

N° d'ordre : 728

50376
1987
163

50376
1987
163

THÈSE D'ETAT

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Jean-Pierre HORNEZ



L'UTILISATION DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI* : DEGRADATION, TRANSPORT ET REGULATIONS

Présentée le 1er Juillet 1987 devant le Jury composé de :

Président et Rapporteur :	J.B.	GUILLAUME
Rapporteur :	C	BURSTEIN
Rapporteur :	J.	KREMBEL
Examineur :	C.	BONNIER
Examineur :	J.C.	DERIEUX
Examineur :	A.	VERBERT

B.U. LILLE I



D 030 090985 3

A toute ma famille,

REMERCIEMENTS

Nous remercions bien vivement M. le Professeur J. GUILLAUME de nous avoir accueilli au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois et de nous avoir confié un sujet de Thèse. Grâce à vos conseils toujours judicieux, ces travaux aboutissent aujourd'hui à la soutenance de ce Mémoire. Nous vous remercions d'en être le rapporteur et d'accepter de prendre la Présidence de ce Jury. Nous vous exprimons notre profonde gratitude.

M. le Professeur C. BURSTEIN nous a accueilli chaleureusement à l'Institut Jacques Monod, à Paris, et nous a toujours guidé avec efficacité dans la compréhension des mécanismes complexes du transport de métabolites chez les bactéries. Nous le remercions bien sincèrement de nous avoir fait bénéficier de ses compétences et d'avoir accepté être le rapporteur de nos activités.

M. le Professeur J. KREMBEL a toujours montré le plus vif intérêt pour nos travaux et a toujours su nous donner de précieux conseils. Nous le remercions aujourd'hui bien vivement d'avoir accepté être le rapporteur de notre Thèse.

Notre collaboration avec la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique) depuis le début de nos activités sur *Rhizobium* a toujours été fructueuse. La participation à ce Jury de M. le Professeur C. BONNIER nous honore aujourd'hui ; nous lui exprimons toute notre reconnaissance et nos sincères remerciements.

M. le Professeur J.C. DERIEUX nous a toujours assuré d'un soutien constant. La discussion régulière de nos travaux en a permis la progression logique et leur valorisation. Nous le remercions très sincèrement de bien vouloir juger ce travail.

Nous avons toujours trouvé auprès de M. le Professeur A. VERBERT toute aide et disponibilité sans limites malgré ses nombreuses occupations. Nous le remercions vivement d'avoir bien voulu juger ces travaux.

Que Messieurs COURTOIS et DEFIVES soient particulièrement remerciés. Leur collaboration scientifique concernant les exopolysaccharides produits par nos souches et la microscopie électronique a toujours été fructueuse. Leurs qualités humaines ont toujours favorisé l'esprit d'équipe.

Merci également à mes jeunes collaborateurs, THEODOROPOULOS et EL GUEZZAR, qui par leur dynamisme ont largement contribué à l'efficacité de notre Laboratoire dans une entente toujours cordiale.

Nous remercions bien vivement :

- Monsieur le Professeur J.P. BELAÏCH et Madame, de l'Université de Marseille et du C.N.R.S. pour nous avoir appris à faire des vésicules membranaires d'*Escherichia coli* ;
- Monsieur A. DANCHIN et Madame N. GUISO de l'Institut Pasteur à Paris pour la discussion de nos résultats sur la répression catabolique par le succinate et le rôle de l'AMP_c ;
- Messieurs A.R. GLENN et M.J. DILWORTH de l'Université de Murdoch en Australie pour la discussion de nos travaux sur la diauxie et la régulation des perméases ;
- Monsieur le Professeur H. LECLERC et Mlle F. GAVINI de l'INSERM à Villeneuve d'Ascq pour l'utilisation du biophotomètre.

Enfin, nous adressons toute notre reconnaissance à tous ceux, collègues et amis qui, à divers titres, nous ont apporté régulièrement aide et sympathie. Merci à M. A. DECQ pour son aide efficace lors des fermentations. Merci à Mlle M. DELECOURT pour son efficacité dans la frappe de tous nos manuscrits.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	Pages jaunes
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	
1. - LE GENRE <u>RHIZOBIUM</u>	7
2. - LA SYMBIOSE	8
2.1. <u>Installation de la bactérie dans la plante : la nodulation</u>	8
2.2. <u>La fixation de l'azote</u>	9
2.2.1. Généralités	9
2.2.2. La nitrogénase	11
2.2.3. Contrôle de la biosynthèse de la nitrogénase	12
2.2.4. Régulation de l'activité de la nitrogénase	12
2.2.4.1. <u>Régulation par la pression partielle en oxygène</u> .	12
2.2.4.2. <u>Régulation par l'apport énergétique</u>	13
3. - LE METABOLISME DU CARBONE CHEZ LES BACTEROÏDES	13
3.1. <u>Nutrition carbonée des bactéroïdes</u>	13
3.2. <u>Le transport des produits carbonés chez les bactéroïdes</u>	14
3.2.1. Le transport des hexoses et de leurs dérivés	14
3.2.2. Le transport des acides organiques	15
3.3. <u>Voies de dégradation mises en évidence</u>	16
3.3.1. Voies générales de catabolisme	16
3.3.2. Le catabolisme des hexoses	17
3.3.3. Le catabolisme des acides organiques	17
3.3.4. Le catabolisme des aldéhydes et des alcools	18
4. - LE METABOLISME DU CARBONE CHEZ LES CELLULES LIBRES	18
4.1. <u>Nutrition carbonée des cellules libres</u>	18
4.2. <u>Le transport des produits carbonés chez les cellules libres</u>	19
4.2.1. Le transport des disaccharides	21
4.2.2. Le transport des hexoses	21
4.2.2.1. <u>Aspect énergétique de ces systèmes</u>	21
4.2.2.2. <u>La spécificité de ces systèmes</u>	23
4.2.2.3. <u>La régulation de ces systèmes</u>	24

