossibilité de ce composé de pénétrer dans le cytoplasme.

La N-éthyl maléimide (NEM), qui réagit avec les groupements -SH des protéines, inhibe l'accumulation du glucose à des concentrations entre 3 et 5 mM. Ceci indique que des groupements -SH libres sont nécessaires pour avoir des vitesses d'accumulation maximales. On a également étudié l'effet du NEM en présence d'un excès de glucose. Pour cela, on a comparé des cinétiques d'accumulation, d'une part, du glucose 0,01 mM en présence ou en absence du NEM (5 mM) et, d'autre part, du glucose 0,01 mM plus du glucose non radioactif 1 mM également en présence ou en absence du NEM (5 mM).

On a constaté que l'excès du glucose ne protège pas totalement la perméase de l'inactivation due au NEM. En effet, on trouve une activité résiduelle de 55 % en présence d'un excès de glucose au lieu de 33 % en l'absence de celui-ci.

Ces résultats suggèrent que :

- le site de fixation du substrat possède une petite partie des groupements -SH situés sur la perméase,

- la majorité de ces groupements et le site de fixation du substrat sont séparés.

L'EDTA sel de potassium, qui complexe les cations bivalents, cause une faible inhibition (35 % à la concentration de 5 mM) de l'accumulation du glucose.

Afin d'identifier les cations bivalents nécessaires pour l'établissement des vitesses d'accumulation maximales, on a étudié l'effet de différents cations, ajoutés dans le milieu réactionnel sous forme de sulfates, sur le transport du glucose (tableau 9).

On constate que les ions Mg^{2+} restaurent partiellement l'inhibition causée par l'EDTA_K, tandis que les ions Mn^{2+} restaurent totalement celle-ci. Ces deux cations sont nécessaires pour le bon fonctionnement du système perméasique. Par contre, les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} provoquent une inhibition supplémentaire de l'accumulation du glucose.

D'après les résultats décrits dans ce paragraphe et résumés dans le tableau 10, on peut conclure que :

- l'accumulation du glucose est réalisée par un mécanisme actif, grâce à l'énergisation de la membrane plasmique par le transport d'électrons de la chaîne respiratoire ;

- le "pool" d'ATP intracellulaire issu du métabolisme intermédiaire n'intervient pas dans l'énergisation de la membrane. Néanmoins il est possible que l'ATP formé par la chaîne respiratoire soit utilisé par l'intermédiaire d'une ATPase membranaire. Ce mécanisme est cependant plus coûteux que l'énergisation directe, car le stockage de l'énergie sous forme de liaisons pyrophosphates implique une perte importante de celle-ci. De plus, chez les bactéries, la chaîne respiratoire se situant au niveau de la membrane plasmique, il est plus avantageux et plus commode, en aérobie, d'utiliser directement l'énergie produite ;

- la perméase possède des groupements -SH libres, mais la majorité de ceux-ci ne se trouvent pas sur le site de fixation du glucose. Ces groupements sont nécessaires pour une activité perméasique optimale ;

- les ions Mn^{2+} et Mg^{2+} sont nécessaires pour le bon fonctionnement du système d'accumulation.

Tableau 9 : Inhibition de l'accumulation du glucose par l'EDTA_K
et effets des cations bivalents sur cette inhibition.

L'EDTA est ajouté 30 s avant l'addition du glucose et l'activité résiduelle est mesurée après une accumulation de 5 min.

	Concentration (mM)	% d'activité résiduelle
Témoin		100
EDTA _K	5	65
+ Mg ²⁺	10	87,5
+ Mn ²⁺	10	100
+ Cu ²⁺	0,01	31
+ Zn ²⁺	0,01	31



Tableau 10 : Action des divers inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation du glucose

Inhibiteur	Concentration: (mM)	Mode de l'action inhibitrice	Pourcentage de l'activité résiduelle
NaN ₃	10	Découplant énergétique Inhibiteur de l'ATPase	6,2
C.C.C.P.	0,1	Découplant énergétique	3,8
DNP	1,5	Découplant énergétique	3,9
KCN	1	Chaîne respiratoire	4,5
NaF	40	Synthèse du PEP	104
Arseniate	20	Synthèse de l'ATP par glycolyse	64
NEM	5	Groupements -SH	33
NEM+glucose			55
EDTA _K	5	Complexant des cations	65
EDTA _K + Mg ²⁺			87,5
EDTA _K + Mn ²⁺			100

Abréviations non utilisées dans le texte :

C.C.C.P. = CarbonylCyanurée-m-ChloroPhénylhydrazone ;

DNP = 2-4 Dinitrophénol ;

NaF = fluorure de sodium.



1.5. Effet du pH sur l'accumulation

Afin d'étudier l'influence du pH sur l'activité perméasique, on a réalisé des cinétiques d'accumulation du glucose dans des solutions de TNP ajoutées à des pH différents. Les cellules employées pour ces essais ont été cultivées dans du milieu RHB₁ additionné de glucose.

La figure 15 représente l'activité perméasique en fonction du pH.

On constate que :

- l'accumulation du glucose est dépendante du pH. Elle est très faible aux pH acides et elle devient importante aux pH proches de la neutralité ;

- le pH optimum de l'activité perméasique est situé entre 7 et 8 unités pH.

1.6. Stabilité de la perméase au chauffage

Plusieurs lots de cellules (1 ml, D.O. = 1) ont été pré-incubés à différentes températures durant 10 min. Cette durée a été choisie arbitrairement, les résultats peuvent varier selon la valeur de ce paramètre. L'action thermique est alors stoppée en mettant ces lots dans de la glace et on réalise par la suite des essais d'accumulation du glucose 0,1 mM pendant 5 min.

Les résultats obtenus sont représentés par la figure 16.

On constate une augmentation légère (environ 5 %) de l'activité perméasique à 37°C, par rapport à celle mesurée à 30°C, température utilisée lors des cultures et des expériences d'accumulation. Ceci montre qu'une variation de + 7°C n'influence pratiquement pas l'activité perméasique. De ce fait, l'erreur éventuelle, pouvant découler d'une augmentation faible de la température lors des expériences de perméation, est négligeable.

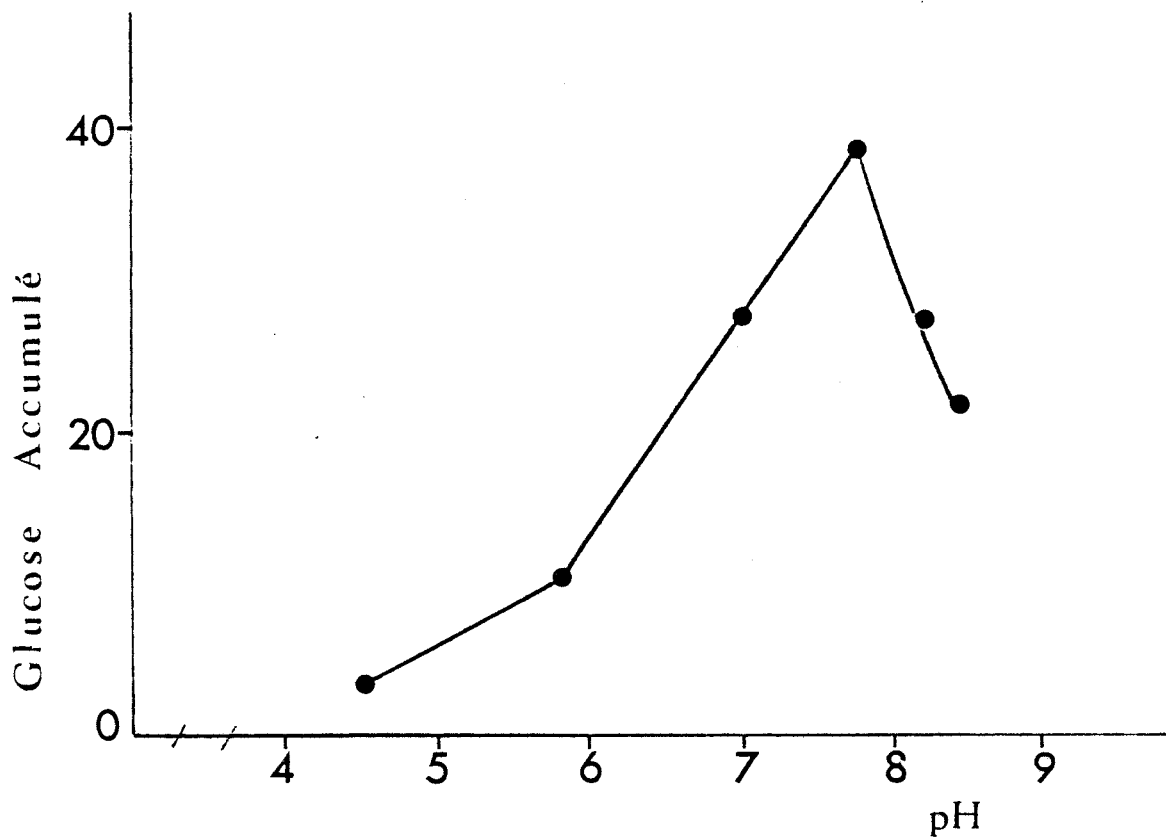


Figure 15 : Effet du pH sur l'accumulation.



Le glucose accumulé est exprimé en nmoles/mg de protéines x min.

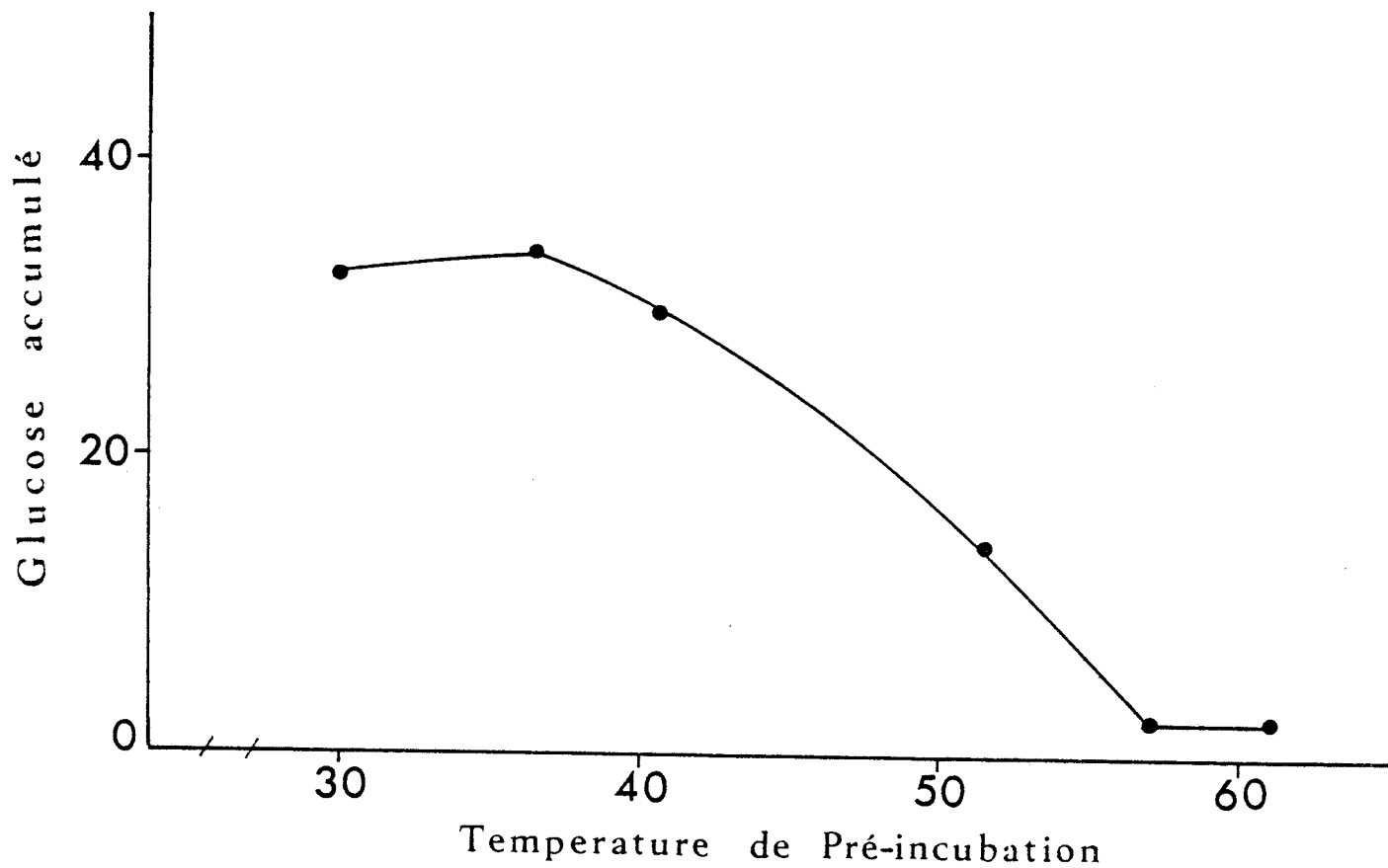


Figure 16 : Stabilité de la perméase au chauffage.



Accumulation du glucose 0,1 mM par des cellules pré- incubées à différentes températures durant 10 min. Le glucose accumulé est exprimé en nmoles/mg de protéines x min.

Au contraire, à partir de 37°C, l'activité perméasique décroît pour devenir presque nulle à 57°C.

1.7. Etude de la nature "enzymatique" du système de transport

L'étude de la nature "enzymatique" du système de transport a été entreprise en mesurant, à différentes concentrations, les vitesses initiales de l'accumulation du glucose.

On a été très rapidement confronté à des problèmes techniques principalement dûs à l'utilisation des cellules entières. De ce fait, le substrat accumulé est par la suite métabolisé et ce métabolisme a pour effet de mesurer des vitesses d'accumulation relatives et probablement inférieures à la normale.

De même, lorsqu'on utilise une suspension cellulaire de densité importante (concentration en "enzyme" élevée) pour l'accumulation du glucose présent à une concentration faible, on obtient des cinétiques d'accumulation non linéaires, puisque les cellules accumulent très rapidement tout le glucose disponible.

Dans le cas contraire, c'est-à-dire avec des concentrations cellulaires faibles et des concentrations en glucose élevées, on observe des phénomènes d'adsorption qui se traduisent par une surestimation du substrat accumulé durant les premières secondes.

1.7.1. Détermination d'une concentration cellulaire optimale

Afin de diminuer le plus possible ces interférences, on a réalisé des cinétiques d'accumulation très courtes de 10, 20, 40 et 60 secondes et on a recherché une concentration cellulaire pour laquelle on obtient des cinétiques linéaires en fonction des temps indiqués et des concentrations en glucose utilisées.

A cet effet, nous avons étudié l'accumulation du glucose utilisé à des concentrations allant de 0,5 à 10 μM par des suspensions

cellulaires de densité variable (D.O. = 1 ; D.O. = 0,5 et D.O. = 0,3). On a constaté que les vitesses d'accumulation sont linéaires durant au moins 1 minute avec une suspension cellulaire de D.O. = 0,3. Un exemple de ces résultats est présenté sur la figure 17.

1.7.2. Détermination des paramètres cinétiques du système

Les vitesses initiales d'accumulation (V_i) sont obtenues en mesurant la radioactivité intracellulaire après avoir incubé la suspension cellulaire (D.O. = 0,3) avec du D-(U- 14 C) glucose aux concentrations entre 0,5 et 10 μ M durant 10, 20, 40 et 60 secondes.

On remarque que les V_i , exprimées en nmoles de glucose accumulé/mg de protéines x min, sont en relation avec la concentration du glucose dans le milieu d'incubation ; le processus d'accumulation est saturable et de type Michaelien (figure 18).

Les valeurs de la constante d'affinité (K_m) et la vitesse maximale d'accumulation (V_{max}) sont obtenues en exprimant les résultats selon la représentation en double réciproque de Lineweaver-Burk. Elles sont de 0,68 μ M et de 38,5 nmoles/mg de protéines x min, respectivement pour le K_m et la V_{max} .

II - DEVENIR DU GLUCOSE ACCUMULE

2.1. Mise en évidence des plateaux de fin d'accumulation

L'accumulation complète du glucose par RmM_5N_1 se traduit par l'apparition d'un plateau. On constate (figure 19) que les niveaux des plateaux de fin d'accumulation sont d'autant plus importants que la concentration en substrat au départ est grande. De plus, cette phase stationnaire est durable : nous avons pu constater sa stabilité durant au moins une heure.

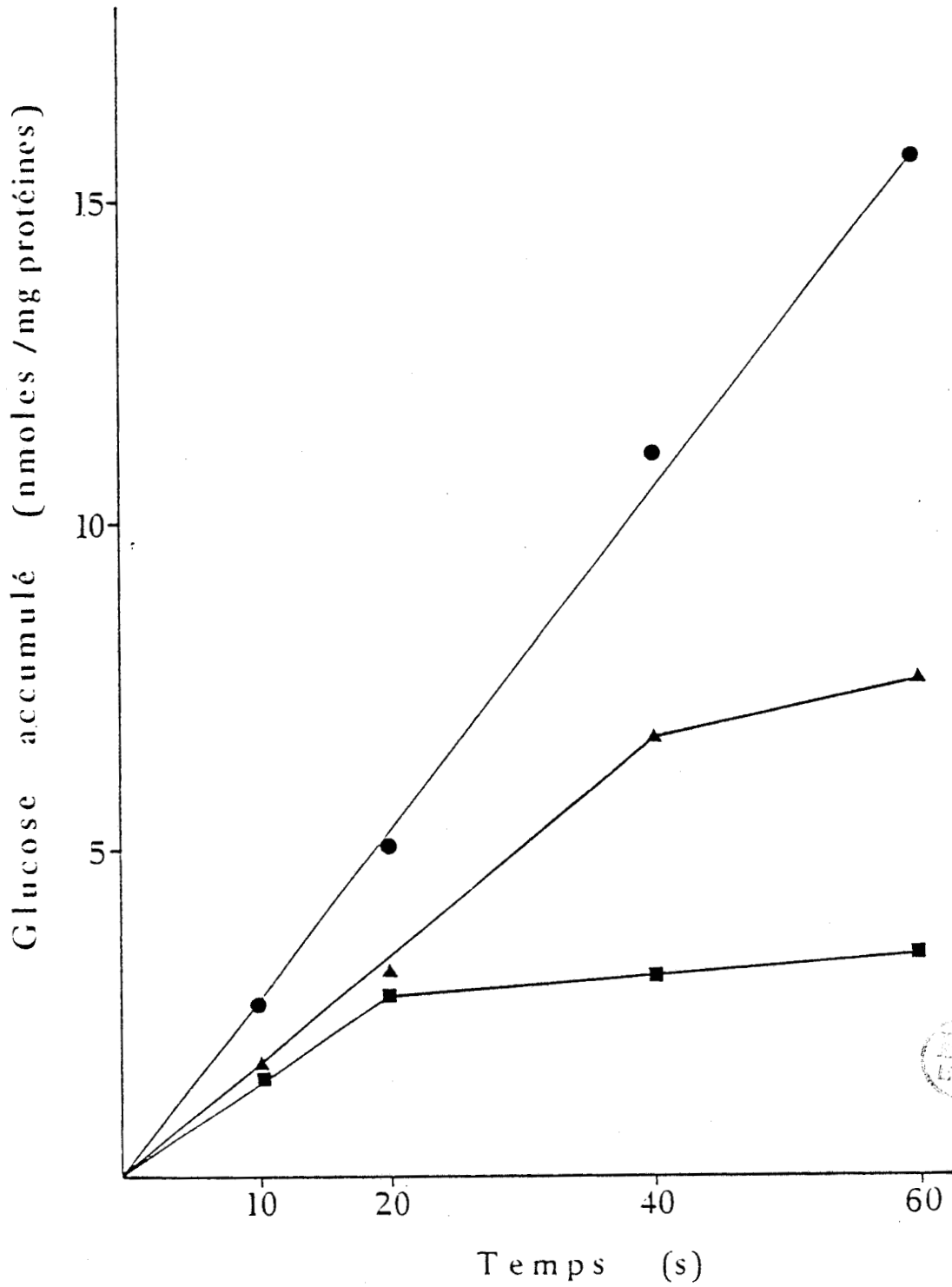


Figure 17 : Accumulation du glucose $3\mu\text{M}$ par des suspensions cellulaires de D.O. différentes mesurées à 600 nm. D.O. = 1 (■), D.O. = 0,5 (▲), D.O. = 0,3 (●).