4.2.3.	Le transport des acides organiques	25
4.3.	<u>Voies de dégradations mises en évidence</u>	28
4.3.1.	Voies générales de catabolisme	28
4.3.1.1.	<u>La voie d'Embden-Meyerhof-Parnas</u>	28
4.3.1.2.	<u>La voie d'Entner-Doudoroff</u>	29
4.3.1.3.	<u>La voie de Dickens Horecker</u>	29
4.3.1.4.	<u>Le cycle de Krebs</u>	30
4.3.2.	Catabolisme des dissaccharides	32
4.3.2.1.	<u>Catabolisme du saccharose</u>	32
4.3.2.2.	<u>Catabolisme du lactose</u>	32
4.3.3.	Catabolisme des hexoses et de leurs dérivés	33
4.3.3.1.	<u>Catabolisme du glucose</u>	33
4.3.3.2.	<u>Catabolisme du fructose</u>	34
4.3.3.4.	<u>Catabolisme du galactose</u>	35
4.3.3.5.	<u>Catabolisme du gluconate</u>	37
4.3.3.6.	<u>Catabolisme des polyols</u>	39
4.3.4.	Catabolisme des pentoses	40
4.3.5.	Catabolisme des acides dicarboxyliques	43
4.3.6.	Catabolisme des composés en C3 et en C2	43
4.3.6.1.	<u>Catabolisme du glycérol</u>	43
4.3.6.2.	<u>Catabolisme du pyruvate</u>	44
4.3.6.3.	<u>Catabolisme du propionate</u>	44
4.3.6.4.	<u>Catabolisme de l'acétate</u>	44
4.3.6.5.	<u>Catabolisme de l'acétaldéhyde</u>	44
4.3.7.	Catabolisme des composés aromatiques	44

5. - CONCLUSION

MATERIEL ET METHODES

1. -	LES SOUCHES BACTERIENNES	48
1.1.	<u>Origine</u>	48
1.1.1.	Souches du Laboratoire	48
1.1.2.	Souches extérieures au Laboratoire	48
1.2.	<u>Les souches des différents groupes d'inoculation</u>	49
1.2.1.	Souches de <u>R. meliloti</u>	49
1.2.2.	Souches de <u>R. leguminosarum</u>	50
1.2.3.	Souches de <u>R. trifolii</u>	50

1.2.4.	<u>Souches de <i>R. phaseoli</i></u>	50
1.3.	<u>Contrôle de l'infectivité des souches de Rhizobium : le test de nodulation</u>	51
1.3.1.	Principe	51
1.3.2.	Réalisation du test	51
1.3.2.1.	<u>Prégermination aseptique des graines de Légumineuses</u>	51
1.3.2.2.	<u>Culture hydroponique aseptique des Légumineuses</u>	51
1.3.2.3.	<u>Inoculation des plantules</u>	52
2. -	LES MILIEUX	52
2.1.	<u>Les milieux de culture bactériens</u>	52
2.1.1.	Le milieu de Wright	52
2.1.2.	Le milieu TY	53
2.1.3.	Le milieu RC	53
2.1.4.	Le milieu RHB ₁	54
2.2.	<u>Le milieu de non prolifération bactérienne</u>	54
2.3.	<u>Le milieu de culture des Légumineuses</u>	54
3. -	LA MUTAGENESE ET L'ISOLEMENT DE MUTANTS METABOLIQUES ..	55
4. -	LES CONDITIONS DE CULTURE	55
4.1.	<u>Cultures en chambre chaude</u>	55
4.2.	<u>Cultures en biophotomètre</u>	56
4.2.1.	Le principe	56
4.2.2.	Préparation de l'inoculum	56
4.2.3.	Cultures et suivi	56
4.3.	<u>Cultures en fermenteurs</u>	56
4.3.1.	Description du matériel	57
4.3.2.	Pratique d'une fermentation	57
4.3.2.1.	<u>Préparation du matériel</u>	57
4.3.2.2.	<u>Réalisation de la préculture</u>	59
4.3.2.3.	<u>Ensemencement du fermenteur</u>	59
4.3.2.4.	<u>Conditions de culture</u>	59
4.3.3.	Détermination du coefficient de transfert en oxygène : le KLa	60
4.3.3.1.	<u>Théorie et principe de mesure</u>	61
4.3.3.2.	<u>Détermination par méthode chimique</u>	62
4.3.3.3.	<u>Détermination par méthode physique</u>	63

5. - METHODES UTILISEES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	65
6. - METHODES RESPIROMETRIQUES	66
6.1. <u>Principes généraux</u>	66
6.2. <u>Conditions expérimentales</u>	66
6.3. <u>Utilisation de radioisotopes lors de l'établissement du bilan respiratoire en présence d'oses</u>	68
7. - MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	69
7.1. <u>Mesures de l'activité des enzymes impliqués dans le catabolisme des glucides</u>	69
7.1.1. Les enzymes cytoplasmiques solubles	69
7.1.1.1. <u>Préparation des extraits cellulaires solubles</u>	69
7.1.1.2. <u>Recherche d'activités enzymatiques spécifiques de différentes voies cataboliques</u>	70
7.1.2. Les enzymes membranaires	70
7.1.2.1. <u>Préparation des extraits membranaires</u>	70
7.1.2.2. <u>Recherche des activités déshydrogénases spécifiques</u>	70
7.2. <u>Mesures de l'activité des enzymes impliqués dans le transport des glucides : les perméases</u>	88
7.2.1. Préparation des cellules pour des essais d'accumulation de substrats carbonés	88
7.2.2. Les produits radiomarqués	88
7.2.3. Accumulation des substrats carbonés	88
7.2.4. Efflux des produits accumulés	89
7.2.5. Nature des produits accumulés	89
7.2.5.1. <u>Extraction du matériel accumulé</u>	89
7.2.5.2. <u>Analyse par chromatographie sur couche mince</u> .	89
7.3. <u>Mesure de l'activité de la nitrogénase : contrôle de l'efficiencia des souches de Rhizobium</u>	90
7.3.1. Principe de la méthode	90
7.3.2. Dosage de l'éthylène	90
7.3.3. Conditions expérimentales	91
7.3.4. Calcul de la quantité d'éthylène produit	91
8. - RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES	92
8.1. <u>Principe</u>	92