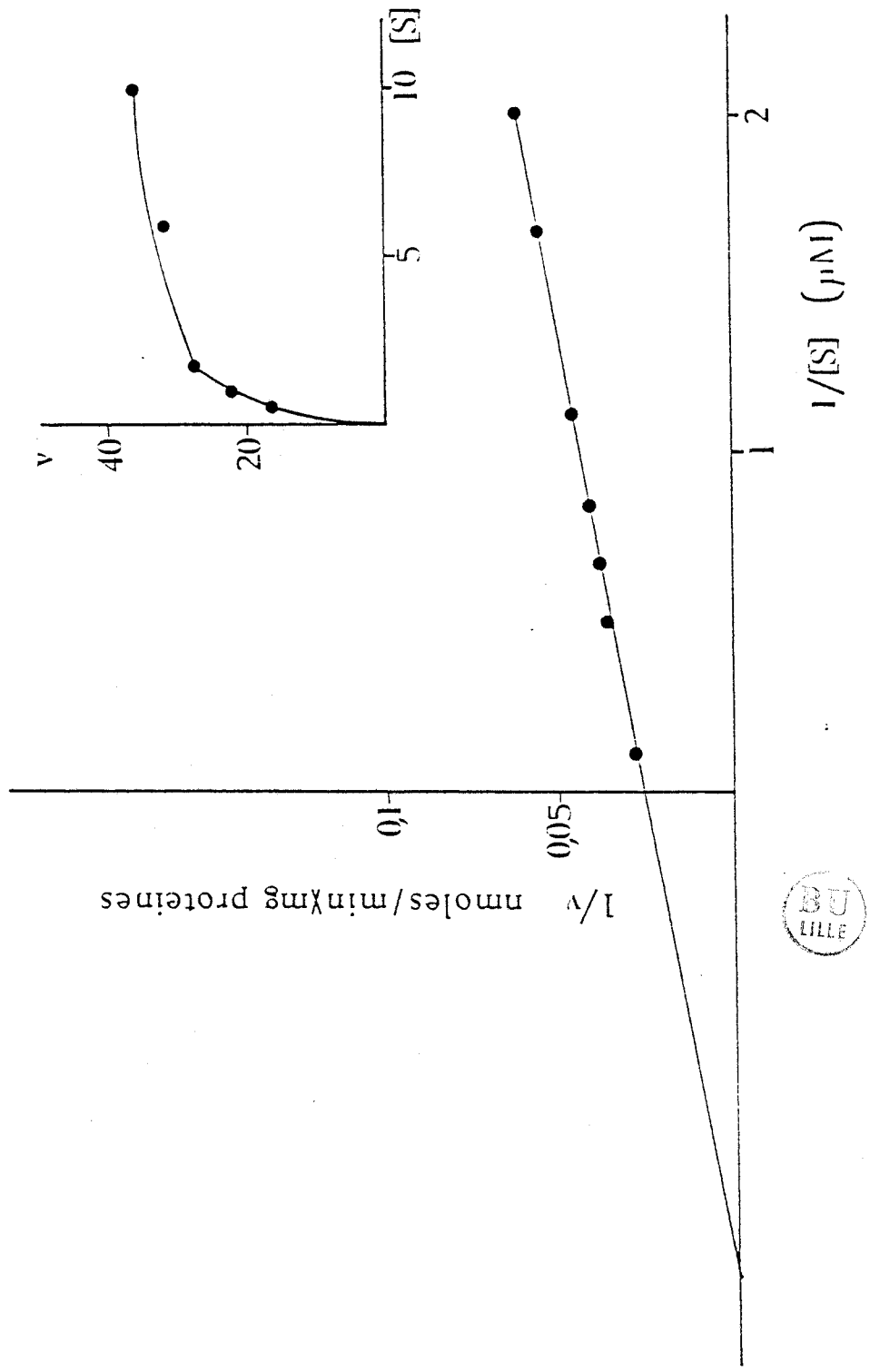


Figure 18 : Représentation en double réciproque de Lineweaver-Burk de la variation des vitesses initiales (V) d'accumulation en fonction de la concentration en glucose. En incrusté, sont représentés V en fonction de la concentration en substrat.

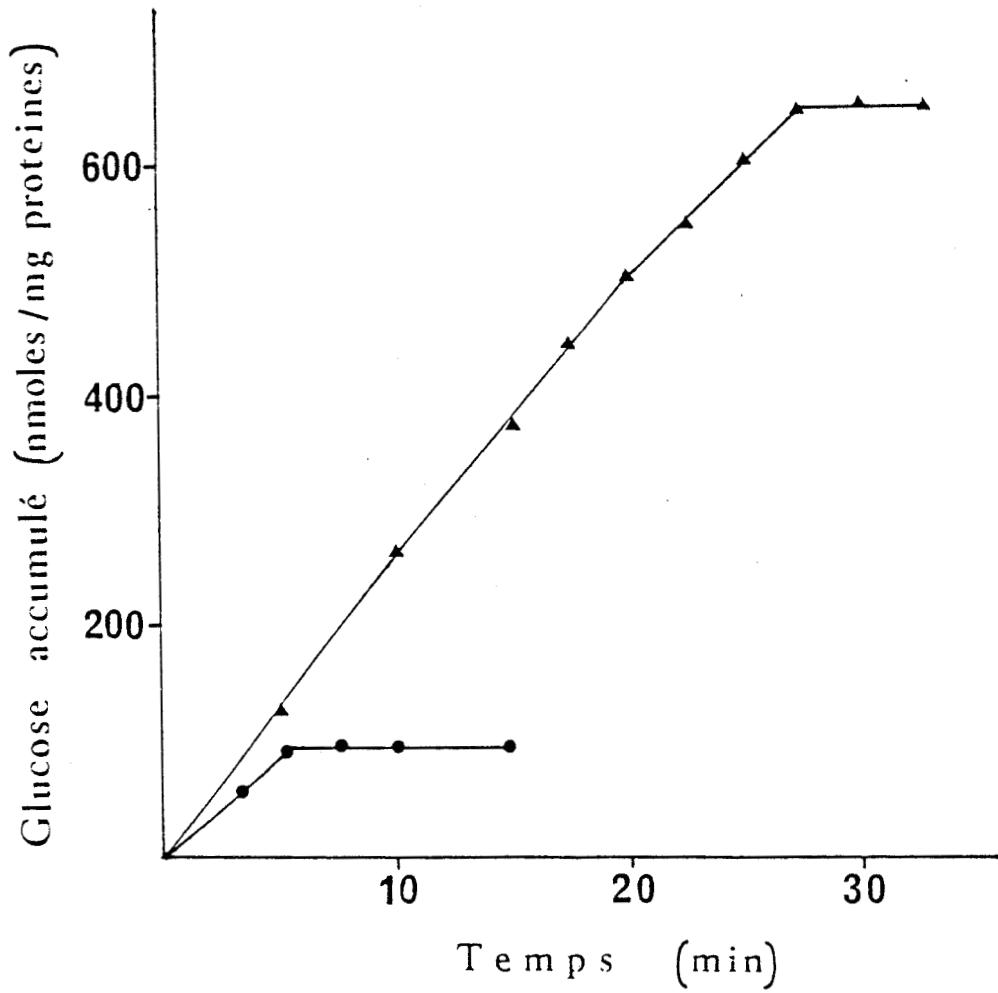


Figure 19 : Accumulation du glucose 0,025 mM (●—●) et 0,2 mM (▲—▲) par RmM_{51} .



Des résultats similaires ont été rapportés chez P. aeruginosa (Eagon, 1971) et chez Bacillus brevis (Asatani et Kurahashi, 1977). Pour cette dernière espèce, les auteurs expliquent la présence d'un plateau stable par un éventuel équilibre entre le transport et l'accumulation d'intermédiaires métaboliques en même temps que l'utilisation catabolique des hydrates de carbone.

2.2. Action de l'azide de sodium au cours de l'accumulation

L'azide de sodium (NaN_3), ajouté à la concentration finale de 4 ou de 10 mM au cours de l'accumulation du glucose 0.01 mM, inhibe celle-ci immédiatement (figure 20). Cet arrêt est caractérisé par l'apparition d'un plateau indiquant l'absence de sortie du produit accumulé.

2.3. Efflux des produits intracellulaires après une accumulation du glucose, du 2-désoxy-glucose et de l' α -méthyl-glucose

Afin de comprendre les phénomènes conduisant à la stabilité du plateau, nous avons chassé le glucose accumulé à différents moments par une grande quantité de ce substrat (figure 21A). La sortie est d'autant moins importante que l'accumulation est longue. Il est alors intéressant de voir le devenir des analogues structuraux du glucose 2DG et α MeG dans les mêmes conditions (figures 21B et 21C). Les résultats sont similaires : Rm₅N₁ assimile donc ces composés mais plus lentement que le glucose. En effet, après 5 min d'accumulation, 75 % de glucose sont assimilés contre 42,5 % et 32,5 % de 2DG et de α MeG respectivement.

Certains auteurs ont également observé une modulation, au niveau de la sortie des produits intracellulaires après une accumulation des dérivés azotés chez R. leguminosarum, en fonction du substrat utilisé pour la culture et de celui employé pour l'accumulation.

Lorsqu'ils réalisent l'accumulation de la méthylamine (Glenn et Dilworth, 1984) par des cellules cultivées sur ce même substrat, ils constatent que celui-ci dans sa majorité (85 %) est assimilé, c'est-à-

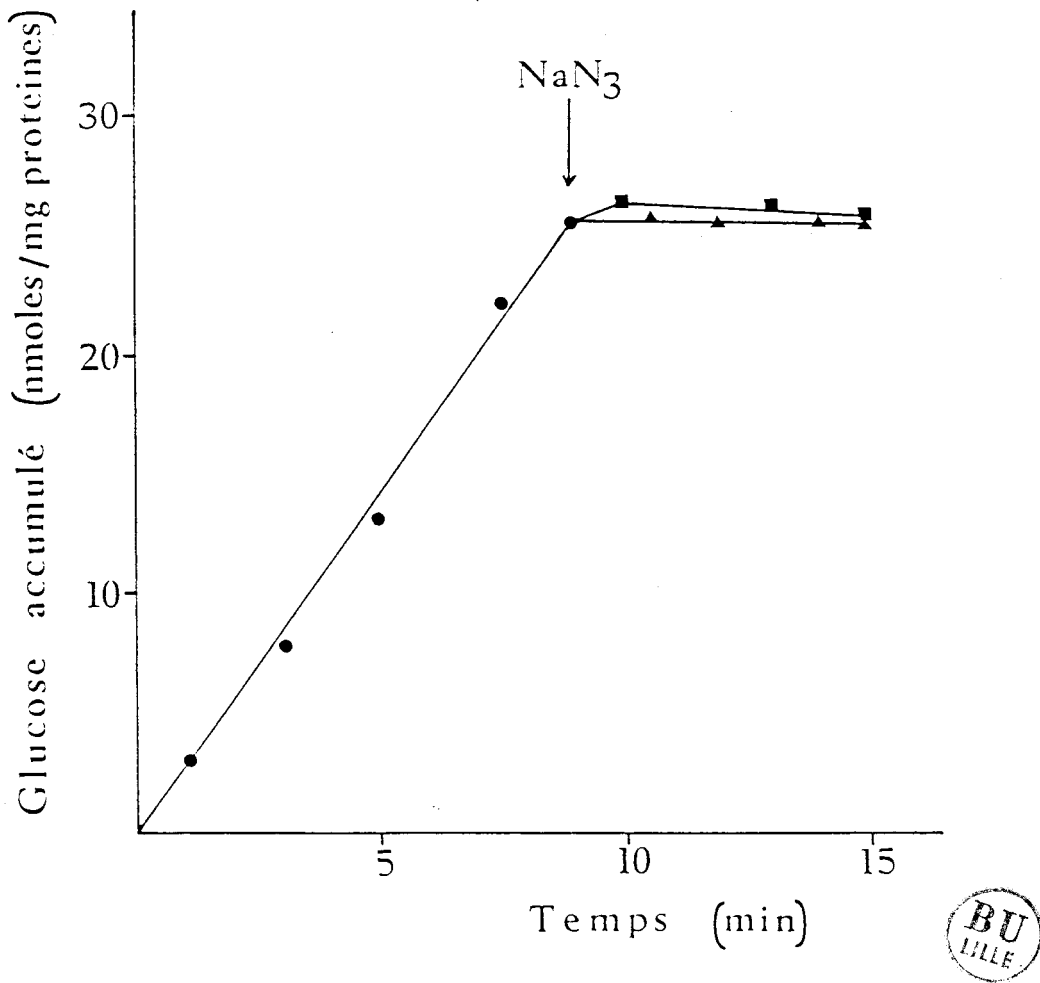


Figure 20 : Action de l'azide de sodium au cours de l'accumulation du glucose 0,01 mM.

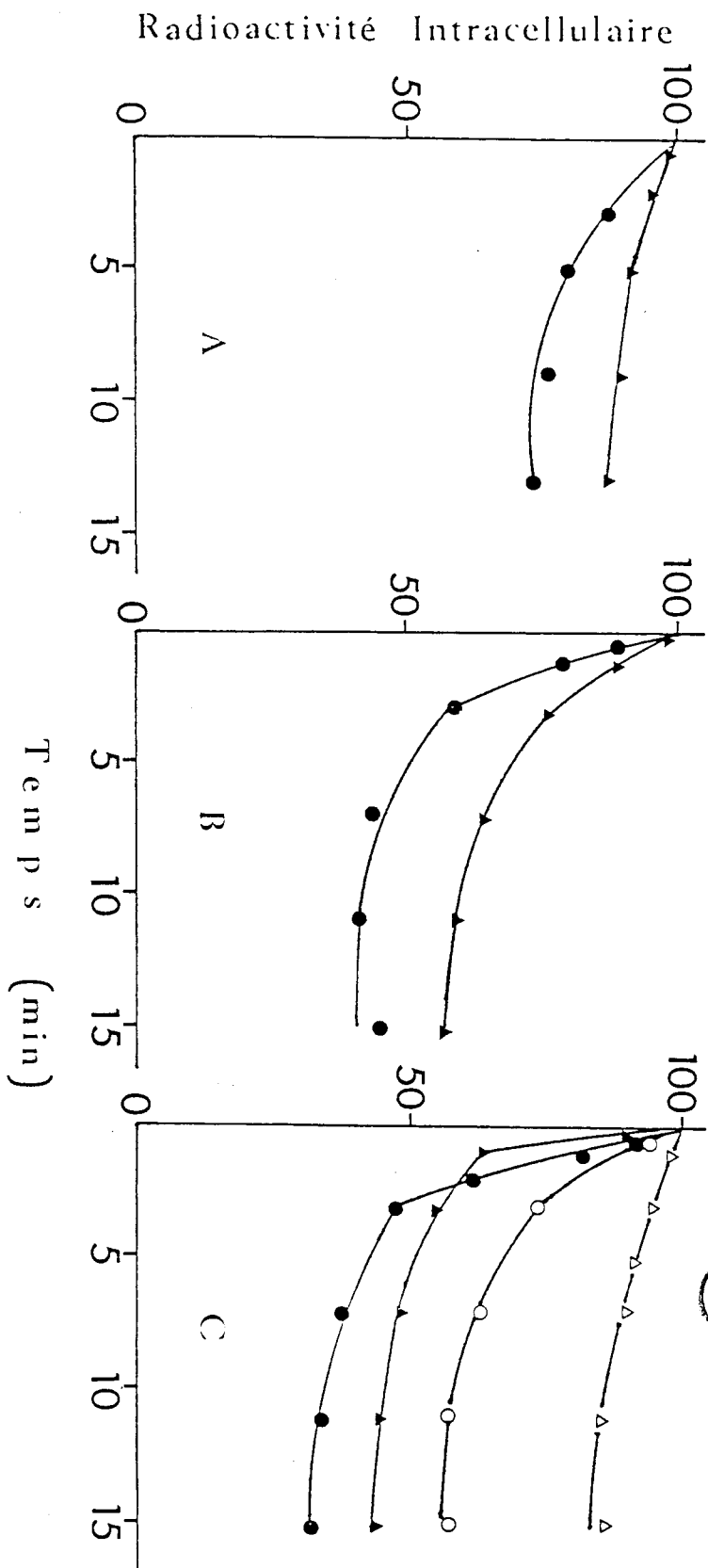


Figure 21 : Efflux des produits intracellulaires.

Le glucose (A), le 2DG (B) et l' $1'\alpha$ MeG (C) sont chassés après avoir été préalablement accumulés par RmM_{5N_1} durant 5 min (●—●), 30 min (▲—▲), 40 min (○—○) et 60 min (△—△).

BU
LILLE

dire transformé en produits insolubles, précipitables par le TCA et ils n'observent pas de sortie provoquée par l'addition des découplants énergétiques ou par une surcharge de ce substrat.

Lors de l'étude du transport du glutamate, Poole et coll. (1985) ont observé que l'efflux des produits intracellulaires après une accumulation de la leucine par des cellules cultivées sur glutamate est différent de l'efflux après une accumulation du glutamate par des cellules cultivées sur ce même substrat.

- Après une accumulation de la leucine, la sortie des produits intracellulaires est totale lors de l'addition des découplants énergétiques ou du glutamate. Il faut noter que le métabolisme de la leucine par ces cellules est lent et que très peu (1,4 %) de ce substrat est assimilé en des produits précipitables au TCA.

- Après une accumulation du glutamate, la sortie des produits intracellulaires est partielle (environ 30 %).

D'après nos résultats et ceux des autres auteurs, il est vraisemblable que l'efflux des substrats accumulés est fonction de leur devenir dans la cellule et, plus particulièrement, du degré de leur assimilation.

2.4. Analyse du matériel accumulé

Nous avons étudié la nature des produits formés lors de l'accumulation du glucose par des cellules (D.O. = 1) préalablement cultivées sur ce même substrat.

2.4.1. Cinétiques d'accumulation

On a réalisé des cinétiques d'accumulation du glucose à des concentrations variables : une faible (0,005 mM) (figure 22), une relativement élevée (1 mM) (figure 23) et une intermédiaire (0,1 mM) (figure 24). Pour les deux concentrations extrêmes du glucose (0,005 mM et 1 mM), nous avons suivi, en plus, la disparition de ce substrat du milieu réactionnel.

Pendant la phase active de l'accumulation (du début jusqu'au plateau), nous constatons :

- que la radioactivité dans le milieu réactionnel diminue fortement (figures 22 et 23) ;

- à partir de la vingtième minute d'accumulation du glucose 1 mM (figure 23), une disparition de radioactivité due probablement à la production du $^{14}\text{CO}_2$. Cette production est assez importante, elle représente, au début du plateau, 34 % de la radioactivité initiale totale.

Pendant la phase stationnaire de l'accumulation (plateau), nous constatons que :

- la radioactivité présente dans le milieu diminue, mais beaucoup moins que durant la phase active. Dans le cas de l'accumulation du glucose 0,005 mM (figure 22), cette diminution est de l'ordre de 245 dpm/min, soit de 20 % pour la durée (43 min) du plateau mesuré ;

- la radioactivité intracellulaire diminue très peu, en tout cas beaucoup moins que la radioactivité du milieu. Dans le cas de l'accumulation du glucose 0,005 mM, cette diminution est de l'ordre de 4,7 %.

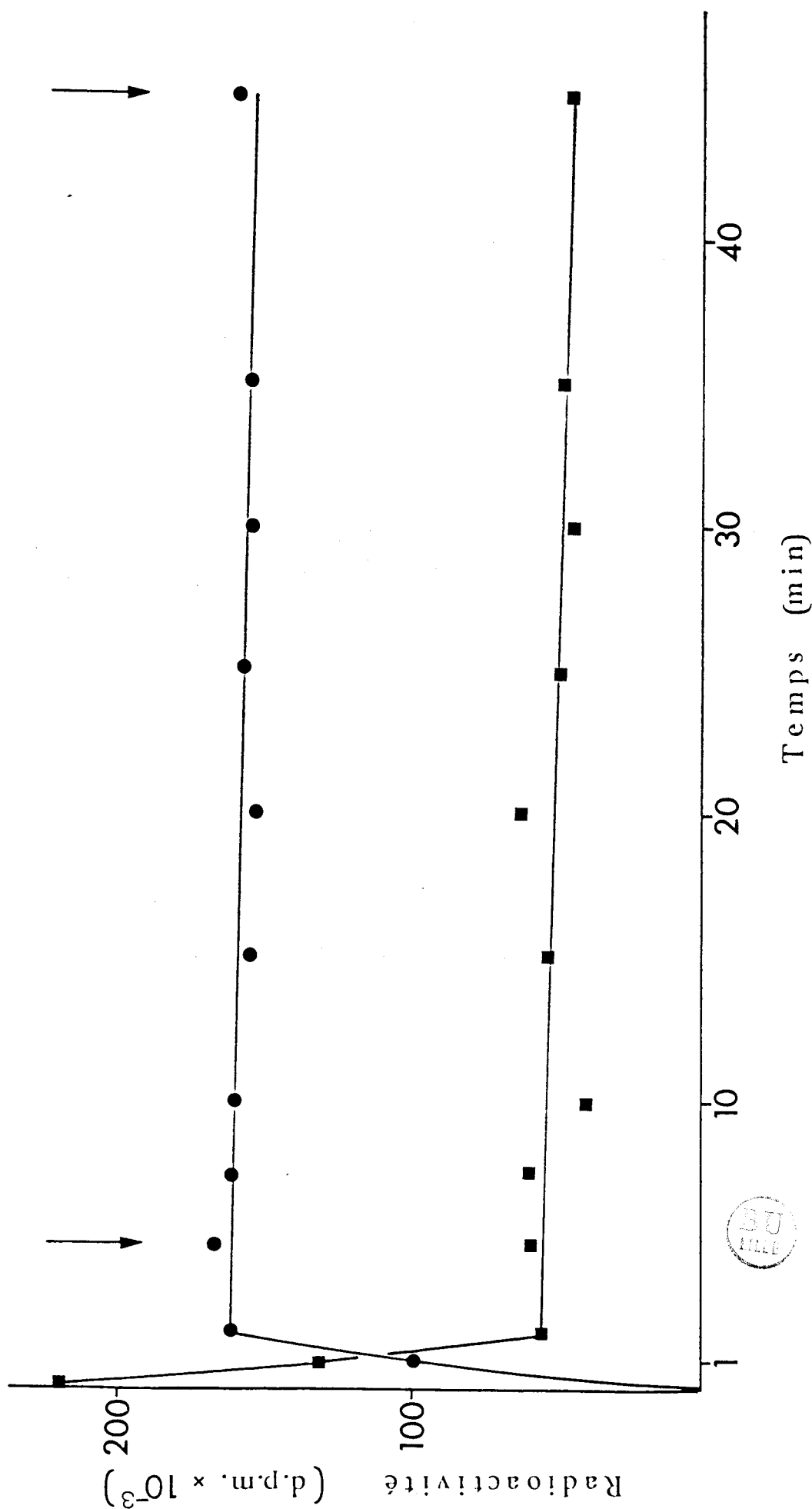


Figure 22 : Accumulation du glucose 0,005 mM (●—●) et suivi de la disparition de la radioactivité du milieu réactionnel (■—■).