8.2.	<u>Techniques d'électrophorèse et de chromatographie</u>	92
8.2.1.	Le support	92
8.2.2.	L'électrochromatographie	92
8.2.3.	Révélateurs chimiques pour la détermination de la position des témoins	92
8.3.	<u>Conditions expérimentales : recherche des métabolites intermédiaires</u>	93
8.3.1.	Préparation des extraits	93
8.3.2.	Analyse autoradiographique	93
9. -	IDENTIFICATION DU PRODUIT ACIDE	94
9.1.	<u>Fabrication de dérivés 2-4-dinitrophénylhydrazones</u>	94
9.2.	<u>Formation de dérivés quinoxalinols</u>	94
10. -	METHODES DE DOSAGES	94
10.1.	<u>Dosage des oses neutres</u>	94
10.2.	<u>Dosage enzymatique du glucose</u>	94
10.3.	<u>Dosage de l'acide 2 céto-gluconique</u>	95
10.4.	<u>Dosage des exopolysaccharides</u>	95
10.5.	<u>Dosage des protéines</u>	95
 RESULTATS ET DISCUSSION		
1. -	ETUDE PRELIMINAIRE	96
1.1.	<u>Introduction</u>	96
1.2.	<u>Observations en microscopie électronique</u>	97
1.3.	<u>Discussion</u>	98
1.4.	<u>Conclusion</u>	100
2. -	LA VOIE DE L'ACIDE 2 CETO-GLUCONIQUE	101
2.1.	<u>Mise en évidence d'une particularité métabolique chez Rhizobium meliloti</u>	101
2.1.1.	Croissance de la souche M5N1 de <u>R. meliloti</u>	101
2.1.1.1.	<u>Sur milieu gélosé</u>	101
2.1.1.2.	<u>Sur milieu liquide</u>	101
2.1.2.	Effets de la nature des substrats carbonés	102
2.1.2.1.	<u>Sur la modification du pH des milieux de culture</u>	102
2.1.2.2.	<u>Sur le rendement moléculaire de croissance</u>	103

2.1.2.3. <u>Sur la modification du pH des milieux de non prolifération</u>	104
- Survie des cellules non proliférantes	104
- Incubation en présence d'oses neutres	104
2.1.3. Extension à l'ensemble de l'espèce	105
2.2. <u>La voie acidifiante : identification et fonctionnement</u>	107
2.2.1. Identification du ou des produits acides	107
2.2.1.1. <u>Préparation et purification de la fraction acide</u> .	108
2.2.1.2. <u>Identification de la fraction acide</u>	108
- La formation de dérivés 2-4 dinitrophénylhydrazones	110
- La formation de dérivés quinoxalinols	111
- L'étude en spectroscopie infra-rouge	112
2.2.2. Identification des enzymes de la voie du 2 céto-gluconique	112
2.2.2.1. <u>Recherche des activités enzymatiques</u>	113
- Recherche de la glucose oxydase	113
- Recherche de déshydrogénases	113
2.2.2.2. <u>Localisation cellulaire des activités</u>	114
2.2.3. Propriétés des enzymes participant à la voie du 2 céto-gluconique	115
2.2.3.1. <u>pHmax et constantes cinétiques</u>	115
- Détermination du pH d'activité maximum	115
- Mesure des constantes cinétiques	116
- Bilan des caractéristiques physico-chimiques	116
2.2.3.2. <u>Spécificité</u>	117
2.2.3.3. <u>Régulation de leur synthèse</u>	118
2.3. <u>La physiologie de la production de l'acide 2 céto-gluconique</u>	119
2.3.1. En fonction du pH des milieux d'incubation	120
2.3.2. En fonction de la concentration initiale en glucose	120
2.3.2.1. <u>Conditions de croissance</u>	120
2.3.2.2. <u>Conditions de non prolifération</u>	122
2.3.3. En fonction du transfert en oxygène dans les milieux d'incubation	122
2.4. <u>Conclusion</u>	125

3. -	CATABOLISME DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE	127
3.1.	<u>Etude physiologique de l'utilisation du glucose et du fructose par Rhizobium meliloti</u>	127
3.1.1.	Croissance comparée	127
3.1.2.	Respiration comparée	128
3.1.2.1.	<u>Respiration endogène et épuisement des réserves cellulaires</u>	128
3.1.2.2.	<u>Respiration cellulaire à partir de glucose ou de fructose</u>	129
3.1.2.3.	<u>Quotients respiratoires</u>	132
3.1.2.4.	<u>Discussion et résultats complémentaires</u>	133
3.2.	<u>Assimilation de substrats radiomarqués, recherche et identification des intermédiaires</u>	133
3.2.1.	Détermination des coefficients de migration Rx des témoins	133
3.2.2.	Recherche d'intermédiaires	135
3.3.	<u>Recherche d'activités enzymatiques particulières au métabolisme des hydrates de carbone</u>	135
3.3.1.	Principe	135
3.3.2.	Réalisation	137
3.4.	<u>Voies cataboliques utilisées pour la croissance de R. meliloti à partir de glucose ou de fructose comme source de carbone</u>	139
3.4.1.	Isolement d'un mutant métabolique	139
3.4.1.1.	<u>Caractéristiques de croissance</u>	139
3.4.1.2.	<u>Appartenance du mutant au genre Rhizobium : infectivité et efficacité</u>	140
3.4.2.	Recherche de la nature de la mutation	141
3.4.3.	Contrôle de la nature de la mutation	142
3.5.	<u>Conclusion</u>	144
4. -	LE TRANSPORT DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE	147
4.1.	<u>Utilisation d'analogues structuraux du glucose</u>	147
4.1.1.	Cinétiques d'incorporation de l' α -méthyl-glucose et du 2 désoxy-glucose	147
4.1.2.	Nature des produits d'accumulation	148
4.1.3.	Expériences de déplacement (chassage)	150