Les flèches indiquent les temps auxquels les prélèvements pour la préparation des extraits ont été réalisés.

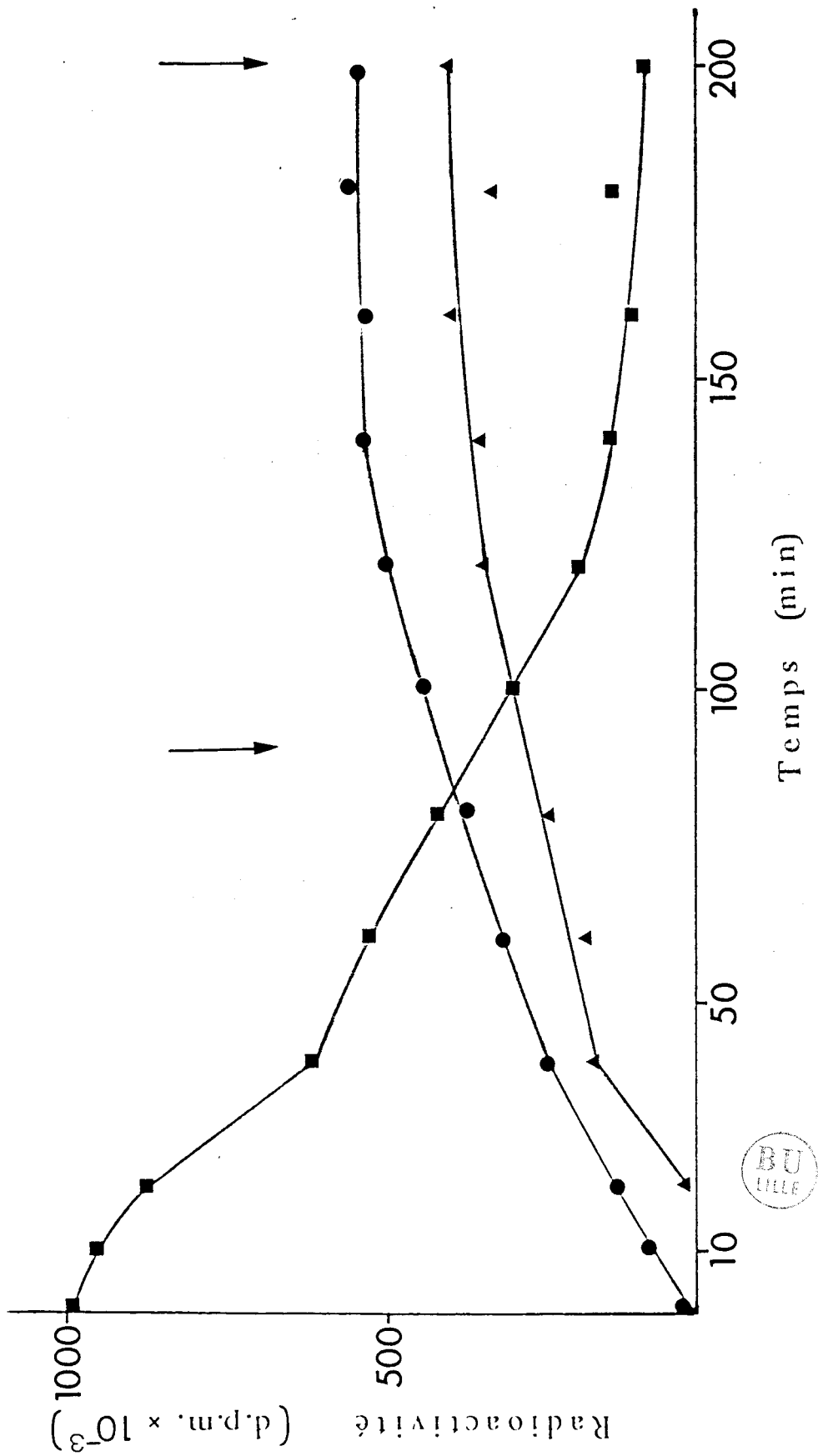


Figure 23 : Accumulation du glucose 1 mM (●—●) et suivi de la disparition de la radioactivité du milieu réactionnel (■—■).

La courbe (▲—▲) représente la radioactivité disparue au cours de l'incubation. Les flèches indiquent les temps auxquels les prélèvements pour la préparation des extraits ont été réalisés.

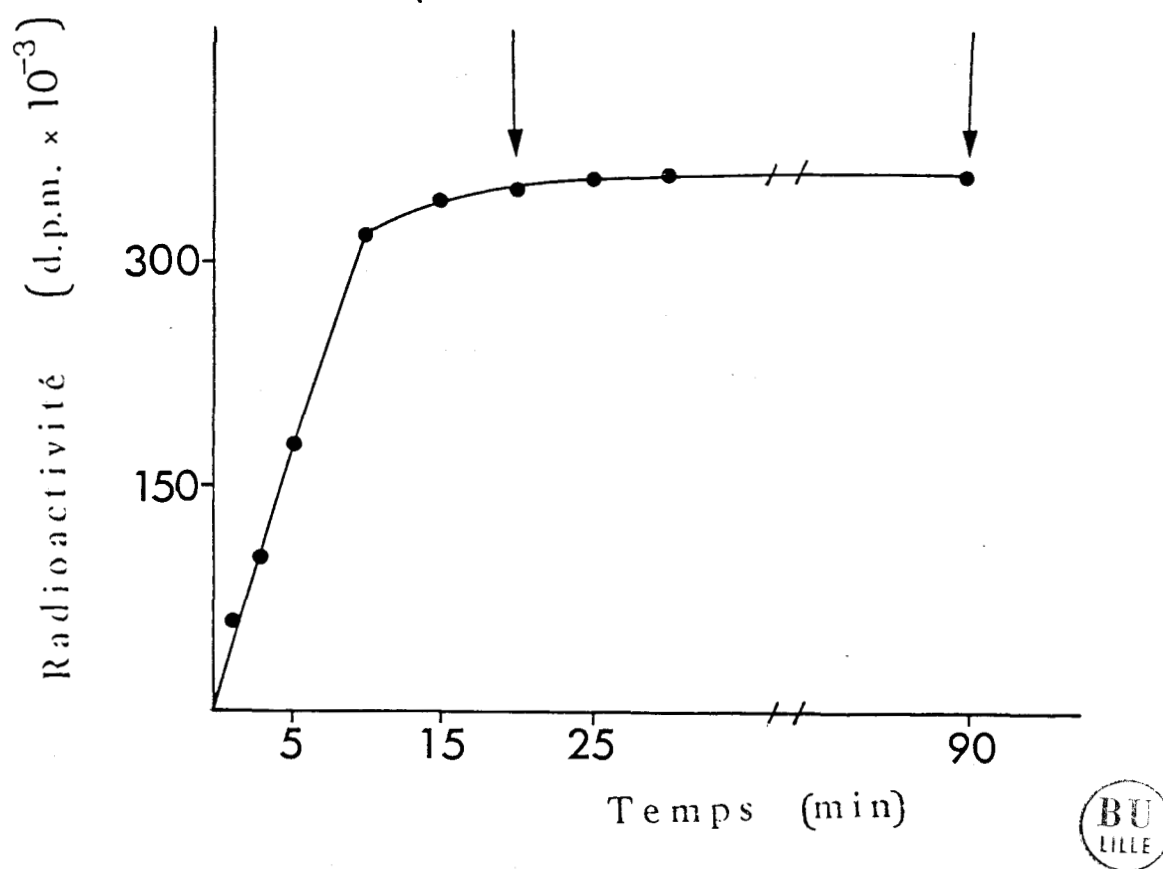


Figure 24 : Accumulation du glucose 0,1 mM.

Les flèches indiquent les temps auxquels les prélèvements pour la préparation des extraits ont été réalisés.

D'après ces deux observations, on peut conclure que :

- la stabilité du plateau n'est pas due à un équilibre entre l'entrée du glucose et la sortie des produits métaboliques ;
- au plateau le glucose est accumulé et métabolisé mais plus lentement que pendant la phase active de l'accumulation.

Au vu de ces résultats et, afin de mieux comprendre l'existence d'un plateau stable, nous avons tenté d'identifier les produits formés au plateau.

Pour ce faire, nous avons extrait à l'eau bouillante le matériel hydrosoluble contenu dans les cellules à des moments différents de l'accumulation, généralement, au début et à la fin du plateau (figures 22, 23 et 24).

Le rendement de l'extraction est faible, il est de l'ordre de 12 %.

2.4.2. Analyse des extraits obtenus

Les différents extraits sont d'abord analysés en chromatographie sur couche mince. Les profils de migration obtenus sont similaires (figures 25, 26, 27). Cependant, on observe une variation quantitative des produits élués en fonction du temps d'accumulation et ceci, quelle que soit la concentration du glucose accumulé. En effet, au niveau du plateau, on remarque une diminution du glucose et des différents intermédiaires, compensée par une augmentation d'un ou plusieurs produits qui ne migrent pas (P_0). Le tableau 11 résume les principales variations et le tableau 12, les coefficients de migration (R_f) des différents témoins.

Ce phénomène a été également constaté quand les extraits sont chromatographiés sur papier (figure 28). Cependant, on remarque que, par rapport au profil obtenu sur couche mince, P_0 représente plus de radio-

activité que les autres produits qui migrent, c'est-à-dire qu'une quantité importante des produits qui migrent sur couche mince ne migrent pas en chromatographie sur papier.

Les produits à l'origine sont également présents lors d'une électrophorèse sur papier (figure 29).

Cependant ceux-ci n'existent pas dans le milieu extracellulaire : celui-ci contient, dans sa grande majorité, du glucose et de l'acide gluconique (figure 30).

Des résultats similaires ont été rapportés lors de l'accumulation du fructose chez R. leguminosarum (Glenn et coll., 1984). Chez cette souche, après 15 min d'accumulation du fructose 0,1 mM, 15 % seulement de la radioactivité extraite à l'eau chaude était identifiée comme étant du fructose. Il est également intéressant de noter que 32 % de la radioactivité extraite n'a pas migré en chromatographie sur papier. Les produits correspondant à celle-ci n'ont pas été identifiés.

Nous avons, par la suite, tenté de définir la nature des produits Po. Pour cela, après une électrophorèse sur papier, nous avons découpé la bande à l'origine et nous avons élué à l'eau les produits contenus dans celle-ci avec un rendement d'environ 70 %. Ces produits ont été hydrolysés par l'ATFA et, après électrophorèse de l'hydrolysât (figure 31), on constate que :

- l'hydrolyse est partielle ;
- il y a formation d'un produit majeur qui migre un peu moins que le glucose.

D'après nos résultats, on peut dire que le métabolisme de notre souche, au plateau, est orienté vers la formation des produits qui ne migrent pas dans les supports et les systèmes solvants utilisés. Certains de ces produits sont chargés puisqu'ils migrent en électrophorèse mais non en chromatographie sur papier. La partie restante est constituée de produits de masse moléculaire telle que leur migration est limitée.

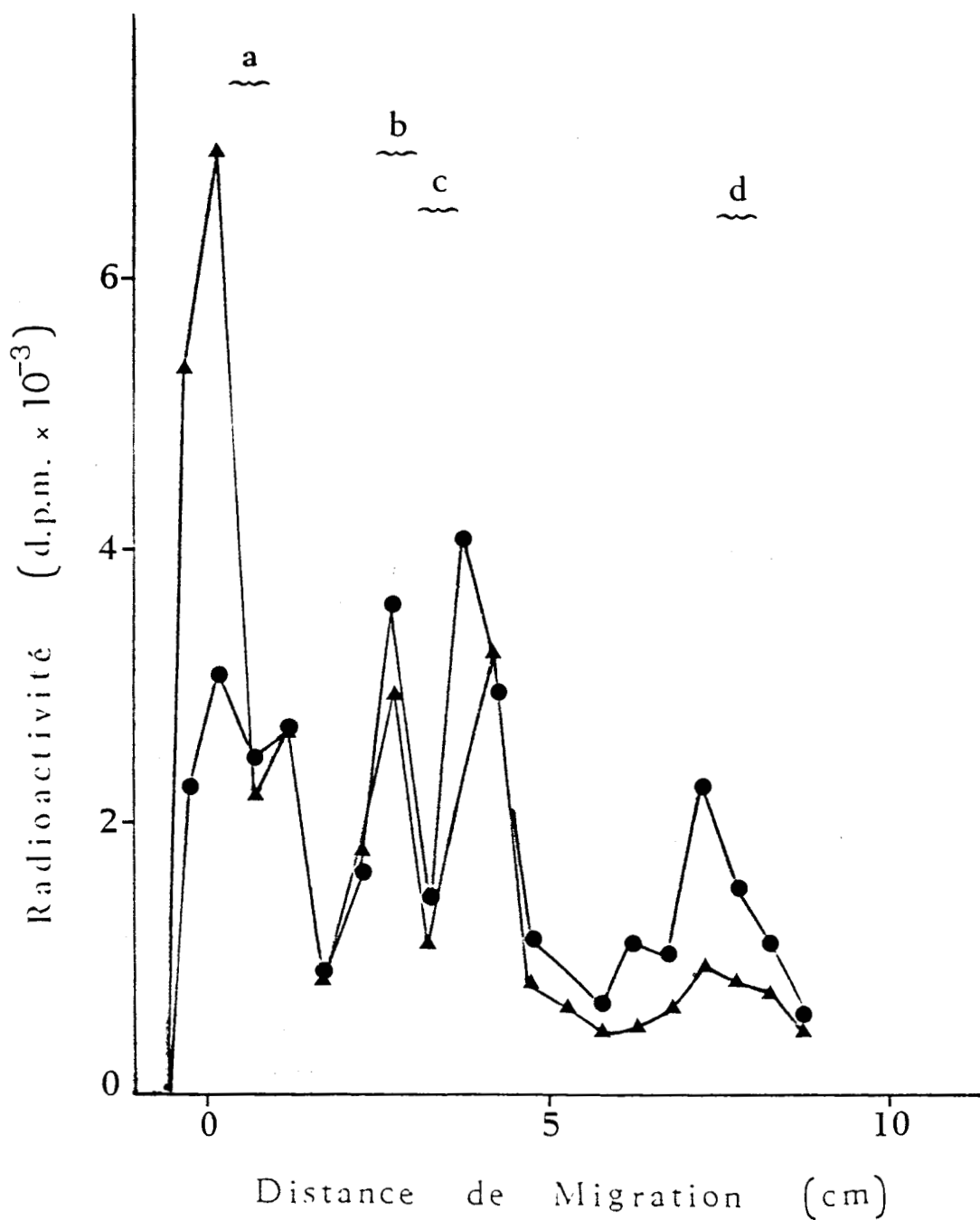


Figure 25 : Chromatographie sur couche mince des produits radiomarqués extraits après une accumulation du glucose 0,005 mM durant 5 min (●—●) et 45 min (▲—▲).

- (a) correspond à la distance de migration du fructose-1,6-diphosphate
- (b) correspond à la distance de migration du glucose-6-phosphate
- (c) correspond à la distance de migration de l'acide gluconique
- (d) correspond à la distance de migration du glucose.

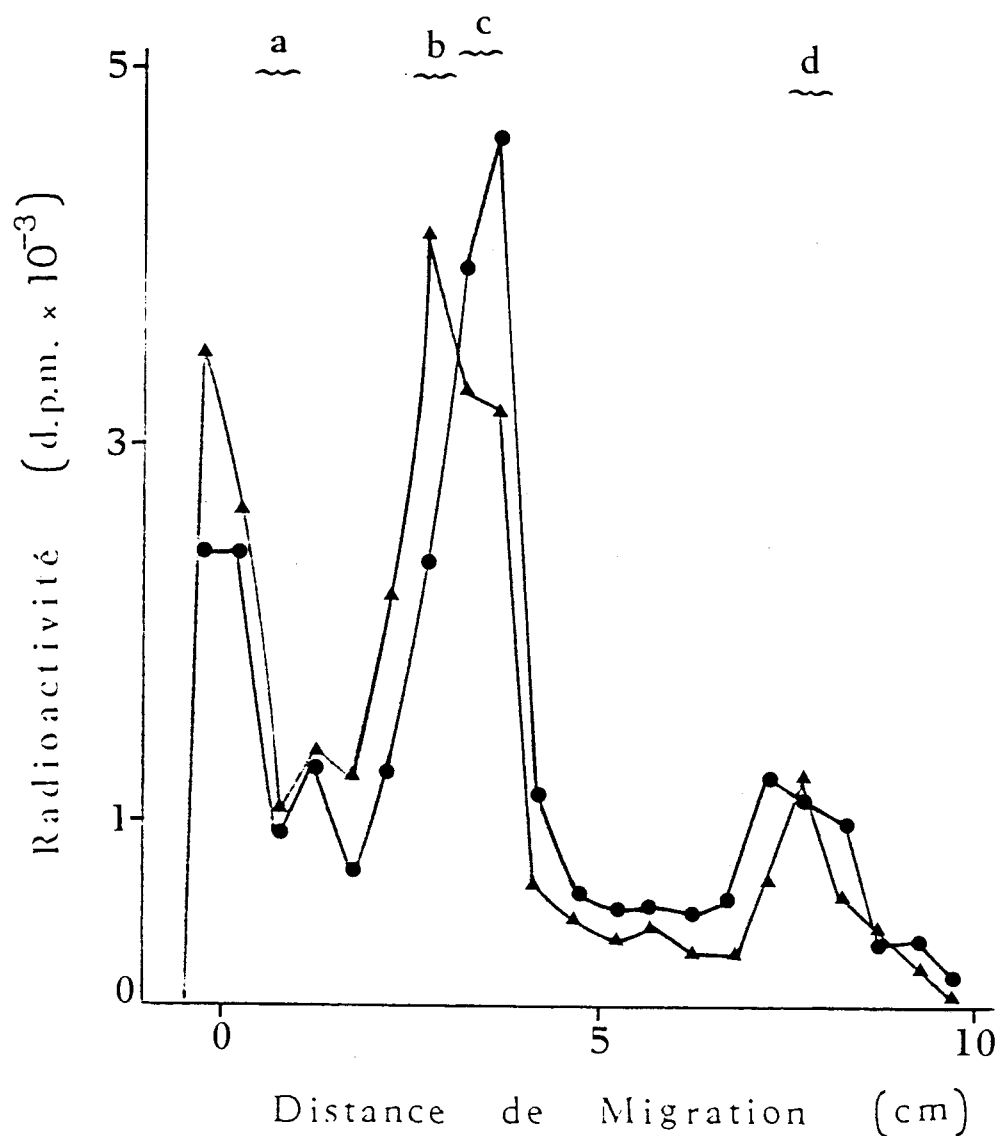


Figure 26 : Chromatographie sur couche mince des produits radiomarqués extraits après une accumulation du glucose 1 mM durant 90 min (●—●) et 200 min (▲—▲).

- (a) correspond à la distance de migration du fructose-1,6-diphosphate
- (b) correspond à la distance de migration du glucose-6-phosphate
- (c) correspond à la distance de migration de l'acide gluconique
- (d) correspond à la distance de migration du glucose.