4.2. <u>Mise en évidence du transport actif du glucose et du fructose</u>	151
4.2.1. Cinétiques d'accumulation du glucose et du fructose	151
4.2.2. Nature protéique des systèmes de transport	152
4.2.3. Mesures des constantes cinétiques	153
4.2.4. Action des inhibiteurs métaboliques	156
4.2.5. Spécificité : action des substrats carbonés simples	163
4.3. <u>Régulation de ces systèmes</u>	165
4.3.1. Inductibilité	165
4.3.2. Répression	166
4.3.2.1. <u>Mise en évidence de diauxies lors de cultures en biophotomètre</u>	166
4.3.2.2. <u>Mesure de la répression des systèmes de transport du glucose et du fructose par le succinate</u>	168
- Recherche d'un KLa adéquat pour le suivi de la croissance en continu	168
- Mesure de la répression du système de transport du glucose	169
- Mesure de la répression du système de transport du fructose	170
4.3.2.3. <u>Disparition du phénomène de diauxie par addition d'AMPcyclique</u>	171
4.4. <u>Conclusion</u>	172
 CONCLUSION GENERALE	 174
 RESUME	 178
 ANNEXES	
Métabolisme du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas	181
Métabolisme du glucose par la voie d'Entner-Doudoroff	182
Métabolisme du glucose par la voie de Dickens-Horecker	183
La famille des D-aldoses	184
La famille des D-cétoses	185
Les désoxyoses	186
Les polyols dérivés d'oses	186
Les disaccharides	187
 BIBLIOGRAPHIE	 I

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 -	Définition des espèces du genre Rhizobium	7
Tableau 2 -	Utilisation de différentes sources de carbone pour la croissance de Rhizobium	20
Tableau 3 -	Les différents systèmes de transport des hexoses et leurs caractéristiques chez les cellules libres de Rhizobium	22
Tableau 4 -	Les différents systèmes de transport des intermédiaires du cycle de Krebs et leurs caractéristiques chez les cellules libres de Rhizobium	26
Tableau 5 -	Modèle de répartition des différents éléments lors d'une manipulation type en appareil de Warburg	67
Tableau 6 -	Aspects des colonies d'une souche de Rhizobium meliloti (M5N1) cultivée sur milieu RC solide additionné de différentes sources de carbone à raison de 10 g/l et incubé à 30°C durant 5 jours	101
Tableau 7 -	Culture de la souche M5N1 de R. meliloti sur milieu RC liquide additionné de substrats carbonés à raison de 10 g/l	102
Tableau 8 -	Evolution du pH lors de la culture de Rhizobium meliloti (M5N1) sur milieu complet additionné de différentes sources de carbone à concentration de 1 %	103
Tableau 9 -	Calcul du rendement moléculaire de croissance de Rhizobium meliloti (M5N1) à partir de différents substrats carbonés utilisés dans la préparation de milieu synthétique	104
Tableau 10 -	Evolution de la viabilité des cellules de R. meliloti M5N1 conservées à $DO_{620} = 10,0$ dans le TNP à + 4°C	105
Tableau 11 -	Evolution du pH lors de l'incubation de suspensions non proliférantes de R. meliloti M5N1 à 30°C en agitation rotative, à $DO_{620} = 1,0$ en présence de glucose ou de fructose à raison de 10 g/l	105
Tableau 12 -	Acidification et production d'exopolysides par 12 souches de Rhizobium à croissance rapide, placées en conditions de non prolifération, en présence de fructose ou de glucose	106
Tableau 13 -	Acidification et production d'exopolysides par 27 souches de R. meliloti placées en conditions de non prolifération en présence de glucose ou de fructose	107

Tableau 14 - Valeurs relatives des coefficients de migration calculés pour chaque système de séparation électrophorétique en fonction du substrat le plus mobile dans le système	109
Tableau 15 - Valeurs relatives des coefficients de migration de différents substrats lors de leur chromatographie de partage, descendante, sur papier (1-2-3) ou de leur chromatographie d'adsorption, ascendante, sur couche mince (4)	109
Tableau 16 - Valeur des coefficients de migration (RF) des dérivés 2-4 dinitrophénylhydrazones (2-4 dinitrophénylhydrazine = 1) en chromatographie de partage sur papier par un solvant Butanol/Ethanol/Ammoniaque 0,5N 7/1/2/, v/v	110
Tableau 17 - Densités optiques à 330 nm et à 360 nm des dérivés de condensation de l'orthophénylène diamine avec l'acide 2 céto-gluconique commercial (témoin) et avec la fraction acide purifiée	111
Tableau 18 - Propriétés physico-chimiques des enzymes de la voie du 2 céto-gluconique chez Rhizobium meliloti	117
Tableau 19 - Mesure de l'activité glucose déshydrogénase, évaluée sur glucose, galactose, mannose et exprimée en nmoles de DIP réduit/mn x mg protéines, sur des extraits membranaires de cellules cultivées préalablement sur des substrats carbonés différents	119
Tableau 20 - Contrôle de la croissance de <u>R. meliloti</u> en milieu RHB ₁ par mesure de la densité optique à 620 nm des suspensions cellulaires et contrôle de l'évolution du pH en fonction de la concentration en glucose des milieux de culture	121
Tableau 21 - Quantités d'acide 2 céto-gluconique produit (µg/ml) en bioréacteur par une suspension de R. meliloti (10 ⁷ bactéries/ml) lors d'une incubation de 45 h dans 14 l de milieu de non prolifération additionné de 10 g/l de glucose, en fonction de transfert en oxygène variable (KLa en h ⁻¹)	124
Tableau 22 - Bilan de la respiration de R. meliloti (DO = 7,5) en présence de 166 µg/ml de glucose ou de fructose, soit 500 µg au total	130
Tableau 23 - Quotients respiratoires expérimentaux (Q _{RF}) mesurés sur des suspensions cellulaires de R. meliloti cultivé sur glucose (RmG) ou sur fructose (RmF) en présence de 166 ou 333 µg/ml d'ose	132