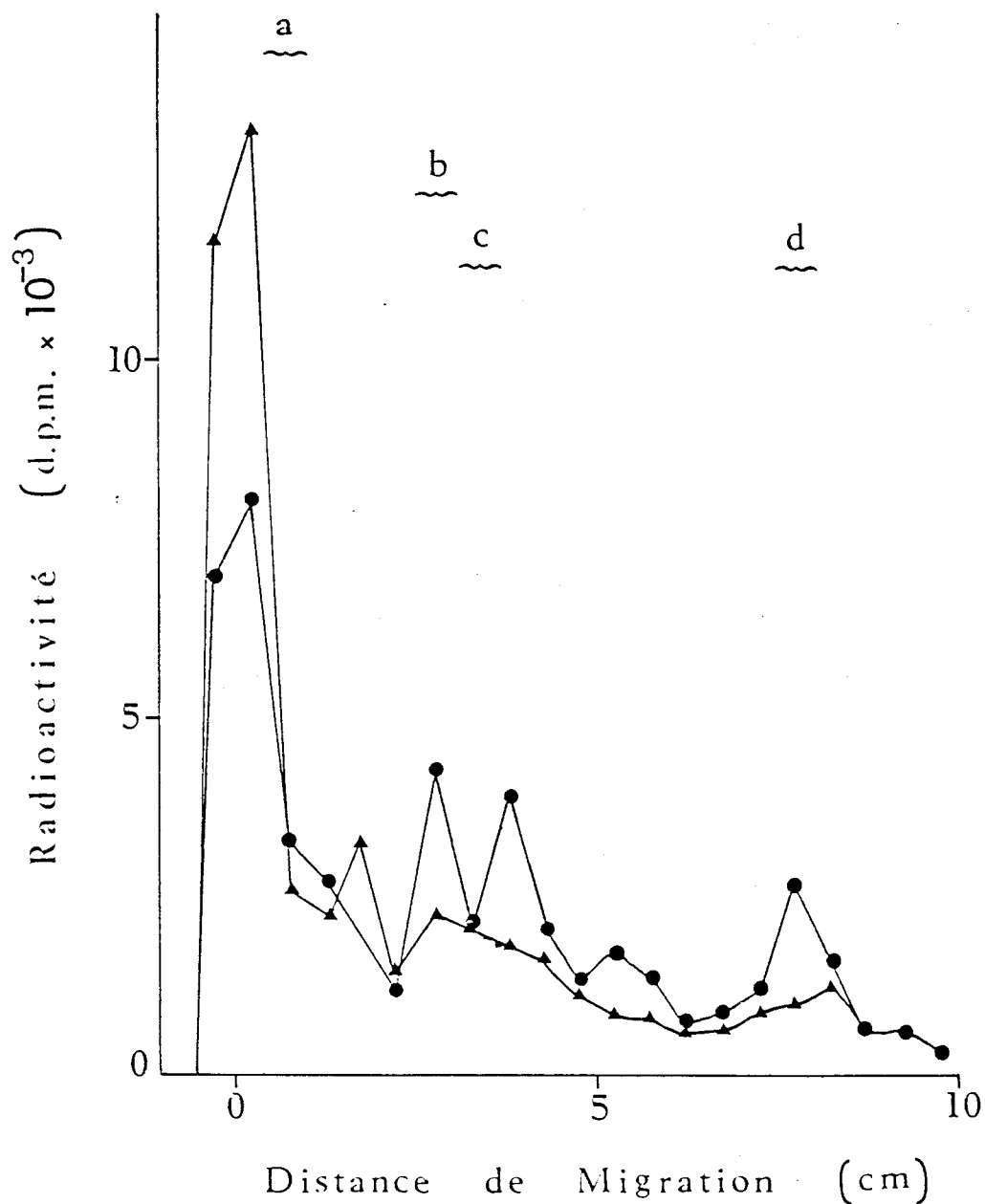


Figure 27 : Chromatographie sur couche mince des produits radiomarqués extraits après une accumulation du glucose 0,1 mM durant 20 min (●—●) et 90 min (▲—▲).

- (a) correspond à la distance de migration du fructose-1,6-diphosphate
- (b) correspond à la distance de migration du glucose-6-phosphate
- (c) correspond à la distance de migration de l'acide gluconique
- (d) correspond à la distance de migration du glucose.

Tableau 11 : Variation du contenu cellulaire après accumulation durant des temps variables de glucose à concentrations différentes

Les résultats sont obtenus après chromatographie sur couche mince des extraits.

COMPOSES	Pourcentage de radioactivité après une accumulation du glucose					
	0,005 mM		0,1 mM		1 mM	
	5 min	45 min	20 min	90 min	90 min	200 min
Glucose	9,2	4,4	8,6	4,5	7,5	7,7
Glucose-6-P	10,4	8,5	8,5	4,4	8,5	13,7
Produits à l'origine	15	34,9	29,7	48,9	17	22
Autres	65,4	52,2	53,2	40,2	67	56,6



Tableau 13 : Coefficients de migration des différents intermédiaires métaboliques obtenus en chromatographie sur couche mince.

! Témoins	:	Rf	!
! α MeG	:	1	!
! xylose	:	0,97	!
! glucose	:	0,94	!
! galactose	:	0,88	!
! hexasaccharide	:	0,77	!
! UDP-glucose	:	0,54	!
! acide-2-céto-gluconique	:	0,52	!
! acide gluconique	:	0,41	!
! glucose-6-phosphate	:	0,34	!
! glucose-1-phosphate	:	0,29	!
! fructose-1,6-diphosphate	:	0,08	!



$$Rf = \frac{\text{distance de migration d'un produit X}}{\text{distance de migration du produit qui migre le plus}}$$

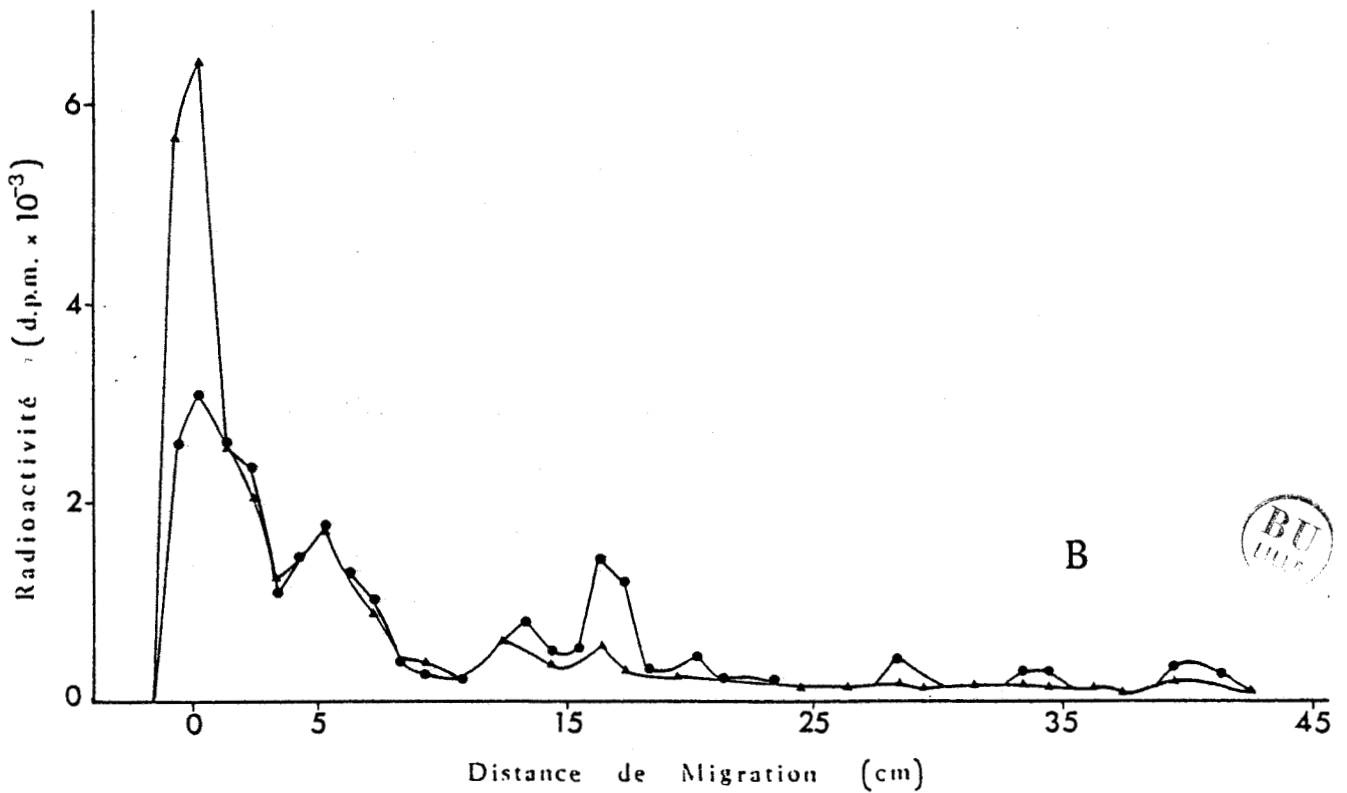
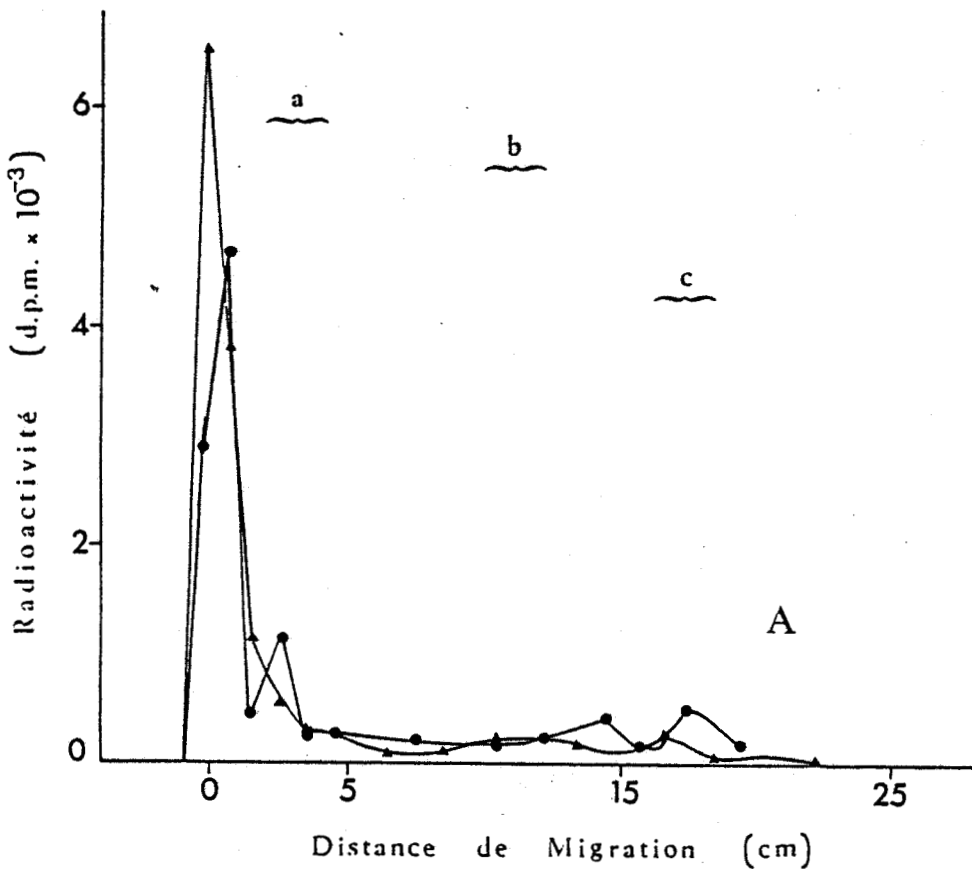


Figure 28 : Chromatographie sur papier des produits radiomarqués extraits après une accumulation du glucose 1 mM (A) durant 90 min (●—●) et 200 min (▲—▲) et du glucose 0,005 mM (B) durant 5 min (●—●) et 45 min (▲—▲).

(a) correspond à la distance de migration du glucose-6-phosphate

(b) correspond à la distance de migration du glucose et du 2-céto-gluconate

(c) correspond à la distance de migration du 5-céto-gluconate.

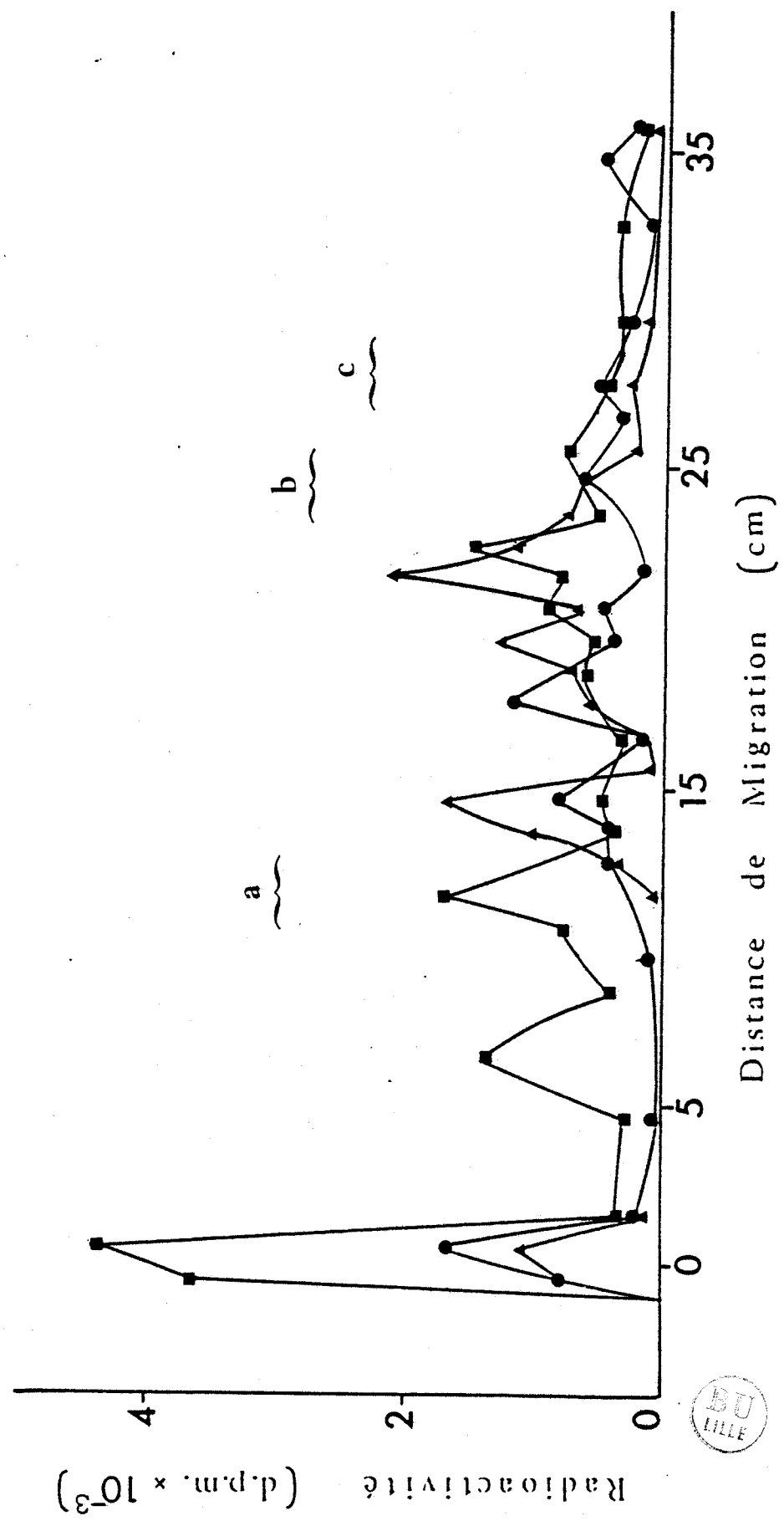
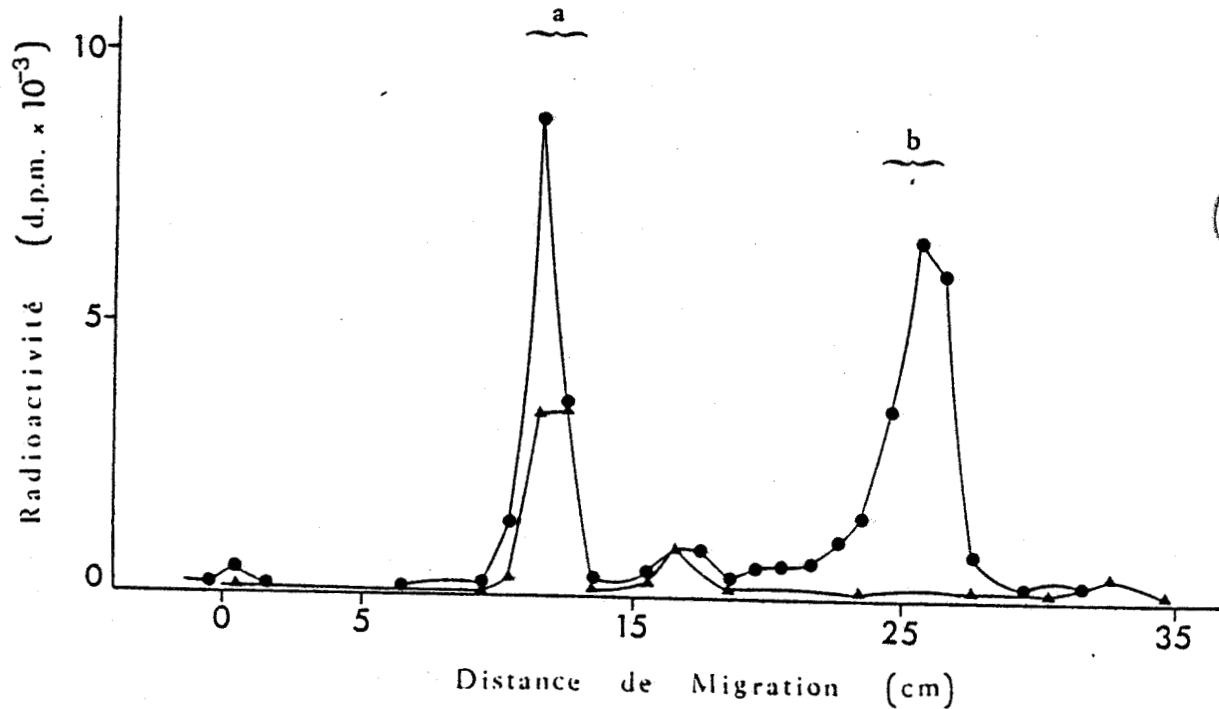
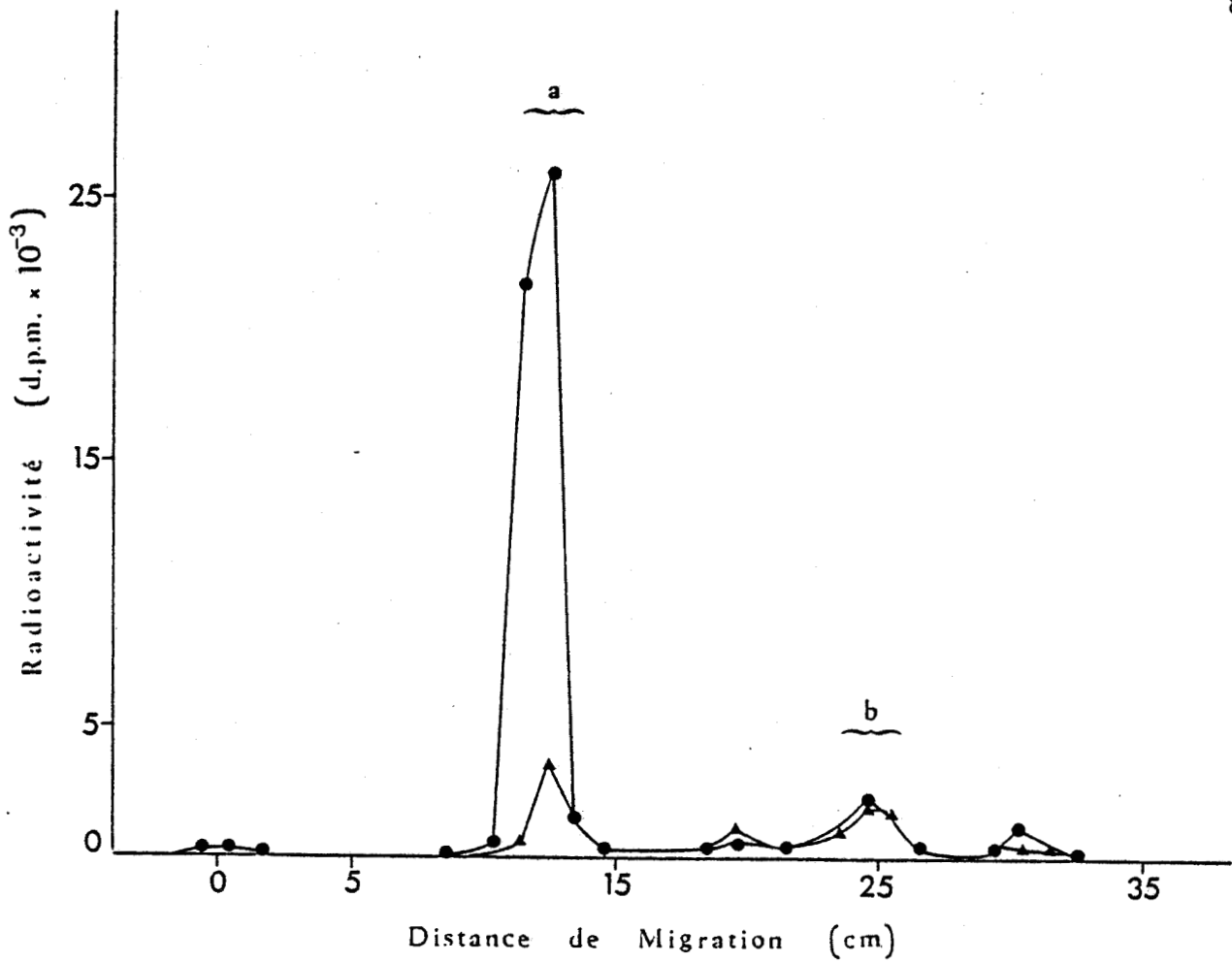


Figure 29 : Electrophorèse sur papier des produits radiomarqués extraits

- après une accumulation du glucose 1 mM durant 200 min ()
- après une accumulation du glucose 0,1 mM durant 90 min ()
- après une accumulation du glucose 0,005 mM durant 45 min ()

(a) correspond à la distance de migration du glucose
 (b) correspond à la distance de migration de l'acide gluconique
 (c) correspond à la distance de migration du glucose-6-phosphate.