Tableau 24 -	Coefficients de migration relatifs des principaux représentants du métabolisme intermédiaire des hydrates de carbone, dans les systèmes de migration électrophorétique et chromatographique	134
Tableau 25 -	Mesures de différentes activités enzymatiques sur des extraits cytoplasmiques de cellules de Rhizobium meliloti cultivées sur milieu RHB ₁ additionné de glucose (Glc) ou de fructose (Fru) ou de succinate de sodium (Succ) ou de gluconate à raison de 10 g/l	138
Tableau 26 -	Temps de génération calculés lors de la croissance des souches de R. meliloti parentale (M5N1) et mutante (HD1) sur milieu RHB ₁ additionné de sources de carbone à raison de 2 g/l sauf pour les substrats en mélange 1 g/l chacun	139
Tableau 27 -	Propriétés symbiotiques des souches de R. meliloti M5N1 et HD1	140
Tableau 28 -	Mesures de différentes activités enzymatiques sur des extraits cytoplasmiques de cellules de R. meliloti sauvage (M5N1) ou mutant (HD1)	141
Tableau 29 -	Accumulation de fructose (Fru) et de fructose-6-phosphate (F-6-P) par R. meliloti M5N1 et HD1 lors de leur croissance en présence de différentes sources de carbone et de fructose	142
Tableau 30 -	Action de différents inhibiteurs métaboliques sur le transport du glucose et du fructose	162
Tableau 31 -	Action des substrats carbonés simples sur la perméation du fructose et du glucose : les substrats entrant en compétition sont ajoutés 30 s avant chacun des deux glucides	163
Tableau 32 -	Variations de l'activité perméasique des cellules de Rhizobium meliloti (R.m.) cultivées en présence de divers substrats carbonés	165

TABLE DES FIGURES

Figure 1 -	Etapes du développement d'un nodule fixateur d'azote chez le Trèfle et code phénotypique de mutants de R. trifolii modifiant différents stades de la maturation	10
Figure 2 -	Voies de dégradation du carbone chez les souches de Rhizobium à croissance rapide	31
Figure 3 -	Voies de dégradation du carbone chez les souches de Rhizobium à croissance lente	31
Figure 4 -	Mise en place de plantules de Légumineuses en culture aseptique	52
Figure 5 -	Vue éclatée de la conception d'un bioréacteur Setric Génie Industriel	58
Figure 6 -	Les différentes étapes du transfert d'oxygène en fermentation .	61
Figure 7 -	Cinétique de resaturation de l'oxygène dissous dans un réacteur	64
Figure 8 -	Coloration au citrate de plomb. Zone nodulaire II. Les bactéries (b) contenant des grains d'acide polyhydroxybutyrique (flèche) progressent dans le tissu nodulaire par l'intermédiaire d'un cordon infectieux mucilagineux (CI). Elles sont ensuite libérées dans le cytoplasme des cellules végétales (CV)	97
Figure 9 -	Coloration au citrate de plomb. Zone intermédiaire entre les zones II et III. Les bactéries grossissent, certaines d'entre elles peuvent encore se diviser (flèche)	97
Figure 10 -	Coloration au citrate de plomb. La forme générale des bactéries devient très tourmentée. Les cellules se recroquevillent dans l'espace limité par la membrane de séquestration	97
Figure 11 -	Coloration au citrate de plomb. La forme générale des bactéries devient très tourmentée. Les cellules se recroquevillent dans l'espace limité par la membrane de séquestration	97
Figure 12 -	Coloration au citrate de plomb. Zone nodulaire III dite zone "rouge". Naissance de membranes internes (flèche) dans les bactéroïdes	99
Figure 13 -	Coloration à l'acide périodique - thiosemicarbazide - protéinate d'argent. Accentuation de la cytomembrane de séquestration (CS) par un artifice de coloration. Présence de membranes internes (flèche) se développant sur trois épaisseurs	99

Figure 14 -	Coloration au citrate de plomb. Généralisation du développement des membranes internes surnuméraires (flèche) parallèlement aux structures externes des bactéroïdes	99
Figure 15 -	Spectre infra-rouge d'une solution témoin d'acide 2 céto-gluconique et de la fraction acide purifiée s'accumulant lors de la culture de Rhizobium meliloti en présence de glucose	112
Figure 16 -	Etude des produits de dégradation du glucose pour des extraits membranaires de Rhizobium meliloti	114
Figure 17 -	Activité de la glucose déshydrogénase (●●) et de la gluconate déshydrogénase (▲▲) en fonction du pH	115
Figure 18 -	Représentation selon LINEWEAVER-BURK de la variation des V_i de réduction de DIP en fonction de la concentration en glucose (●●) ou en gluconate (▲▲)	116
Figure 19 -	Oxydation du glucose par des extraits membranaires de Rhizobium meliloti en présence de quantités variables d'oses froids (●● galactose, ■■ fructose)	118
Figure 20 -	Accumulation d'acide 2 céto-gluconique par Rhizobium meliloti en suspension dans des milieux de non prolifération additionnés de glucose à 1 % et dont le pH initial est variable	120
Figure 21 -	Croissance de R. meliloti exprimée en densité optique mesurée à 620 nm sur milieu RHB ₁ additionné de glucose à raison de 10 g/l (▲▲). Evolution de la concentration en glucose au cours du temps (▲▲)	121
Figure 22 -	Courbes de disparition du glucose (en trait plein, échelle variable) et d'apparition de l'acide 2 céto-gluconique (en pointillé) lors de l'incubation de Rhizobium meliloti ($DO_{620} = 1,0$) en présence de différentes concentrations initiales de glucose	123
Figure 23 -	Courbe de croissance (○-○) de R. meliloti et variation du pH du milieu en fonction du temps (●●)	125
Figure 24 -	Courbes de croissance de Rhizobium meliloti en milieu RC (a) ou en milieu RHB ₁ (b) additionné de glucose (●●) ou de fructose (○-○) à 1 %, culture agitée sur table rotative à 30°C	127
Figure 25 -	Variation de la respiration endogène de R. meliloti en fonction du temps préalable d'épuisement des réserves cellulaires par agitation à 30°C dans le TNP	128
Figure 26 -	Courbes de consommation d'oxygène d'une suspension cellulaire de R. meliloti (cultivé sur glucose) en présence de 166 µg/ml de glucose (Glc) ou de fructose (Fru)	129

Figure 27 -	Courbes de consommation d'oxygène d'une suspension cellulaire de <i>R. meliloti</i> , cultivé sur glucose (●-● et ○-○) et sur fructose (▲-▲ et △-△) en présence de 333 µg/ml de glucose ou de fructose (Glc ou Fru), respiration endogène réduite	131
Figure 28 -	Electrochromatogrammes, révélés par autoradiographie, du contenu cytoplasmique hydrosoluble de <i>R. meliloti</i> après 10 mn d'assimilation du glucose (a), du fructose (b) ou du gluconate (c)	136
Figure 29 -	Inhibition de l'activité de la fructokinase par le fructose-6-P, mesurée sur des extraits cytoplasmiques de la souche HD1 de <i>R. meliloti</i> cultivée sur RHB ₁ additionné de glucose à 10 g/l.....	143
Figure 30 -	Voies cataboliques de composés carbonés empruntées par <i>R. meliloti</i> au niveau cytoplasmique	146
Figure 31 -	Cinétiques d'incorporation de l' α -méthyl-glucose (△-△) et du 2 déoxy-glucose (▲-▲) 10^{-4} pour <i>Rhizobium meliloti</i>	148
Figure 32 -	Chromatographie sur couche mince des produits radio-marqués extraits après une accumulation de l' α MeG durant 5 mn (▲-▲) et 60 mn (●-●)	149
Figure 33 -	Cinétiques de sortie du 2DG (a) et de l' α MeG (b) lors de l'incubation dans un excès de substrat (1 mM) de cellules ayant préalablement accumulé chacun d'entre eux (10^{-4} M) durant des temps variables (●-● 5 mn, ▲-▲ 30 mn, ○-○ 40 mn et △-△ 60 mn)	150
Figure 34 -	Cinétiques d'accumulation du glucose (●-●) 10^{-4} M et du fructose (○-○) 10^{-4} M par une suspension de <i>Rhizobium meliloti</i> à DO = 1,0, cultivé préalablement sur les substrats respectifs	151
Figure 35 -	Effet du chloramphénicol sur l'accumulation du glucose et du fructose chez <i>R. meliloti</i>	153
Figure 36 -	Représentation selon Lineweaver-Burk de la variation des V_i d'accumulation en fonction de la concentration en glucose, sans fructose (●-●), en présence de fructose 2 mM (▲-▲), en présence de fructose 4 mM (■-■)	155
Figure 37 -	Représentation selon Lineweaver-Burk de la variation des V_i d'accumulation en fonction de la concentration en fructose, sans glucose (●-●), en présence de glucose 20 mM (▲-▲), en présence de glucose 30 mM (■-■)	155
Figure 38 -	Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la glucose perméase de <i>R. meliloti</i>	157

Figure 39a - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la fructose perméase de R. meliloti	158
Figure 39b - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la fructose perméase de R. meliloti	159
Figure 39c - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la fructose perméase de R. meliloti	160
Figure 39d - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la fructose perméase de R. meliloti	161
Figure 40 - Croissance de R. meliloti sur milieu RHB ₁ additionné de succinate de sodium à 1 g/l ou à 2 g/l ¹	167
Figure 41 - Croissance de R. meliloti sur milieu RHB ₁ contenant du succinate de sodium à 1 g/l additionné de glucose à 1 g/l (a) ou de fructose à 1 g/l (b) (Biophotomètre)	167
Figure 42 - Suivi de la croissance de R. meliloti sur RHB ₁ additionné de succinate à 1 g/l plus glucose à 1 g/l (a) ou fructose à 1 g/l (b) et contrôle par mesure de la densité optique à 620 nm (Bioréacteur)	168
Figure 43 - Culture de R. meliloti sur milieu RHB ₁ additionné de succinate en concentration limitante et de glucose (●-● croissance de la souche, ▲-▲ variation de la concentration du glucose, ■-■ activité de la perméase au glucose)	169
Figure 44 - Culture de R. meliloti sur milieu RHB ₁ additionné de succinate en concentration limitante et de fructose (●-● croissance de la souche, ▲-▲ variation de la concentration du fructose, ■-■ activité de la perméase au fructose)	170
Figure 45 - Croissance suivie au biophotomètre de R. meliloti sur milieu RHB ₁ additionné de succinate (1 g/l) et de glucose (A) ou de fructose (B)	171
Figure 46 - Voies métaboliques empruntées par Rhizobium meliloti en présence de différents hydrates de carbone	177

ABREVIATIONS

Acetyl Co-A	:	acétyl coenzyme A
ADP	:	adénosine diphosphate
α MeG	:	α méthyl-glucose
AMP _C	:	adénosine monophosphate cyclique
L-Ara	:	L-arabinose
ARN	:	acide ribonucléique
Ars	:	arséniate
ATCA	:	acide trichloro-acétique
ATP	:	adénosine triphosphate
CAP	:	catabolic activator protein (protéine d'activation d'opérons cataboliques)
CCCP	:	carbonyl-cyanide-m-chlorophényl-hydrazone
2 céto-G	:	2 céto-gluconate
5 céto-G	:	5 céto-gluconate
CK	:	cycle de Krebs
Dct ⁻	:	déficient dans le transport des acides dicarboxyliques
2DG	:	2 désoxy-glucose
DH	:	Dickens-Horecker
DHAP	:	dihydroxyacétone phosphate
DIP	:	dichlorophénol indophénol
DNP	:	dinitrophénol
DNPH	:	dinitrophényl-hydrazine
DO	:	densité optique
ED	:	Entner-Doudoroff
EDTA	:	acide éthylène diamine tétracétique
EDTA _K	:	éthylène diamine tétracétate de potassium
EMP	:	Embden-Meyerhof-Parnas
Erythrose 4P	:	érythrose 4 phosphate
F 1-6 diP	:	fructose 1-6 diphosphate
F-6-P	:	fructose-6-phosphate
Fru	:	fructose
Gal-1-P	:	galactose-1-phosphate
GDH	:	glutamate déshydrogénase
Glc	:	glucose