BU
LILLE

Figure 30 : Electrophorèse sur papier des produits radiomarqués
 contenus dans le milieu extracellulaire
 - après une accumulation du glucose 1 mM (A) durant 90 min
 (●—●) et 200 min (▲—▲)
 - après une accumulation du glucose 0,005 mM (B) durant 5
 min (●—●) et 45 min (▲—▲).

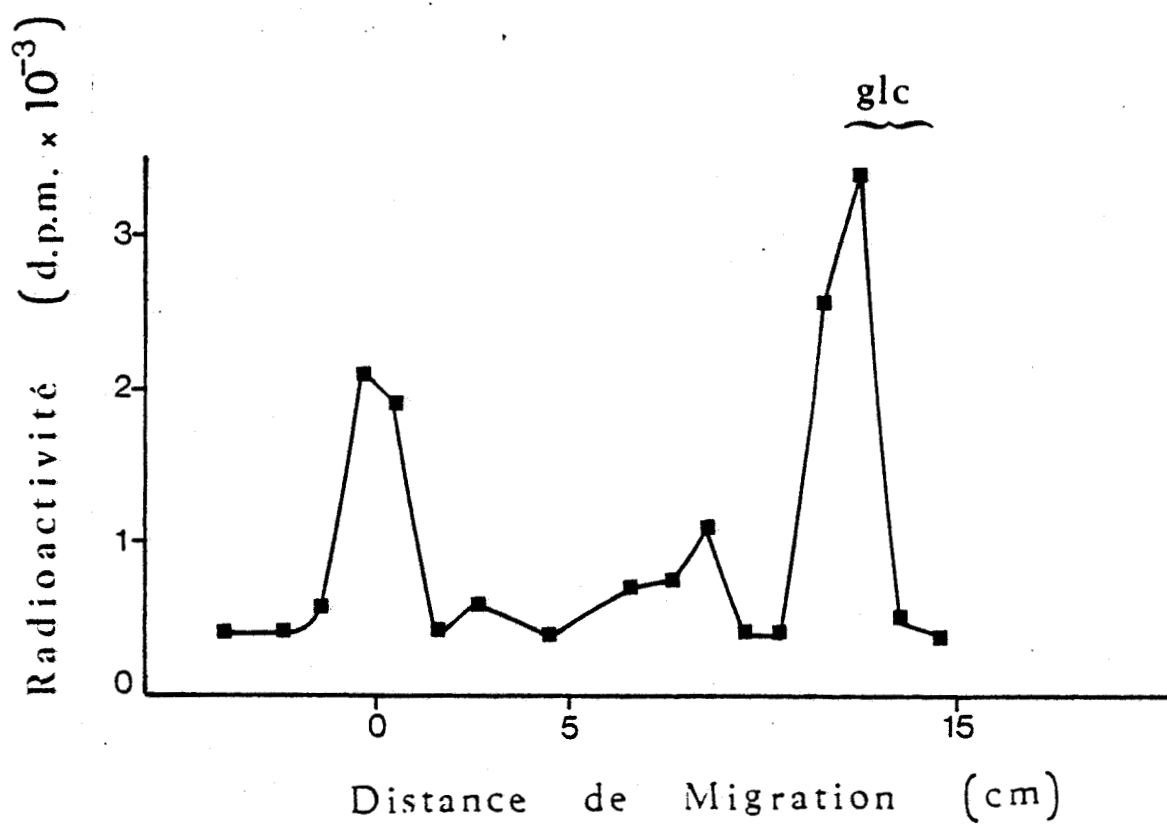


Figure 31 : Electrophorèse sur papier des produits formés après hydrolyse acide des produits à l'origine.
glc = glucose



III - SPECIFICITE ET REGULATION DU SYSTEME PERMEASIQUE

3.1. Spécificité du système perméasique

La spécificité du système de transport est examinée en étudiant la compétition éventuelle de divers composés avec le glucose, lors de l'accumulation de ce dernier.

A cet effet, les cellules préalablement cultivées sur glucose sont pré-incubées avec les éventuels compétiteurs à la concentration de 20 mM, 30 s avant l'addition du glucose 0,1 mM.

Les résultats sont obtenus lors des cinétiques d'accumulation du glucose pendant 5 min et sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'accumulation de ce substrat lors d'une manipulation témoin (tableau 13).

L'inhibition la plus importante est observée avec le xylose, ce dernier présente un homomorphisme avec le glucose (il a perdu le groupement $-CH_2OH$ en position 5). De ce fait, certains auteurs (DiMarco et Romano, 1985) ont même utilisé ce composé comme un analogue du glucose.

Les autres analogues structuraux du glucose habituellement utilisés inhibent également le transport.

Cependant, on remarque que l'effet inhibiteur de ces composés est :

- différent selon l'analogue considéré ; l'inhibition la plus importante est causée par le 3-O-méthyl-glucose ;
- très inférieur à celui du glucose, indiquant ainsi que ces composés n'ont pas la même affinité que le glucose pour la perméase.

Tableau 13 : Action de divers hydrates de carbone sur l'accumulation du glucose

Composés	Pourcentage d'inhibition
Témoin	0
Glucose	97
3-O-Me-glucose	69
α MeG	53,2
2DG	36,8
Fructose	40,5
Galactose	39
Mannose	39,1
Gluconate	17,3
Succinate	28,8
Xylose	75,9
Arabinose	8
Lactose	3
Sorbitol	0
Mannitol	0

Les différents hydrates de carbone sont ajoutés 30 s avant l'addition du glucose 0,1 mM. L'inhibition est déterminée après 5 min d'accumulation et par rapport à des cinétiques témoins.

Des hexoses tels que le fructose, le galactose et le mannose ont une faible affinité pour ce système de transport, ces composés inhibent l'accumulation du glucose d'environ 40 %. Les vitesses initiales de l'accumulation du glucose obtenues en présence du fructose 2 et 4 mM ont montré (figure 32) que ce dernier est un inhibiteur compétitif du glucose, mais qu'il a une très faible affinité pour le système de transport. En effet, les valeurs de la constante d'inhibition (K_i) apparente sont de 1,5 et 3,5 mM respectivement pour le fructose 2 et 4 mM (le K_m étant de 0,68 μ M).

Les acides organiques, tels que l'acide gluconique et l'acide succinique ainsi que l'arabinose, causent une faible inhibition.

Enfin, le lactose et les polyols, tels que le sorbitol et le mannitol, n'ont aucun effet sur l'accumulation du glucose.

D'après l'ensemble de ces résultats, il semble que :

- le système d'accumulation du glucose lui est spécifique. Les autres hexoses, acides organiques, polyols doivent posséder leur propre système de transport ;

- des changements en position C_6 (xylose) et C_3 (3-O-méthyl-glucose) sur la molécule du glucose n'induisent pas des modifications essentielles au niveau de sa stéréospécificité. Par contre, des changements en position C_2 (2-désoxy-glucose, arabinose, mannose) et à un degré moindre en position C_4 (galactose) sur la molécule du glucose modifient sa stéréospécificité et, par conséquent, diminuent son affinité pour la perméase.

3.2. Etude de l'induction du système

L'inductibilité du système perméasique est étudiée en mesurant l'accumulation du glucose par des cellules cultivées sur différents substrats tels que le glucose, le fructose, le lactose, le sorbitol et le succinate.

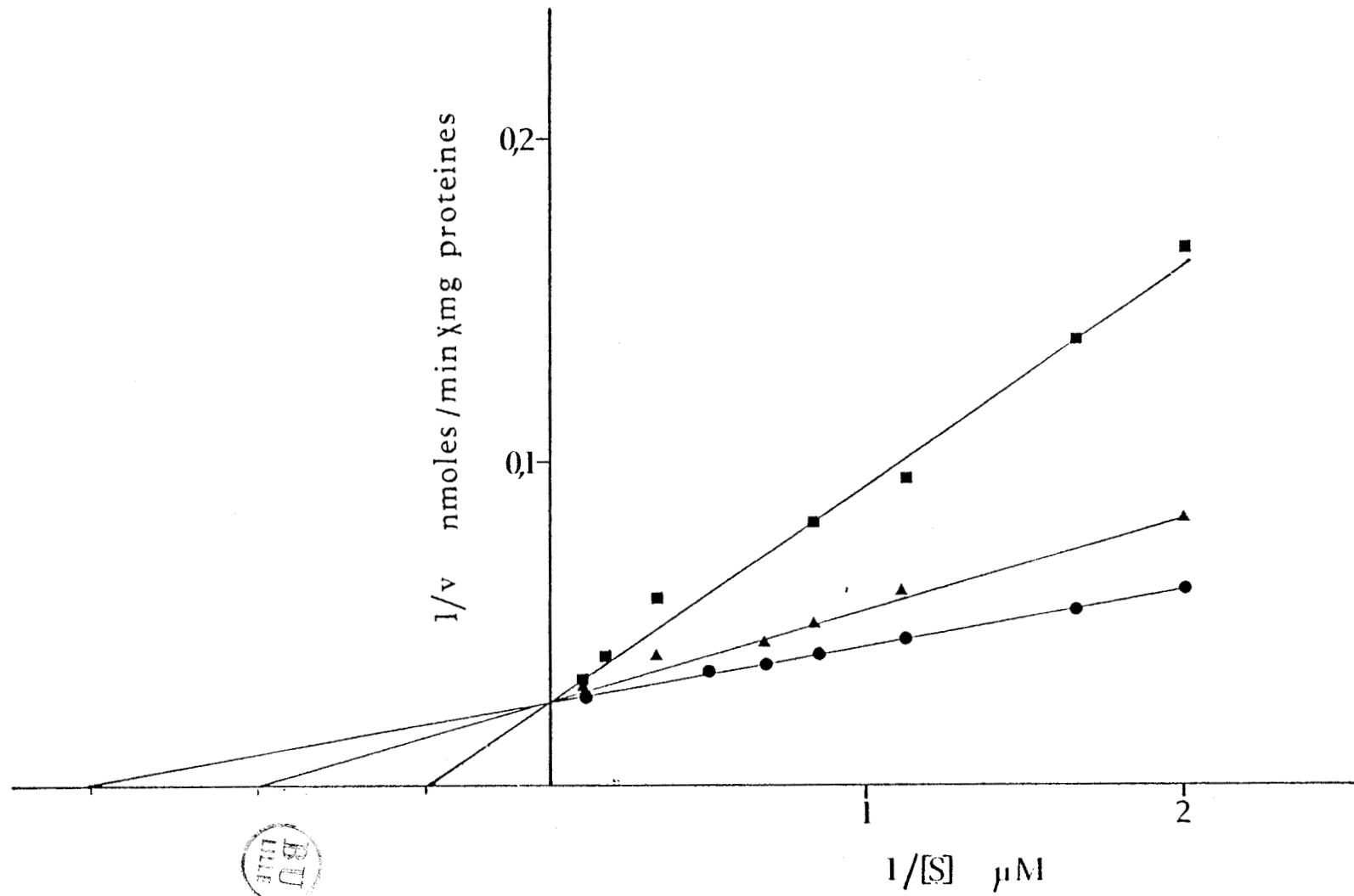


Figure 32 : Représentation en double réciproque de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'accumulation du glucose par le fructose.

(●-●) vitesses initiales d'accumulation (V) du glucose en fonction de la concentration de ce substrat.

(▲-▲) V du glucose en fonction de la concentration de ce substrat en présence de fructose 2 mM.

(■-■) V du glucose en fonction de la concentration de ce substrat en présence de fructose 4 mM.

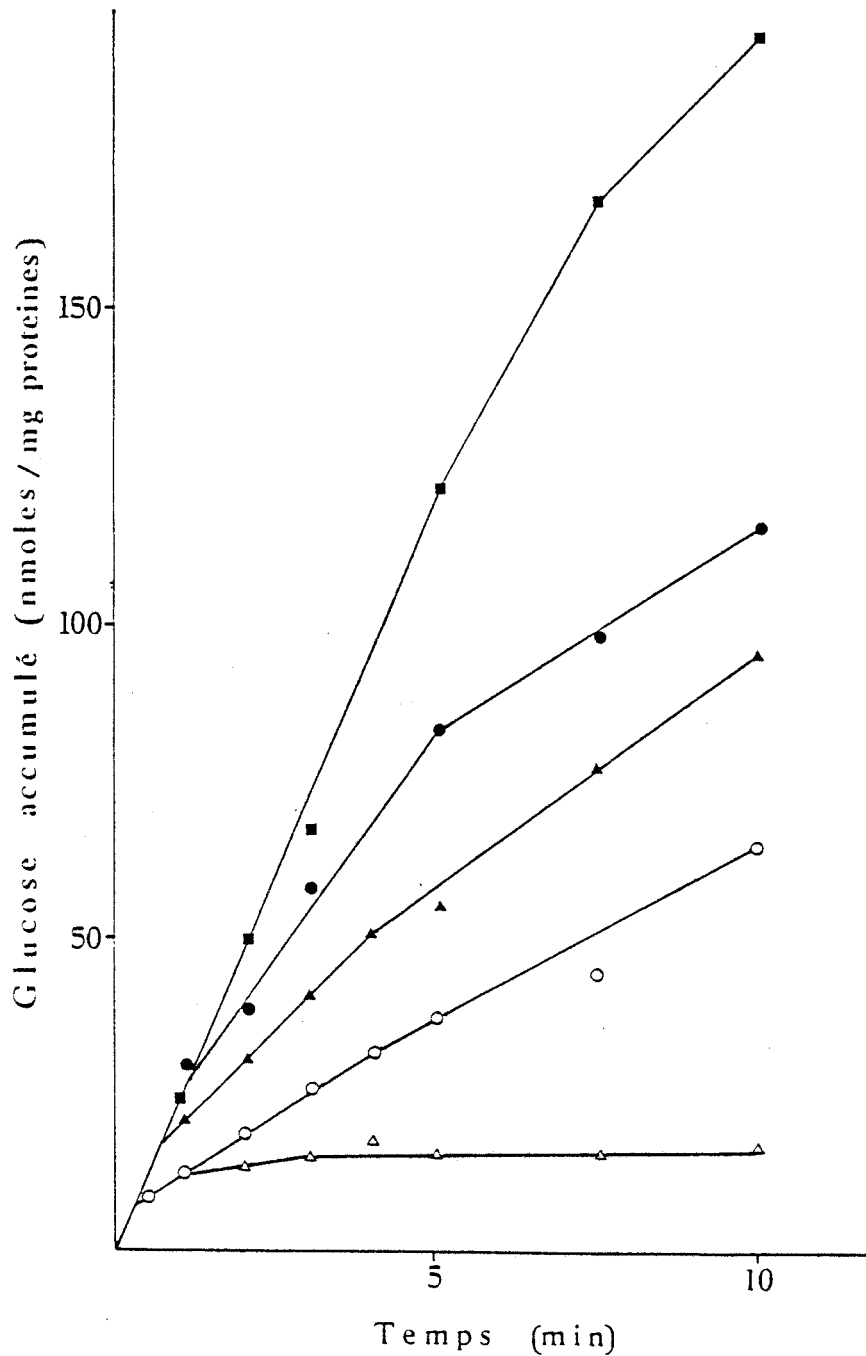


Figure 33 : Accumulation du glucose 0,1 mM par des cellules cultivées sur RHB₁ additionné de différents substrats

- (■—■) de glucose,
- (●—●) de lactose,
- (▲—▲) de fructose,
- (○—○) de sorbitol,
- (△—△) de succinate.

Les résultats obtenus, représentés par la figure 33, nous indiquent que :

- le système est
 - * soit induit par chacun de ces substrats mais avec une efficacité variable
 - * soit constitutif compte tenu des faibles variations de la vitesse d'accumulation mesurées dans les différents cas ;
- le succinate, bien qu'il soit un excellent substrat pour la croissance, n'induit pas ou inhibe la formation du système glucose perméase.

3.3. Etude de la répression du système

Chez les microorganismes, la répression d'une activité enzymatique, impliquée dans le catabolisme d'un substrat par un deuxième substrat, peut être mise en évidence par deux moyens :

- lorsque le microorganisme est cultivé en présence simultanée de deux substrats en concentration limitante, on obtient une courbe de croissance diauxique ;
- plus spécifiquement, en mesurant l'activité enzymatique réprimée.

Nous avons alors étudié la répression de la glucose perméase par le succinate.

3.3.1. Mise en évidence d'une courbe de croissance diauxique

Pour obtenir une croissance diauxique, il faut que :

- l'un des substrats, dans notre cas le succinate, réprime la formation de la glucose perméase. De ce fait, le glucose ne pourra pas être utilisé avant que le succinate ait disparu du milieu ;

- la concentration du succinate employée soit limitante pour la croissance de notre souche.

Nous avons alors d'abord recherché la concentration limitante du succinate pour la croissance. RmM_5N_1 a été cultivée en biophotomètre avec du succinate à 0,1 % ou à 0,2 % (figure 34). Nous constatons qu'à 0,1 % le succinate limite la croissance de notre souche.

RmM_5N_1 a été, par la suite, cultivée en présence simultanée du succinate et du glucose présent chacun à la concentration de 0,1 %. Dans ce cas, on obtient une courbe de croissance diauxique (figure 35).

Celle-ci est caractérisée par la présence de deux phases de croissance séparées par une phase stationnaire intermédiaire. Les temps de génération sont de 178 et 78 min respectivement pour la première et la deuxième phase de croissance.

3.3.2. Contrôle de l'activité enzymatique lors de la diauxie

La mesure de l'activité perméasique nécessite la récupération des cellules en quantité suffisante à des moments précis de la croissance diauxique. Pour cela, nous avons été obligés de réaliser des croissances en grand volume dans des fermenteurs. Par ailleurs, ne possédant pas d'équipement pour la mesure automatique de la densité optique, nous avons été amenés à concevoir une méthode permettant de suivre la diauxie en fermenteur.

3.3.2.1. Conception d'une méthode permettant de suivre la diauxie en fermenteur

Lors de leur croissance, les microorganismes ne sont capables de consommer l'oxygène que lorsque celui-ci se trouve dissous dans la phase aqueuse du milieu de culture. La capacité d'un fermenteur de transférer l'oxygène gazeux à la masse liquide est évaluée par le coefficient de transfert en oxygène (K_{La}). Ce coefficient dépend en particulier de la géométrie du fermenteur et de son mode d'aération et

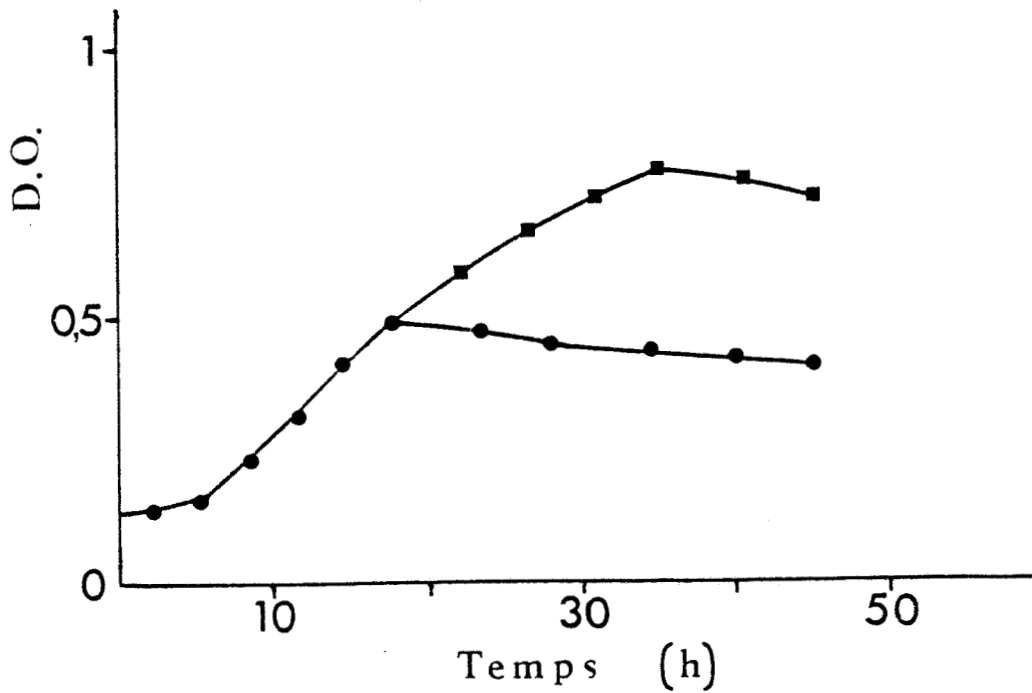


Figure 34 : Croissance de \underline{RmM}_5N_1 sur RHB_1 en présence de succinate à 0,1 % (●-●) ou à 0,2 % (■-■).