GOGAT	:	glutamine oxoglutarate amino transférase (glutamate synthase)
G-1-P	:	glucose-1-phosphate
G-3-P	:	glycéraldéhyde-3-phosphate
G-6-P	:	glucose-6-phosphate
GS	:	glutamine synthétase
KDPG	:	2 céto-3-désoxy-6-phosphogluconate
KLa	:	coefficient de transfert en oxygène
Km	:	constante de Michaelis
μCi	:	micro-Curie
NAD^+	:	nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH	:	nicotinamide adénine dinucléotide réduite
NADP^+	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée
NADPH	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NEM	:	N-éthyl maléimide
PEP	:	phospho-énol-pyruvate
2PG	:	2 phosphoglycérate
6PG	:	6 phosphogluconate
PGI^-	:	phosphoglucose isomérase négatif
PHB	:	parahydroxy-butyrate
Pi	:	phosphate inorganique (phosphate minéral)
PTS	:	phospho-transferase-system
Rib-5-P	:	ribose-5-phosphate
TNP	:	tampon de non prolifération
U^{14}C	:	uniformément marqué au carbone radioactif
Vi	:	vitesse initiale
Vmax	:	vitesse maximale

A V A N T - P R O P O S

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

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

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

D'autres observations (WEBER 1898, HOPKINS 1902, VORHEES et LIMPAN 1905) viennent confirmer dès le début du siècle les travaux de HELLRIEGEL et de son collaborateur.

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

- un intérêt scientifique dans la mesure où la réduction enzymatique de l'azote gazeux représente une voie métabolique particulière mais fondamentale ;
- un intérêt économique en Agronomie où elle permet une limitation sinon une suppression de l'emploi des engrais azotés ainsi qu'une augmentation des rendements. Peut-être pouvons-nous entrevoir à ce niveau une solution pour combler en partie le déficit protéique mondial ?

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

L'association **Rhizobium-Légumineuse** est l'un des thèmes principaux traités au laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois. Dans ce cadre, nous nous intéressons particulièrement au métabolisme des glucides chez **Rhizobium meliloti**.

Les travaux rapportés dans ce Mémoire ont fait l'objet des publications et des communications suivantes.

PUBLICATIONS

1. HORNEZ J.P., COURTOIS B., DEFIVES C. et DERIEUX J.C.
Etude des membranes internes dans les bactéroïdes de *Rhizobium meliloti* au sein des nodules de luzerne (*Medicago sativa*).
C. R. Acad. Sciences Paris, 1974, 278, 157-160.
2. COURTOIS B., DERIEUX J.C. et HORNEZ J.P.
Etude des polyosides de *Rhizobium* à croissance rapide.
Annales Microbiol. Inst. Pasteur Paris, 1975, 126B (I), 1-15.
3. HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
Mise en évidence de voies de métabolisme différentes à partir du glucose ou du fructose chez *Rhizobium meliloti*.
C. R. Acad. Sciences Paris, 1976, 283, 1559-1562.
4. COURTOIS B., HORNEZ J.P. et DERIEUX J.C.
Effet de la synthèse d'acide 2 céto-gluconique sur la production d'exopolysaccharides par une souche de *Rhizobium meliloti*.
Can. J. of Microbiology, 1979, 25 (10), 1191-1196.
5. COURTOIS B., HORNEZ J.P., TAILLIEZ R., COURTOIS J. et DERIEUX J.C.
Méthode rapide de dosage des exopolysaccharides solubles produits par *Rhizobium meliloti*.
C. R. Acad. Sciences Paris, 1982, 294 (III), 95-98.
6. COURTOIS B., HORNEZ J.P., COURTOIS J. et DERIEUX J.C.
Mise en évidence d'une propriété métabolique chez *Rhizobium meliloti* utilisable pour sa classification.
Annales Microbiol. Inst. Pasteur Paris, 1983, 134B, 141-147.
7. HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
Bilan comparé de l'utilisation par voie oxydative du glucose et fructose par une souche de *Rhizobium meliloti*.
Annales Microbiol. Inst. Pasteur Paris, 1983, 134B, 231-234.

8. DERIEUX J.C., HORNEZ J.P. et COURTOIS B.
Effet de la concentration en glucose sur le métabolisme oxydatif de **Rhizobium meliloti**.
C. R. Acad. Sciences Paris, 1983, 296, série III, 995-1000.
9. MROZ C., COURTOIS B., HORNEZ J.P. and DERIEUX J.C.
Isolation and characterization of a pleiomorphic mutant of **Rhizobium meliloti**.
Symbiotic Nitrogen Fixation (1), 1984. Ed. B.S. GHAI, U.S.G. Publishers and Distributors, Ludhiana (India).
10. THEODOROPOULOS P.A., HORNEZ J.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C.
Evidence of an active glucose uptake in **Rhizobium meliloti**.
Annales Microbiol. Inst. Pasteur Paris, 1985, 136A, 261-269.
11. HORNEZ J.P., THEODOROPOULOS P.A., COURTOIS B. and DERIEUX J.C.
Diauxic growth observed during batch culture of **Rhizobium meliloti**.
Letters Applied Microbiol., 1987, soumis LAM/JMG/389.
12. EL GUEZZAR M., HORNEZ J.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C.
Regulation of a phosphoglucose isomerase mutant of **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 1987, soumis JB-253-87.

COMMUNICATIONS

1. COURTOIS B., HORNEZ J.P., COURTOIS J. et DERIEUX J.C.
Conditions de production d'exopolysaccharides solubles par des bactéries non proliférantes de **Rhizobium meliloti**.
Bull. Soc. bot. Fr., 1982, 35, 19-25.
2. MROZ C., COURTOIS B., HORNEZ J.P. and DERIEUX J.C.
Characterization of a pleiomorphic mutant of **Rhizobium meliloti**.
Advances in Nitrogen Fixation. Proceeding on 5th International Symposium, 1984. Ed. C. VEEGER and W.E. NEWTON, Den Haag (Netherlands).
3. HORNEZ J.P., THEODOROPOULOS A.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C.
Diauxic growth and catabolic repression in **Rhizobium meliloti**.
Advances in Nitrogen Fixation. Proceeding on 5th International Symposium, 1984. Ed. C. VEEGER and W.E. NEWTON, Den Haag (Netherlands).
4. THEODOROPOULOS P.A., HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
Production d'exopolysaccharides solubles par **Rhizobium meliloti** en présence de gluconate de sodium.
Comptes-Rendus Forum des Jeunes Chercheurs, Liège, 1985.
5. THEODOROPOULOS P.A., HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
Le mécanisme de transport des hydrates de carbone chez **Rhizobium meliloti** est ATP-dépendant.
Comptes-Rendus Forum des Jeunes Chercheurs, Liège, 1985.