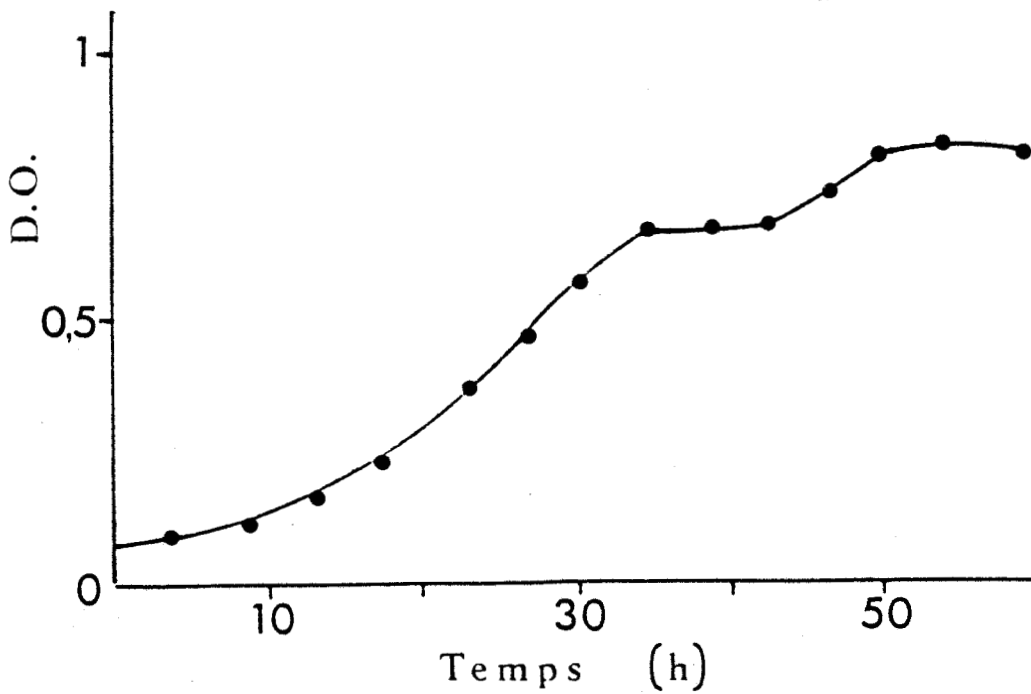


Figure 35 : Croissance de \underline{RmM}_5N_1 sur RHB_1 additionné de glucose et de succinate présent chacun à 0,1 %.

d'agitation. Il est le produit de K_L , coefficient global de transfert de masse par rapport au film liquide qui s'exprime en cm/h et de a , la surface spécifique d'échange gaz-liquide qui s'exprime en cm^2/cm^3 : son unité est donc l'heure^{-1} .

Nous avons réalisé des cultures (5 l.) en fermenteur (New-Brunswick) avec un K_{La} de 35 h^{-1} obtenu avec une aération constante de 3 l. d'air/min et une agitation de 180 r.p.m..

Dans ces conditions, lors de la culture de $\underline{\text{RmM}}_5\text{N}_1$ sur RHB_1 , avec du glucose à 1 %, on obtient une courbe classique de la variation de l'oxygène dissous (figure 36) :

- durant la phase de latence, le milieu reste saturé en oxygène ;
- durant la phase exponentielle de croissance, le taux de l'oxygène dissous diminue. Cette diminution est possible car la valeur du K_{La} utilisée n'est pas suffisante pour restaurer l'oxygène consommé ;
- au début de la phase stationnaire, le milieu se resature en oxygène.

Lors des cultures sur RHB_1 , en présence de glucose (0,1 %) et de succinate (0,1 %), la croissance diauxique est caractérisé par une courbe en deux phases de la variation de l'oxygène dissous (figure 37).

Cependant, pour que la technique soit applicable, il faut que le K_{La} :

- reste constant durant la croissance ;
- soit inférieur aux besoins des cellules pour la croissance, mais assez élevé afin d'éviter que l'oxygène devienne un facteur limitant.

Dans ces conditions, cette méthode est aussi simple et fiable que la mesure de la densité optique (D.O.). De plus, elle peut présenter des avantages lors des cultures en présence des matériaux colorés ou insolubles.

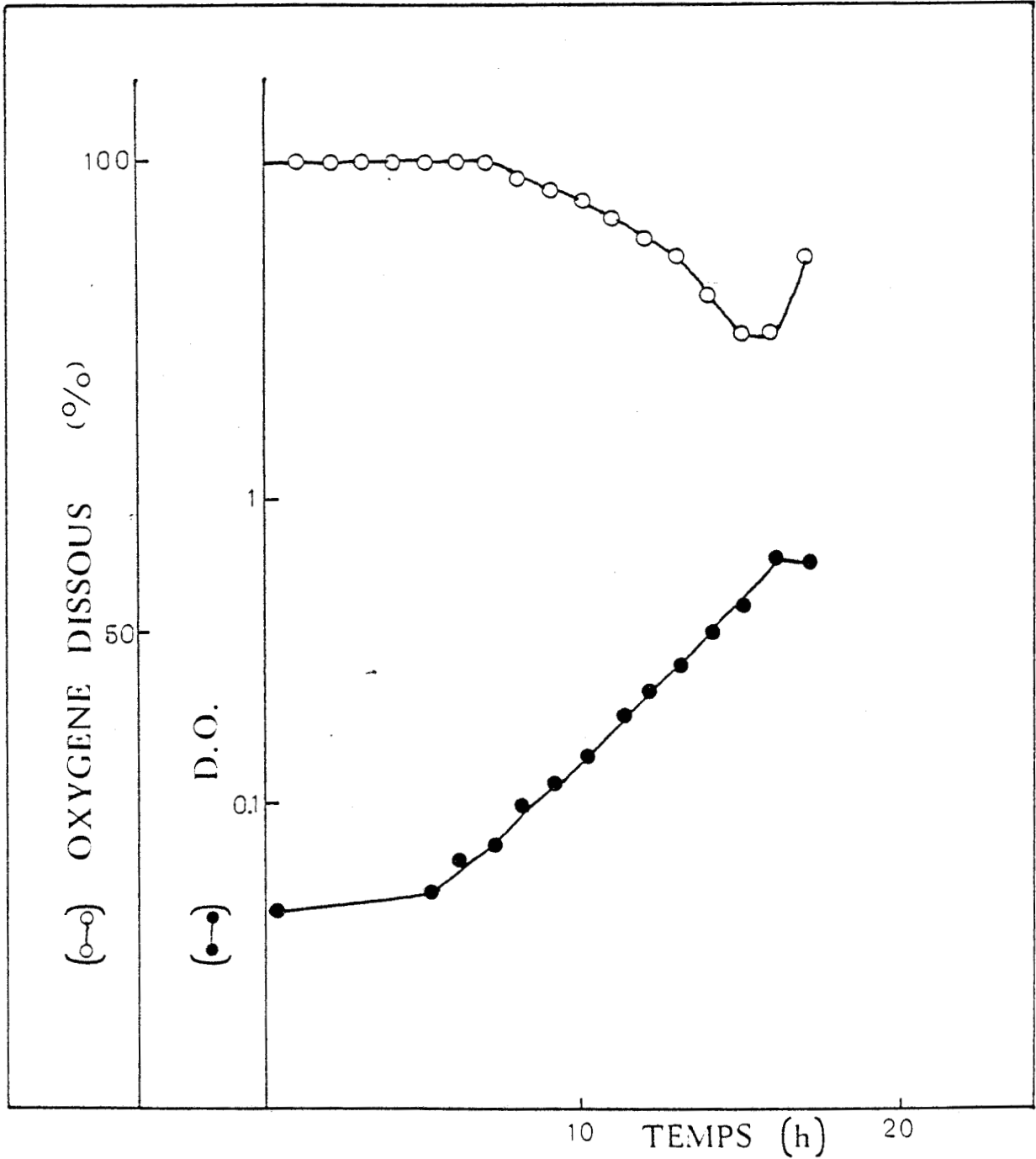


Figure 36 : Suivi de la densité optique (D.O. ; ●-●) à 600 nm et la variation de l'oxygène dissous (O-O) lors de la croissance de RmM_5N_1 sur RHB_1 en présence de glucose à 1 %.

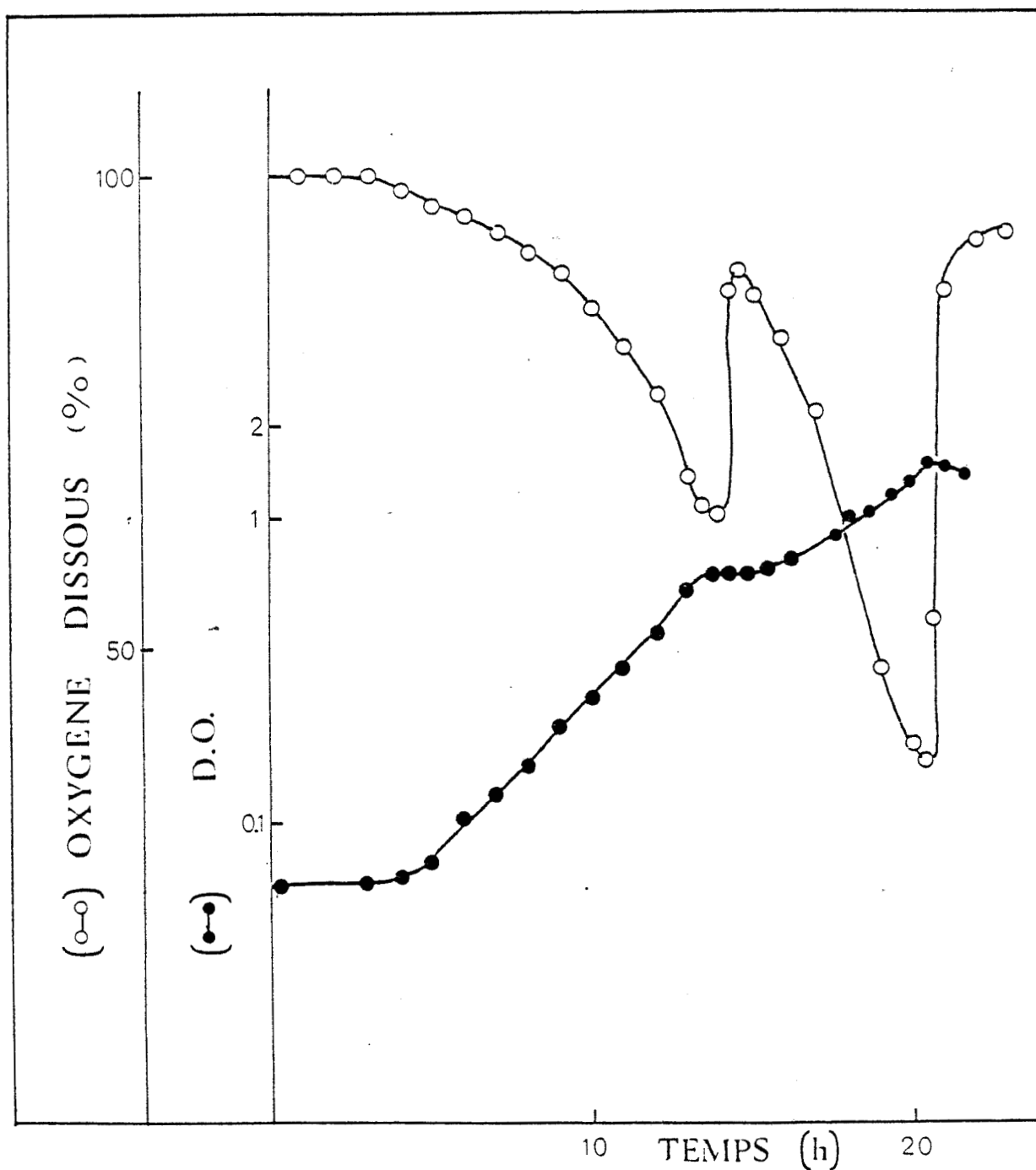


Figure 37 : Suivi de la densité optique (D.O. ; ●-●) à 600 nm et la variation de l'oxygène dissous (O-O) lors de la croissance de RmM_5N_1 sur RHB_1 en présence simultanée de glucose à 0,1 % et de succinate à 0,1 %.

3.3.2.2. Exploitation de la méthode

Cette méthode nous a permis d'effectuer des prélèvements à des moments précis de la croissance de RmM_5N_1 sur RHB_1 additionné de glucose (0,1 %) et de succinate (0,1 %). On a pu ainsi suivre l'évolution de la densité optique (D.O.), la consommation du glucose et l'activité glucose perméase au cours de la croissance diauxique (figure 38).

Durant la première phase de croissance, on remarque que la concentration en glucose dans le milieu reste inchangée et l'activité perméasique très faible, comparable d'ailleurs à celle observée lors des cultures avec du succinate comme source de carbone. Ceci indique que le glucose peut être très faiblement accumulé par le système de transport du succinate mais, également peut-être, par d'autres systèmes de transport d'hydrates de carbone insensibles à l'action inhibitrice du succinate.

A l'opposé, à partir du début de la phase stationnaire intermédiaire, et durant la seconde phase de croissance, on constate une diminution importante de la concentration en glucose dans le milieu en même temps qu'une augmentation considérable de l'activité perméasique.

La consommation sélective du succinate pendant la première phase et du glucose durant la deuxième phase de la croissance diauxique peut être suivie indirectement par la mesure du pH (figure 39). En effet, on constate :

- l'alcalinisation du milieu durant la première phase de la croissance causée par la production du NaOH, le Na^+ provenant du succinate qui est ajouté sous forme de sels de Na^+ ;

- la neutralisation et l'acidification du milieu durant la deuxième phase de croissance due à la production de l'acide 2-céto-gluconique à partir du glucose ;

- enfin, l'alcalinisation durant la phase stationnaire due à la lyse des cellules.

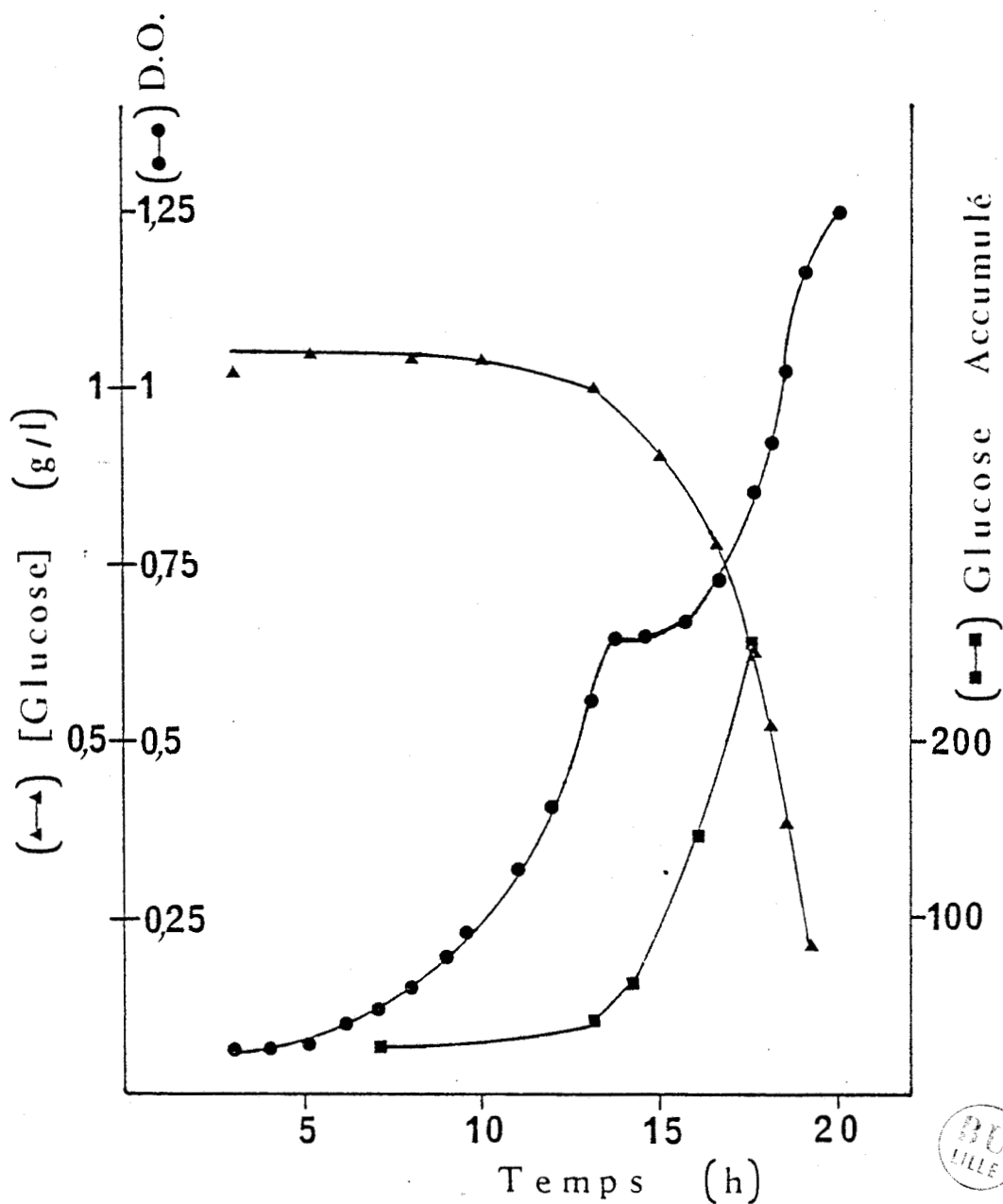


Figure 38 : Croissance diauxique de RmM_5N_1 .

Les cellules sont cultivées en fermenteur sur RHB_1 additionné de glucose (1 g/l) et de succinate (1 g/l). L'utilisation du glucose (▲) est suivie durant la croissance mesurée à 600 nm (●). A des temps appropriés, des échantillons sont prélevés et l'activité glucose perméase exprimée en nmoles de glucose accumulé/mg de protéines est déterminée (■).

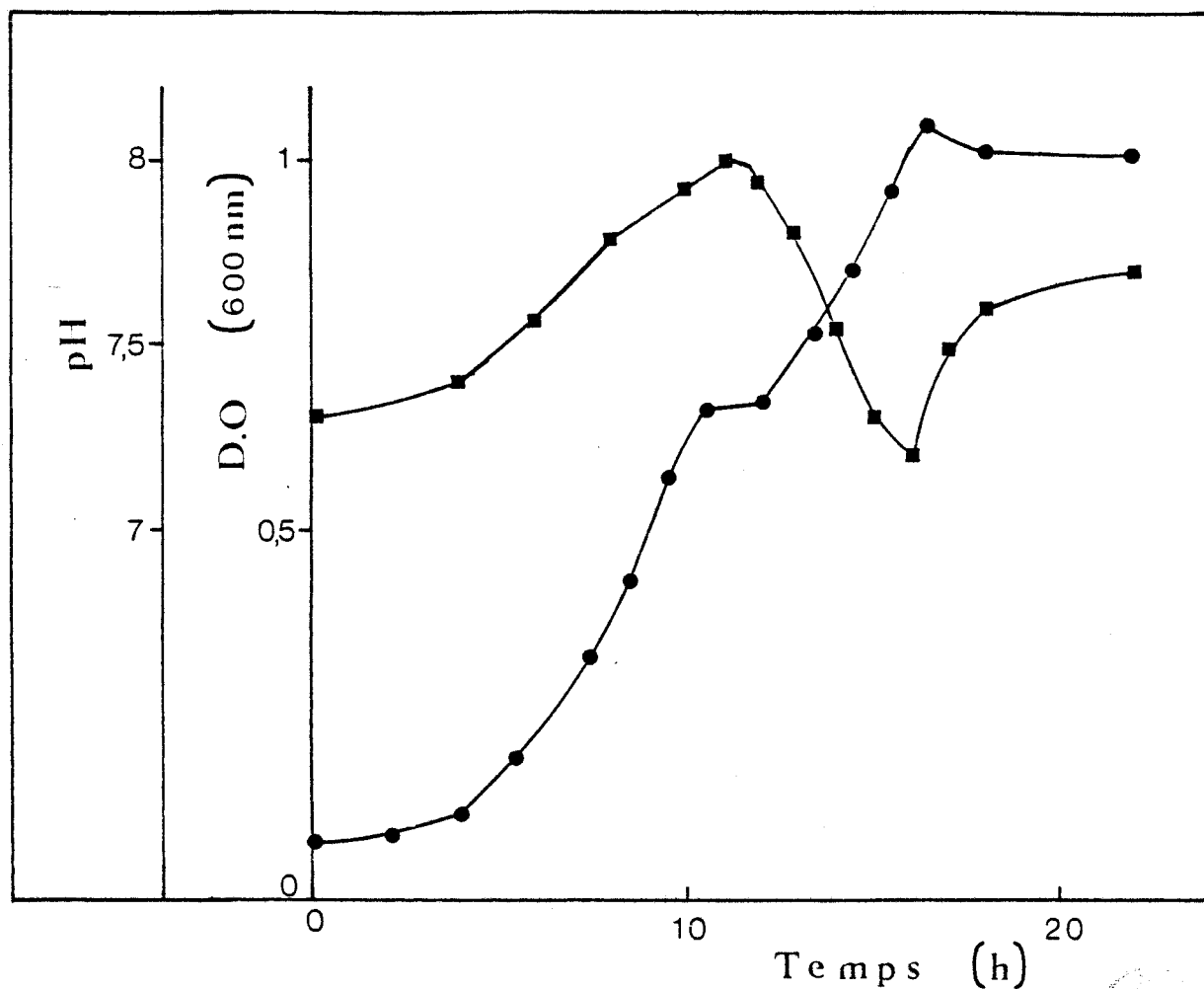


Figure 39 : Croissance diauxique de RmM_5N_1 .

Les cellules sont cultivées en fermenteur sur RHB_1 additionné de glucose à 0,1 % et de succinate à 0,1 %. L'évolution du pH (■—■) est suivie durant la croissance (●—●).

3.3.3. Effet de l'AMPc

La croissance bactérienne a été suivie, en biophotomètre, sur milieu RHB₁ additionné de succinate (0,1 %), de glucose (0,1 %) et de l'AMPc à la concentration finale de 10 mM. Dans ces conditions, on observe la disparition de la diauxie (figure 40). On remarque également un temps de génération plus faible (195 min) par rapport à celui calculé (251 min) lors de la première phase de croissance diauxique.

3.3.4. Comportement d'autres substrats lors des cultures avec du glucose

Nous avons réalisé, au biophotomètre, des cultures de notre souche en présence simultanée du glucose et du fructose ou du malate ou du fumarate.

Le fructose, substrat accumulé par des cellules cultivées sur glucose (voir figure 33), a été employé afin de vérifier que celui-ci ne réprime pas la glucose perméase. En effet, on constate que, lors de sa croissance, RmM₅N₁ utilise en même temps le glucose et le fructose (figure 41).

Le malate et le fumarate, intermédiaires du cycle de Krebs comme le succinate, ont une structure proche de celui-ci et pourraient réprimer la glucose perméase chez RmM₅N₁ comme le fait, par exemple, le malate chez R. leguminosarum RBL₁ (voir 4.1.1.4.). Nous constatons (figure 41) la co-utilisation des mélanges malate-glucose et fumarate-glucose par notre souche et donc l'absence de répression de la glucose perméase par ces acides.

Bien que notre système semble être spécifiquement réprimé par le succinate, l'absence de sa répression par les autres intermédiaires du cycle de Krebs pourrait être attribuée à des vitesses inférieures de leur pénétration dans les cellules.

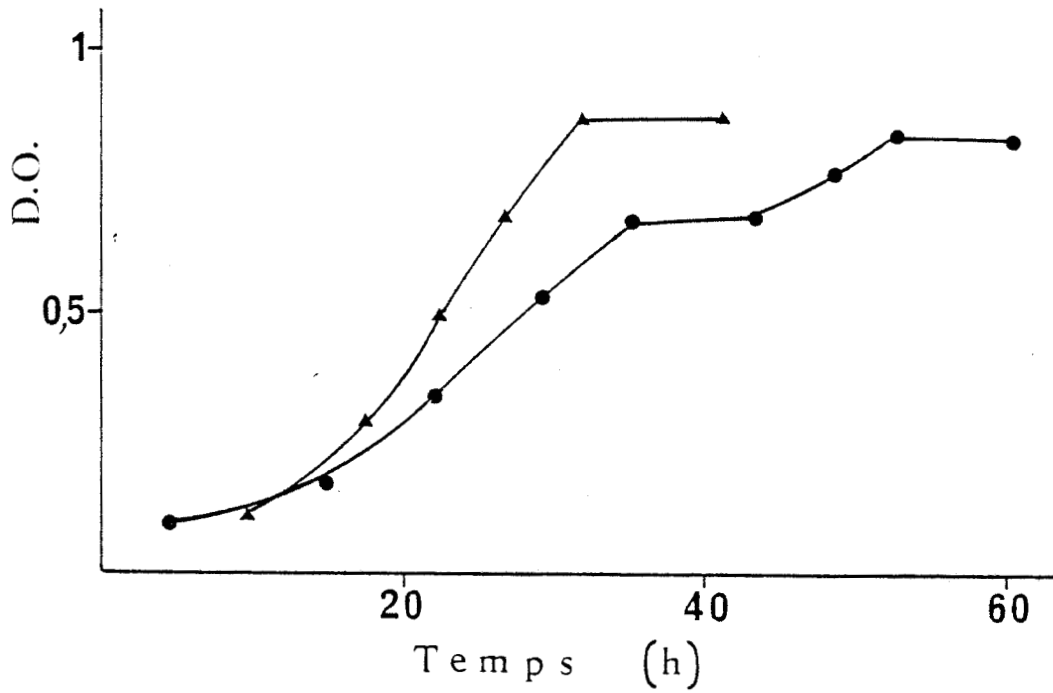


Figure 40 : Croissance de RmM_5N_1 sur RHB_1 additionné de :
- glucose (0,1 %) et succinate (0,1 %) (●—●),
- glucose (0,1 %), succinate (0,1 %) et AMPc (10 mM) (▲—▲)



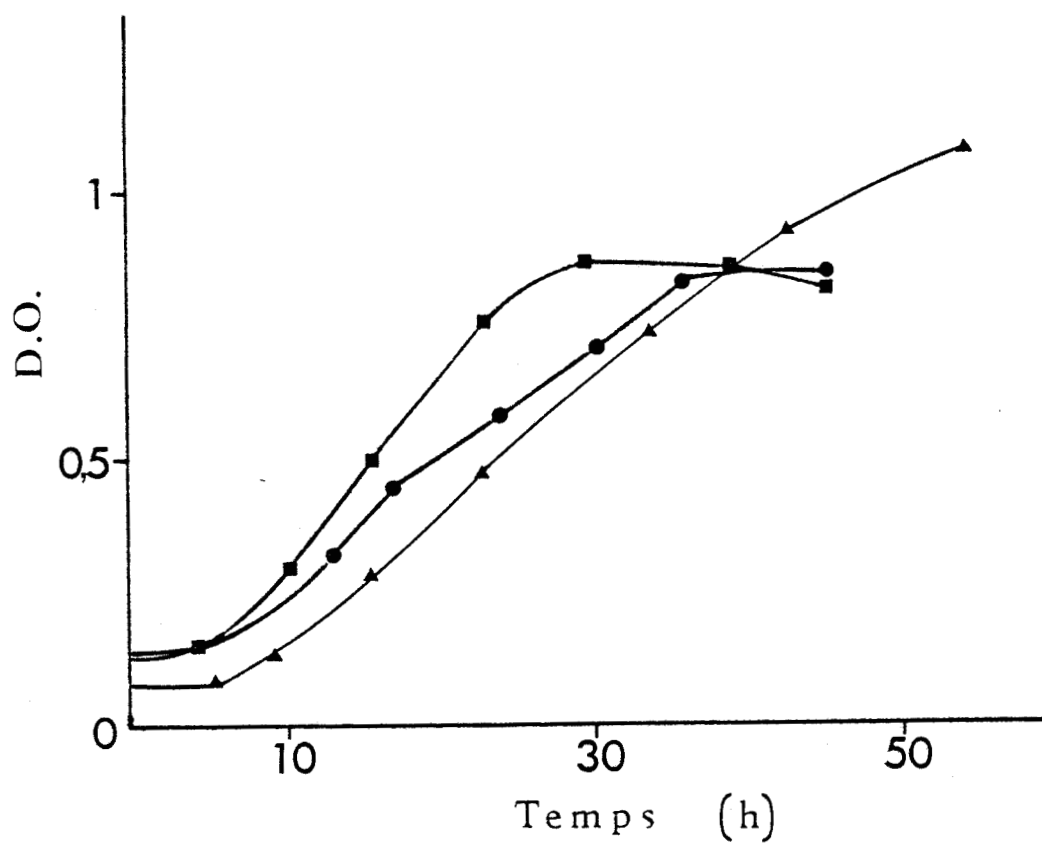


Figure 41 : Croissance de RmM_5N_1 en présence simultanée de glucose et de fructose (▲—▲) ou de malate (●—●) ou de fumarate (■—■).

CONCLUSION GENERALE

Notre travail a consisté à étudier le transport du glucose chez R. meliloti.

De l'étude des différentes caractéristiques de ce transport, il ressort que :

- le transport du glucose est réalisé par un mécanisme actif qui dépend de l'énergisation de la membrane. Cet état est caractérisé par l'établissement d'une force proton-motrice au travers de la membrane cytoplasmique, lors du transport des électrons tout au long de la chaîne respiratoire. D'autres travaux ont également montré que les hexoses sont accumulés par ce type de transport chez la totalité des souches de Rhizobium étudiés (voir 4.1.1.) contrairement à la plupart des bactéries à Gram négatif (voir 3.2.3.2.) qui accumulent ces composés par un système phosphotransférases (PTS) ;

- la perméase possède des fonctions thiols libres dont une partie est nécessaire à la fixation du substrat sur son site. En effet, leur blocage par des agents tel que le NEM limite l'accumulation du glucose par la cellule bactérienne ; cette inhibition n'est que partiellement levée par un excès de substrat ;

- le fonctionnement de la perméase est favorisé par des métaux tels que le magnésium et le manganèse.

- la perméase fonctionne comme une enzyme Michaelienne et elle a une très forte affinité (K_m apparent = $0,68 \mu M$) pour le glucose.

La présence des plateaux de fin d'accumulation stables nous a conduits à étudier ensuite le devenir du glucose accumulé. On a constaté que :

- l'azide de sodium, ajouté au cours de l'accumulation, inhibe celle-ci mais ne provoque pas la sortie des produits intracellulaires ;

- la sortie, provoquée par surcharge en substrat et dilution, des produits intracellulaires formés après une accumulation du glucose,

α MeG et 2DG, est partielle et dépend de la durée de l'accumulation : plus la durée est longue, moins il y a de sortie des produits accumulés. D'autre part, on peut remarquer que, après un temps d'accumulation donné, la sortie des produits issus du glucose est moindre que celle des produits issus du 2DG et de l' α MeG. Ceci démontre que les analogues sont assimilés plus lentement que le glucose ;

- la stabilité du plateau n'est pas due à un équilibre entre l'entrée du glucose et la sortie des produits métaboliques ;

- le glucose est accumulé et métabolisé au plateau plus lentement que pendant la phase active de l'accumulation ;

- au plateau il y a formation des produits qui ne migrent pas en chromatographie et en électrophorèse dans les supports et les systèmes solvants utilisés. Ces produits n'ont pas été identifiés mais pourraient être des composés chargés de masse moléculaire importante ou bien des catabolites liés à des macromolécules.

La présence de plateaux de fin d'accumulation, lors du transport des composés métabolisables, a été rencontrée chez d'autres bactéries ; nous pensons que ce phénomène doit être général chez la plupart des espèces bactériennes lors de l'accumulation de ces composés.

Enfin, la spécificité et la régulation du système perméasique ont été étudiées. Ce travail a montré que :

- ce système est spécifique du glucose. En effet, le lactose et les polyols n'ont pas d'affinité ; les analogues structuraux du glucose, d'autres hexoses et certains acides ont une faible affinité pour celui-ci. De plus, la stéréospécificité de la glucose perméase semble être

- * liée à la nature et à la position des substituants des carbones en position 2 et 4 de la molécule du glucose,

* indépendante des substituants des carbones en position 3 et 6 de cette molécule ;

- la glucose perméase peut être considérée comme constitutive, elle subit la répression catabolique AMPc dépendant par le succinate. La répression des systèmes de transport des hexoses par des intermédiaires du cycle de Krebs a déjà été signalée chez Rhizobium. Cependant, l'incapacité de l'AMPc, lorsqu'il est employé, d'abolir ces répressions, ainsi que la méconnaissance du mécanisme de la répression catabolique ont fait que, jusqu'alors, les auteurs ont suggéré l'absence de ce phénomène chez Rhizobium.

ANNEXES

ANNEXE 1 - HISTORIQUE DE LA REPRESSION CATABOLIQUE ET DU ROLE DE L'AMPc

En 1942, Epps et Gale ont, pour la première fois, décrit que la présence du glucose durant la croissance d'E. coli inhibe la formation de certaines enzymes.

Peu après, en 1943, Monod décrit des croissances diauxiques avec des mélanges de glucose et de xylose et, en 1947, observe que le glucose inhibe la formation d'enzymes essentielles à la dégradation d'autres hydrates de carbone.

Cet effet inhibiteur du glucose a été dès lors appelé "effet glucose".

Durant la décennie 1950-1960, de nombreux travaux ont amené des données nouvelles sur ce phénomène. Il est apparu (Neidhardt et Magasanik, 1957) que l'inhibition de la biosynthèse enzymatique en présence du glucose n'est pas due à :

- l'incapacité des agents inducteurs de pénétrer dans les cellules,
- l'utilisation exclusive du glucose à des vitesses très élevées excluant la dégradation des autres substrats;
- un déficit des substances essentielles pour la formation des protéines.

D'autre part, les auteurs ont soutenu que :

- des substances autres que le glucose peuvent mimer l'effet inhibiteur de cet hexose (Neidhardt, 1960),
- l'effet glucose n'est pas dû au glucose lui-même mais aux métabolites intermédiaires qui agissent comme répresseurs (Neidhardt et Magasanik, 1956 ; Neidhardt, 1960).

Se basant sur ces résultats, Magasanik propose en 1961, pour la première fois, le terme "répression catabolique" en remplacement de celui d'"effet glucose", employé jusqu'alors.

En 1963, McFall et Mandelstam préfèrent employer le terme plus général de "répression métabolique" car, selon eux, le répresseur peut être soit un produit catabolique soit un produit anabolique.

En 1964, Nakada et Magasanik rapportent que la répression résulte d'un blocage de la transcription de l'ARNm plutôt que d'un manque de la traduction de cette molécule en protéine.

L'observation, en 1965 par Makman et Sutherland, de la diminution de l'AMPc dans les cellules d'E. coli cultivées en présence de glucose est à l'origine de nombreuses interprétations du rôle de cette molécule dans ces phénomènes de régulation.

Ullmann et Monod (1968) observent que l'AMPc lève la répression catabolique de la β -galactosidase chez E. coli. L'effet de l'AMPc est présent chez toutes les souches inductibles ou non, il est même plus marqué pour les deux souches constitutives étudiées que pour les souches sauvages inductibles. C'est là une importante observation, car la répression catabolique est différenciée des phénomènes d'induction et, par conséquent, elle est indépendante de l'entrée ou non de l'inducteur.

Perlman et Pastan (1968a) remarquent également que l'addition d'AMPc augmente le taux de synthèse et restaure la synthèse de la β -galactosidase et de la tryptophanase normalement réprimées par le glucose et le pyruvate. Cette dérégulation semble être spécifique car l'AMPc ne stimule pas le taux de synthèse de la phosphatase alcaline, enzyme non réprimée par le glucose.

Ils donnent aussi (Pastan et Perlman, 1968b) plus de précisions en ce qui concerne l'action de l'AMPc lors de la répression catabolique transitoire.

En particulier, ils trouvent que le promoteur est le site sur lequel l'AMPc agit pour stimuler la synthèse de la β -galactosidase chez E. coli.

En 1969 (Perlman et coll.), il est admis que la répression est provoquée par une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPC et non par un manque de pénétration de l'inducteur dans le cytoplasme. D'autre part, le contrôle du taux d'AMPC intracellulaire est attribué à trois processus distincts qui sont la synthèse, la dégradation et le relargage dans le milieu de ce nucléotide.

Le mécanisme d'action de l'AMPC sur l'operon lactose est proposé pour la première fois en 1970 (Pastan et Perlman). L'AMPC agit au niveau du site du promoteur en facilitant l'initiation de la transcription. Cette action nécessite une protéine qui est la protéine réceptrice de l'AMPC (C.R. protéine ou CAP).

Actuellement (Pastan et Adhya, 1976 ; Botsford, 1981), il est prouvé que le complexe CRP-AMPC se fixe en des sites précis du promoteur (différents selon les operons) en facilitant l'attachement de l'ARN polymérase sur l'ADN. D'autre part, la fixation du complexe AMPC-CRP sur l'ADN se fait par la région C-terminale du CRP.

ANNEXE 2 - TRAVAUX MONTRANT LA NON EXCLUSIVITE DE L'AMPc COMME
REGULATEUR DE LA REPRESSION CATABOLIQUE

Ullmann, en 1974, pose la question de savoir si les effets de l'AMPc sont en relation avec des phénomènes physiologiques réels. En effet, chez Bacillus megaterium, l'AMPc et les enzymes responsables de son métabolisme, adényl acylase et phosphodiesterase sont absents. Néanmoins, cet organisme subit une répression catabolique qui est d'ailleurs levée par l'addition d'AMPc.

Il faut signaler que la répression catabolique existe également chez P. aeruginosa (Phillips et Mulfinger, 1981 ; Siegel et coll., 1977), mais l'AMPc ne semble pas intervenir lors de cette répression.

La régulation de la répression catabolique de la β -galactosidase a été étudiée chez des mutants d'E. coli (Dessein et coll., 1978 ; Takabe et coll., 1978). Ces mutations étant effectuées dans la région *crp*, qui code pour la protéine CRP, provoquent une altération dans le fonctionnement de cette protéine. En effet, le CRP est sous sa forme active en l'absence de l'AMPc. Donc le taux de ce nucléotide n'intervient pas au niveau de l'expression d'operons chez ces mutants. Les auteurs ont néanmoins remarqué que, chez ces souches, la synthèse de la β -galactosidase était encore sensible à la répression catabolique. Ces résultats montrent que la concentration intracellulaire d'AMPc ne doit pas être l'unique régulateur.

Une autre découverte, qui est en faveur du fait que ce nucléotide n'est pas le seul responsable de la répression catabolique, a été réalisée par le groupe d'Ullmann. Ullmann et collaborateurs (1976) ont trouvé qu'E. coli produisait un facteur qu'ils ont appelé CMF (Catabolite Modulator Factor) lors des cultures de ces cellules sur milieu minimum glucosé. Ce facteur est responsable de la répression des operons galactose, lactose et de la tryptophanase. D'autre part, celle-ci est distincte de la répression faisant intervenir l'AMPc, car le CMF réprime l'expression d'operons chez des mutants où leur expression est indépendante de la présence de l'AMPc (Dessein et coll., 1978a ; Dessein

et coll., 1978b). Ce facteur n'a été caractérisé que partiellement. Il est de petit poids moléculaire, stable aux acides, aux bases et au chauffage. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que le CMF agit comme régulateur négatif et l'AMPc en tant que régulateur positif de l'expression des gènes.

D'autres travaux ont montré (Warner et coll., 1978) que la répression catabolique permanente est causée par des catabolites et qu'elle n'est pas levée par l'addition d'AMPc. En particulier, les auteurs ont remarqué que le degré de la répression n'est pas altéré par le taux de croissance ni par la présence des produits biosynthétiques. D'autre part, ils ont constaté que l'addition d'AMPc ne supprime pas la répression de la β -galactosidase, mais ils n'excluent pas une déficience de l'AMPc externe de produire un taux interne suffisamment élevé pour saturer l'operon lactose. Les auteurs concluent que la répression catabolique ne peut pas être uniquement attribuée au taux d'AMPc intracellulaire et suggèrent que la répression régulée par le système CRP-AMPc doit constituer une forme possible de répression catabolique parmi d'autres.

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

- ALVES R.A., GLEAVES J.T. and PAYNE J.W. (1985)
The role of outer membrane proteins in peptide uptake by
Escherichia coli.
FEMS Microbiol. Lett., 27, 333-338.
- ANDREWS K.J. and LIN E.C.C. (1976)
Selective advantages of various bacterial carbohydrate transport
mechanisms.
Federation Proc., 35, 2185-2189.
- ANTONIOW L.D. and SPRENT J.J. (1978)
Primary metabolites of Phaseolus vulgaris nodules.
Phytochemistry, 17, 675-678.
- ARIAS A., GARDIOL A. and MARTINEZ-DRETS G. (1982)
Transport and catabolism of D-Mannose in Rhizobium meliloti.
J. Bacteriol., 151, 1069-1072.
- ASATANI M. and KURAHASHI K. (1977)
Carbohydrate metabolism in Bacillus brevis ATCC 9999.
J. Biochem., 81, 813-822.
- BOSTFORD J.L. (1981)
Cyclic nucleotides in procaryotes.
Microbiol. Rev., 45, 620-642.
- BURSTEIN C. and KEPES A. (1985)
The melibiose permease system of Escherichia coli K-12.
Biochimie, 67, 59-67.
- COHEN G.N. et RICKENBERG H.V. (1955)
Etude directe de la fixation d'un inducteur de la β -galactosidase
par les cellules d'Escherichia coli.
C.R. Acad. Sci. Ser. D, 240, 466-468.

COURTOIS B. (1984)

Les expolysaccharides de *Rhizobium* : conditions de biosynthèse, structure primaire et propriétés physico-chimiques.

Thèse d'Etat n°625, Université des Sciences et Techniques de Lille.

CRENON J. and ULLMANN A. (1984)

The role of cyclic AMP excretion in the regulation of enzyme synthesis in *Escherichia coli*.

FEMS Microbiol. Lett., 22, 47-51.

DAZZO F.B. (1980)

Lectins and their saccharide receptors as determinants of specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis.

In : "Cell Surface-Mediator of developmental process".

Ed. SUBTENLY S. and WESSELS N.Y., p. 277-305, N.Y., Academic Press.

DECAD G.M. and NIKAIDO H. (1976)

Outer membrane of gram-negative bacteria. XII Molecular-sieving function of cell wall.

J. Bacteriol., 128, 325-336.

DE HOLLANDER J.A. and STOUTHAMER A.H. (1979)

Multicarbon-substrate growth of *Rhizobium trifolii*.

FEMS Microbiol. Lett., 6, 57-59.

DERIEUX J.C., HORNEZ J.P. et COURTOIS B. (1983)

Effet de la concentration en glucose sur le métabolisme oxydatif de *Rhizobium meliloti*.

C.R. Acad. Sc. Paris, 296, 995-1000.

DESSEIN A., SCHWARTZ M. and ULLMANN A. (1978a)

Catabolite repression in *Escherichia coli* mutants lacking cyclic AMP.

Mol. Gen. Genet., 162, 83-87.

- DESSEIN A., TILLIER F. and ULLMANN A. (1978b)
Catabolite modulator factor : physiological properties and in vivo effects.
Mol. Gen. Genet., 162, 89-94.
- DE VRIES G.E., VAN BRUSSEL A.A.N. and QUISPEL A. (1982)
Mechanism and regulation of glucose transport in Rhizobium leguminosarum.
J. Bacteriol., 149, 872-879.
- DILLS S.S., APPERSON A., SCHMIDT M.R. and SAIER Jr. M.H. (1980)
Carbohydrate transport in bacteria.
Microbiol. Rev., 44, 385-418.
- DILWORTH M.J., MCKAY I., FRANKLIN M. and GLENN A.R. (1983)
Catabolite effects on enzyme induction and substrate utilization in Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 129, 359-366.
- DI MARCO A.A. and ROMANO A.H. (1985)
D-glucose transport system of Zymomonas mobilis.
Appl. Environ. Microbiol., 49, 151-157.
- DUNCAN M.J. (1981)
Properties of Tn-5-induced carbohydrate mutants in Rhizobium meliloti.
J. Gen. Microbiol., 122, 61-67.
- EAGON R.G. (1971)
2-deoxyglucose transportation via passive diffusion and its oxidation, not phosphorylation to 2-deoxygluconic acid by Pseudomonas aeruginosa.
Can. J. Biochem., 49, 606-613.

ENGEL A., MASSALSKI A., SCHINDLER H., DORSET D.L. and ROSENBUSCH J.P. (1985)

Porin channel triplets merge into single outlets in Escherichia coli outer membranes.

Nature, 317, 643-645.

EPPS H.M.R. and GALE E.F. (1942)

The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of Escherichia coli: comparison of the effects with that produced by fermentation acids.

Biochem. J., 36, 619-623.

FERENCI T., BOOS W., SCHWARTZ M. and SZMELCMAN S. (1977)

Energy coupling of the transport system of Escherichia coli dependent on maltose binding protein.

Eur. J. Biochem., 75, 187-193.

FINAN T.M., WOOD J.H. and JORDAN D.C. (1981)

Succinate transport in Rhizobium leguminosarum.

J. Bacteriol., 148, 193-202.

FINAN T.M., WOOD J.M. and JORDAN D.C. (1983)

Symbiotic properties of C₄-Dicarboxylic acid transport mutants of Rhizobium leguminosarum.

J. Bacteriol., 154, 1403-1413.

FURUKAWA H., YAMADA H. and MIZUSHIMA S. (1979)

Interaction of bacteriophage T4 with reconstituted cell envelopes of Escherichia coli K-12.

J. Bacteriol., 140, 1071-1080.

GARDIOL A., ARIAS A., CERVENANSKY C., GAGGERO C. and MARTINEZ-DRETS G. (1980)

Biochemical characterization of a fructokinase mutant of Rhizobium meliloti.

J. Bacteriol., 144, 12-16.

- GHEI O.K. and KAY W.W. (1973)
Properties of an inducible C₄-dicarboxylic acid transport system in Bacillus subtilis.
J. Bacteriol., 114, 65-79.
- GLENN A.R., POOLE P.S. and HUDMANN J.F. (1980)
Succinate uptake by free-living and bacteroid forms of Rhizobium leguminosarum.
J. Gen Microbiol., 119, 267-271.
- GLENN A.R., ARWAS R., MCKAY I.A. and DILWORTH M.J. (1984a)
Fructose metabolism in wild-type, fructokinase negative and revertant strains of Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 130, 231-237.
- GLENN A.R., MCKAY I.A., ARWAS R. and DILWORTH M.J. (1984b)
Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 130, 239-245.
- GLENN A.R. and DILWORTH M.J. (1984)
Methylamine and ammonium transport systems in Rhizobium leguminosarum MNF 3841.
J. Gen. Microbiol., 130, 1961-1968.
- GRAHAM L.T. (1969)
Selective medium for growth of Rhizobium.
Appl. Microbiol., 17, 769-770.
- GRAHAM P.H. (1981)
Recognition in Rhizobium - legume symbioses.
International Review of Cytology, supp. 13, 127-148.
- HAGUENAUER R. et KEPES A. (1971)
The cycle of renewal of intracellular α -methyl glucoside accumulated by the glucose permease of Escherichia coli.
Biochimie, 53, 99-105.

HAGUENAUER R. et KEPES A. (1972)

NaF inhibition of phosphorylation and dephosphorylation involved in α -methyl-D-glucoside transport in Escherichia coli K-12. A pH dependent phenomenon sensitive to uncoupling agents. Biochimie, 54, 505-512.

HANCOCK R.E.W. and CAREY A.M. (1980)

Protein D1-a glucose-inducible, pore-forming protein from the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett., 8, 105-109.

HAROLD F.M. (1972)

Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. Bacteriol. Rev., 36, 172-230.

HAYASHI S., LIN E.C.C. (1965)

Product induction of glycerol kinase in Escherichia coli. J. Mol. Biol., 14, 515-521.

HEFFERNAN L., BASS R. and ENGLERBERG E. (1976)

Mutations affecting catabolite repression of the L-arabinose regulon in Escherichia coli B/2. J. Bacteriol., 126, 1119-1131.

HENDERSON P.J.F., GIDDENS R.A. and JONES-MORTIMER M.C. (1977)

Transport of galactose, glucose and their analogues by Escherichia coli K-12. Biochem. J., 162, 309-320.

HOOYMANS J.J.M. and LOGMAN G.J.J. (1984)

The effect of high concentrations of glucose and fructose on the respiration rate of isolated Rhizobium leguminosarum bacteroids. J. Plant Physiol., 116, 273-277.

HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C. (1976)

Mise en évidence de voies de métabolisme différentes à partir du glucose ou du fructose chez Rhizobium meliloti.

C.R. Acad. Sci. Paris, 283, 1559-1562.

HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C. (1982)

Importance de l'oxygénation lors de la production de Rhizobium meliloti en milieu glucosé.

Bio-sciences, 1, 5-7.

HUDMAN J.H. and GLENN A.R. (1980)

Glucose uptake by freeliving and bacteroid forms of Rhizobium leguminosarum.

Arch. Microbiol., 128, 72-77.

JOSEPH E., DANCHIN A. and ULLMANN A. (1981)

Regulation of galactose operon expression : glucose effects and role of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate.

J. Bacteriol., 146, 149-154.

KABACK H.R. (1974)

Transport studies in bacterial membrane vesicles.

Science, 186, 882-892.

KEPES A. (1971)

The β -galactoside permease of Escherichia coli.

J. Membr. Biol., 4, 87-112.

KEPES A. (1973)

Trois classes de systèmes de transport chez les bactéries.

Biochimie, 55, 693-702.

KLEIN W.L. et BOYER P.D. (1972)

Energization of active transport by Escherichia coli.

J. Biol. Chem., 247, 7257-7265.

KUNDIG W., GHOSH S. and ROSEMAN S. (1964)

Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52, 1067-1074.

LEINE L. (1965)

A non specific increase in permeability in Escherichia coli produced by EDTA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 745-750.

LIM S.T. and SHANMUGAN K.T. (1979)

Regulation of hydrogen utilisation in Rhizobium japonicum by cyclic AMP.

Biochim. Biophys. Acta, 584, 479-492.

LIN E.C.C. (1976)

Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria.

Ann. Rev. Microbiol., 30, 535-578.

LO C.Y. and SANWAL B.D. (1975)

Isolation of the soluble substrate recognition component of the dicarboxylate transport system of Escherichia coli.

J. Biol. Chem., 250, 1600-1602.

LO T.C.Y. and BEWICK M.A. (1981)

Use of a non-penetrating substrate analog to study the molecular mechanism of the outer membrane dicarboxylate transport system in Escherichia coli.

J. Biol. Chem., 256, 5511-5517.

LOPILATO J., TSUCHIYA T. and WILSON T.H. (1978)

Role of Na⁺ and Li⁺ in thiomethyl galactoside transport by the melibiose transport system of Escherichia coli.

J. Bacteriol., 134, 147-156.

- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- LUCKEY M. and NIKAIDO H. (1980)
Specificity of diffusion channels produced by λ phage receptor protein of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 167-171.
- MAGASANIK B. (1961)
Catabolite repression.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 249-254.
- MAKMAN R.S. and SUTHERLAND E.W. (1965)
Adenosine 3',5'-phosphate in Escherichia coli.
J. Biol. Chem., 240, 1309-1314.
- MARAIS B., SLACHCIAK M. et MOSCHETTO Y. (1981)
Mesure photométrique et micro-informatique : exemple d'intégration d'un microprocesseur dans un dispositif de photométrie adapté à la microbiologie.
Innov. Tech. Biol. Med., 3, 309-322.
- McALLISTER C.F. and LEPO J.E. (1983)
Succinate transport by free-living forms of Rhizobium japonicum.
J. Bacteriol., 153, 1155-1162.
- McFALL and MANDELSTAM J. (1963)
Specific metabolic repression of three induced enzymes in Escherichia coli
Biochem. J., 89, 391-398.
- McGETRICK A.M., GOULDING C.F., MANIAN S.S. and O'GARA F. (1985)
Catabolite repression and role of cyclic AMP in CO₂ fixation and H₂ metabolism in Rhizobium spp.
J. Bacteriol., 163, 1282-1284.

- McKAY I.A., GLENN A.R. and DILWORTH M.J. (1985)
Gluconeogenesis in Rhizobium leguminosarum MNF 3841.
J. Gen. Microbiol., 131, 2067-2073.
- MIZUMO T. and KAGEYAMA (1978)
Separation and characterization of the outer membrane of
Pseudomonas aeruginosa.
J. Biochem. (Tokyo), 84, 179-191.
- MONOD J. (1943)
Communications (suite et fin) sur la nature du phénomène de
diauxie.
Ann. Inst. Pasteur, 71, 37-40.
- MONOD J. (1947)
The phenomenon of enzymatic adaptation.
Growth, 11, 223-289.
- MROZ C. (1984)
Le pléiomorphisme de Rhizobium à l'état libre : conditions
d'expression et physiologie.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle n°1238, Université des Sciences et
Techniques de Lille.
- NAKADA D. and MAGASANIK B. (1964)
The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of
 β -galactosidase by Escherichia coli.
J. Mol. Biol., 8, 105-127.
- NAKAE T. (1979)
A porin activity of purified λ -receptor proteins from
Escherichia coli, in reconstituted membrane vesicles.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 88, 774-781.

NAKAE T. and NIKAIDO H. (1975)

Outer membrane as a diffusion barrier in Salmonella typhimurium. Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer.

J. Biol. Chem., 250, 7359-7365.

NEIDHARDT F.C. and MAGASANIK B. (1956)

Inhibitory effect of glucose on enzyme formation.

Nature, 178, 801-802.

NEIDHARDT F.C. and MAGASANIK B. (1957)

Reversal of the glucose inhibition of histidase biosynthesis in Aerobacter aerogenes.

J. Bacteriol., 73, 253-259.

NEIDHARDT F.C. (1960)

Mutant of Aerobacter aerogenes lacking glucose repression.

J. Bacteriol., 80, 536-543.

NEU H.C. and HEPPEL L.A. (1965)

The release of enzymes from Escherichia coli during the formation of spheroplasts.

J. Biol. Chem., 240, 3685-3692.

NICOLAIDIS-STRUZYK M.J. (1985)

La reconnaissance Rhizobium meliloti - luzerne : rôle d'une lectine végétale et des polysaccharides bactériens.

Mémoire diplôme d'Ingénieur CNAM, Conservatoire National des Arts et Métiers, Centre Régional Associé de Lille.

NIKAIDO H. and VAARA M. (1985)

Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.

Microbiol. Rev., 49, 1-32.

OSUMI T. and SAIER Jr. M.H. (1982)

Mechanism of regulation of the lactose permease by the phosphotransferase system in Escherichia coli : evidence for protein - protein interaction.

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur Paris), 133A, 269-273.

OVERBEEKE N., Van SCHARRENBURG G. and LUGTENBERG B. (1980)

Antigenic relationships between pore proteins of Escherichia coli K-12.

Eur. J. Biochem., 110, 247-254.

PASTAN I. and PERLMAN R.L. (1968)

The role of the lac promoter locus in the regulation of β -galactosidase synthesis by cyclic 3'-5'-adenosine monophosphate.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 1336-1342.

PASTAN I. and PERLMAN R.L. (1970)

Cyclic adenosine monophosphate in bacteria.

Science, 169, 340-344.

PASTAN I. and ADHYA S. (1976)

Cyclic adenosine 5'-monophosphate in Escherichia coli.

Bacteriol. Rev., 40, 527-551.

PARNES J.R. and BOOS W. (1973)

Energy coupling of the β -methylgalactoside transport system of Escherichia coli.

J. Biol. Chem., 248, 4429-4435.

PERLMAN R. and PASTAN I. (1968)

Cyclic 3'5'-AMP : stimulation of β -galactosidase and tryptophanase induction in E. coli.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 30, 656-664.

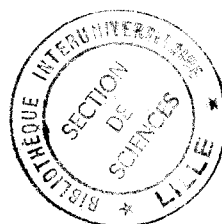
- PERLMAN R., DeCROMBRUGGHE B. and PASTAN I. (1969)
Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in Escherichia coli.
Nature, 223, 810-812.
- PHILLIPS A.T. and MULFINGER L.M. (1981)
Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in Pseudomonas putida and Pseudomonas aeruginosa, during induction and carbon catabolite repression of histidase synthesis.
J. Bacteriol., 145, 1286-1292.
- POOLE P.S., FRANKLIN M., GLENN A.R. and DILWORTH M.J. (1985)
The transport of L-glutamate by Rhizobium leguminosarum involves a common amino acid carrier.
J. Gen. Microbiol., 131, 1441-1448.
- POSTMA P. and ROSEMAN S. (1976)
The bacterial phosphoenol pyruvate : sugar phosphotransferase system.
Biochim. Biophys. Acta, 457, 213-257.
- REIBACH P.H. and STREETER J.G. (1984)
Evaluation of active versus passive uptake of metabolites by Rhizobium japonicum bacteroids.
J. Bacteriol., 159, 47-52.
- REIDER E., WAGNER E.F. and SCHWEIGER M. (1979)
Control of phosphoenol pyruvate - dependent phosphotransferase - mediated sugar transport in Escherichia coli by energization of the cell membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5529-5533.
- REMY J.P. (1980)
Contribution à l'étude du catabolisme du glucose chez Rhizobium meliloti.
DEA de Biochimie, Université des Sciences et Techniques de Lille.

- RICKENBERG H.V., COHEN G.N., BUTIN G. et MONOD J. (1956)
La galactoside perméase d'Escherichia coli.
Ann. Inst. Pasteur Paris, 91, 829-857.
- ROHM M. and WERNER D. (1985)
Regulation of the α -ketoadipate pathway in Rhizobium japonicum and bacteroids by succinate.
Arch. Microbiol., 140, 375-379.
- RONSON C.W. and PRIMROSE S.B. (1979a)
Carbohydrate metabolism in Rhizobium trifolii :
identification and symbiotic properties of mutants.
J. Gen. Microbiol., 112, 77-88.
- RONSON C.W. and PRIMROSE S.B. (1979b)
Effect of glucose on polyol metabolism by Rhizobium trifolii.
J. Bacteriol., 139, 1075-1078.
- RONSON C.W., LYTTLETON P. and ROBERTSON J. (1981)
 C_4 -dicarboxylate transport mutants of Rhizobium trifolii form
ineffective nodules on Trifolium repens.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4284-4288.
- RONSON C.W., ASTWOOD P.M. and DOWNIE J.A. (1984)
Molecular cloning and genetic organisation of C_4 -dicarboxylate
transport genes from Rhizobium leguminosarum.
J. Bacteriol., 160, 903-909.
- SAIER Jr. M.H. (1977)
Bacterial phosphoenol pyruvate : sugar phosphotransferase
systems : structural, functional and evolutionary inter-relationships.
Bacteriol. Rev., 41, 856-871.

- SAN FRANCISCO M.J.D. and JACOBSON G.R. (1985)
Uptake of succinate and malate in cultured cells and bacteroids of two slow-growing species of Rhizobium.
J. Gen. Microbiol., 131, 765-773.
- SANNO Y., WILSON T.H. and LIN E.C.C. (1968)
Control of permeation to glycerol in cells of Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 344-349.
- SAROSO S., GLENN A.R. and DILWORTH M.J. (1984)
Carbon utilization by free-living and bacteroid forms of Rhizobium cowpea strain NGR 234.
J. Gen. Microbiol., 130, 1809-1814.
- SCHINDLER H. and ROSENBUSCH J.P. (1978)
Matrix protein from Escherichia coli outer membranes forms voltage- controlled channels in lipid bilayers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3751-3755.
- SIEGEL L.S., HYLEMON P.B. and PHIBBS Jr. P.V. (1977)
Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and activities of adenylate cyclase and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in Pseudomonas aeruginosa and Bacteroides.
J. Bacteriol., 129, 87-96.
- SIMONI R.D. and ROSEMAN S. (1973)
Sugar transport VII. Lactose transport in Staphylococcus aureus.
J. Biol. Chem., 248, 966-974.
- SMART J.B., DILWORTH M.J. and ROBSON A.D. (1984)
Effect of phosphorus supply on phosphate uptake and alkaline phosphatase activity in Rhizobia.
Arch. Microbiol., 140, 281-286.

- STINSON M.W., COHEN M.A. and MERRICK J.M. (1976)
Isolation of dicarboxylic acid and glucose binding proteins
from Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol., 128, 573-579.
- STOCK J. and ROSEMAN S. (1971)
A sodium dependent sugar co-transport system in bacteria.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 132-138.
- STOWERS M.D. and ELKAN G.H. (1983)
The transport and metabolism of glucose in cowpea Rhizobia.
Can. J. Microbiol., 29, 398-406.
- TAKABE Y., SHIBUYA M. and KAZIRO Y. (1978)
A new extragenic suppressor of cya mutations.
J. Biochem., 83, 1615-1623.
- TAYLOR H.V. and YUDKIN M.D. (1978)
Synthesis of tryptophanase in Escherichia coli : isolation and
characterization of a structural gene mutant and two regulatory
mutants.
Mol. Gen. Genet., 165, 95-102.
- THEODOROPOULOS P. (1982)
Contribution à l'étude du transport du glucose chez Rhizobium
meliloti.
DEA de Biochimie, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- ULLMANN A. and MONOD J. (1968)
Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in Escherichia
coli.
FEBS Lett., 2, 57-60.
- ULLMANN A. (1974)
Are cyclic AMP effects related to real physiological phenomena ?
Biochem. Biophys. Res. Commun., 57, 348-352. .

- ULLMANN A., TILLIER F. and MONOD J. (1976)
Catabolite modulator factor : a possible mediator of catabolite repression in bacteria.
Proc. Natl. Accad. Sci. USA, 73, 3476-3479.
- ULLMANN A. and DANCHIN A. (1983)
Role of cyclic AMP in bacteria.
Advan. Cyclic Nucl. Res., 15, 1-53.
- ULLMANN A. (1985)
Catabolite repression.
Biochimie, 67, 29-34.
- UCKER D.S. and SIGNER E.R. (1978)
Catabolite - repression - like phenomenon in Rhizobium meliloti.
J. Bacteriol., 136, 1197-1200.
- VAN THIENEN G.M., POSTMA P.W. and VAN DAM K. (1978)
Na⁺ - dependent methyl- -thiogalactoside transport in Salmonella typhimurium.
Biochim. Biophys. Acta, 513, 395-400.
- WANDERSMAN C., SCHWARTZ M. and FERENCI T. (1979)
Escherichia coli mutants impaired in maltodextrin transport.
J. Bacteriol., 140, 1-13.
- WANNER B., KODAIRA R. and NEIDHARDT F.C. (1978)
Regulation of lac operon expression : reappraisal of the theory of catabolite repression.
J. Bacteriol., 136, 947-954.



Le transport du glucose chez Rhizobium meliloti M₅N₁ est réalisé par un mécanisme actif qui dépend de l'énergisation de la membrane. La perméase possède des fonctions thiols libres et son fonctionnement est favorisé par des métaux tels que le magnésium et le manganèse. La vitesse de l'accumulation du glucose dépend de sa concentration externe, selon un processus saturable de type Michaelien. La perméase a une très forte affinité pour le glucose, le Km apparent est de 0,68 µM. De plus, elle est spécifique du glucose ; sa stéréospécificité semble être liée à la nature et à la position des substituants des carbones en position 2 et 4 de la molécule du glucose. Le système de transport peut être considéré comme constitutif et il subit la répression catabolique AMPc dépendante par le succinate.