TRAVAUX ANNEXES

- Biotechnologie et Microbiologie industrielle

1. HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
Importance de l'oxygénation lors de la production de **Rhizobium meliloti** en milieu glucosé.
Bio-Sciences, 1982, 1, 5-7.
2. COURTOIS B., HORNEZ J.P. et DERIEUX J.C.
Mise en évidence d'un système de synthèse d'exopolysaccharides solubles par **Rhizobium meliloti** en non prolifération.
Bio-Sciences, 1982, 4, 59-62.
3. HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
Production d'exopolysaccharides en bioréacteur par des cellules non proliférantes de **Rhizobium meliloti**.
Bio-Sciences, 1982, 1 (5), 71-74.
4. OCHIN D., HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
Conservation de la viabilité de **Rhizobium meliloti** par lyophilisation.
Bio-Sciences, 1983, 2 (7), 114-115.
5. HORNEZ J.P., OCHIN D., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
Maintien de l'infectivité et de l'efficience de **Rhizobium meliloti** après lyophilisation.
Bio-Sciences, 1983, 8, 137-138.
6. COURTOIS B., HORNEZ J.P. et DERIEUX J.C.
Etude de la résistance à différents facteurs défavorables de **Rhizobium meliloti** non proliférant.
Bio-Sciences, 1983, 11 (11), 198-199.

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

I. - LE GENRE RHIZOBIUM

Rhizobium représente selon PREVOT (1961) le genre unique de la tribu des Rhizobiae, appartenant à la famille des Protobacteriaceae de l'ordre des Bactériales. Il regroupe l'ensemble des bactéries capables d'induire la formation de nodules morphologiquement bien distincts, sur les racines d'au moins 130 plantes de la famille des Légumineuses (VINCENT, 1974).

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 (tab. 1). La définition des espèces par rapport aux groupes d'inoculation (BURRIL et HANSEN, 1917) a été proposée par FRED et coll. (1932).

Croissance	Espèce	Groupe d'inoculation	Plantes-hôtes préférées
rapide	R. meliloti	Luzerne	Medicago, Melilotus, Trigonella
	R. leguminosarum	Pois	Pisum, Vicia, Lathyrus, Leus
	R. trifolii	Trèfle	Trifolium
	R. phaseoli	Haricot	Phaseolus
lente	R. lupini	Lupin	Lupinus, Ornithopus
	R. japonicum	Soja	Glycine max
	R. type "cowpea"	Cowpea	Arachis, Vigna, Desmodium Macroptilium Parasponia (Ulmaceae)

Tableau 1 - Définition des espèces du genre Rhizobium.

Il faut noter qu'en 1973 une plante n'appartenant pas à la famille des Légumineuses (Papilionacées, Césalpiiniées et Mimosées) et ensuite identifiée à *Parasponia rugosa* Bl. de la famille des Ulmacées (plantes dicotylédones apétales) a été décrite comme capable de développer avec *Rhizobium* des nodules efficaces, c'est-à-dire capables d'assurer la réduction de l'azote atmosphérique (TRINICK, 1973 ; AKKERMANS, 1978 ; MORRISON et coll., 1983).

Métaboliquement, les Rhizobia se divisent en deux groupes (ALLEN et ALLEN, 1950 ; ELKAN, 1981) (tab. 1) :

- les espèces à croissance rapide isolées de Légumineuses de régions tempérées. Leur temps de génération varie de 2 à 4 h et elles forment sur milieu gélosé des colonies de 2 à 4 mm de diamètre en 3 à 5 jours d'incubation ;
- les espèces à croissance lente isolées de Légumineuses d'origine tropicale. Leur temps de génération est supérieur à 6 h et elles forment sur milieu gélosé des colonies de 1 mm de diamètre en 7 à 10 jours d'incubation.

Ces groupes diffèrent de plus par leur nutrition carbonée (ALLEN et ALLEN, 1950 ; GRAHAM, 1964 ; MARTINEZ et coll., 1974 ; SKOTNICKI, 1977 ; CHAKRABARTI et coll., 1981 ; STOWERS et ELKAN, 1983 ; STOWERS et EAGLESHAM, 1984 ; STOWERS et ELKAN, 1984a) ou par leur composition enzymatique (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970 ; KENNEDY et GREENWOOD, 1982 ; HERNANDEZ et FOCHT, 1984). JORDAN qui définissait en 1974 (JORDAN et ALLEN, 1974) dans la 8ème édition du "Bergey's Manual of determinative bacteriology" sous le nom *Rhizobium* l'ensemble des bactéries gram-négatif capables en symbiose de réduire l'azote atmosphérique, a proposé récemment (JORDAN, 1982) en accord avec VINCENT (1982) de considérer le groupe des souches à croissance lente comme un genre différent qu'il appelle *Bradyrhizobium*.

2. - LA SYMBIOSE

2.1. Installation de la bactérie dans la plante : la nodulation

Le processus de nodulation des Légumineuses est commun et peut être traduit simplement : la bactérie du genre *Rhizobium* pénètre spécifiquement le tissu racinaire de la plante-hôte et s'y propage par l'intermédiaire d'un cordon infectieux (FAHRAËUS, 1957 ; NUTMAN, 1959 ; NUTMAN et coll., 1960 ; HAACK, 1964). Sa libération dans le cytoplasme des cellules végétales s'accompagne de sa transformation progressive en bactéroïdes (JORDAN, 1962 ; DART et MERCER, 1963). Entouré d'une membrane de séquestration (DIXON, 1964 ; GOODCHILD et

BERGERSEN, 1966 ; KIJNE, 1974) et noyé dans une solution de leghémoglobine (BERGERSEN et BRIGGS, 1958 ; TU, 1974), ce bactéroïde acquiert la totalité du potentiel enzymatique pour la réduction de l'azote atmosphérique (BERGERSEN, 1967 ; BERGERSEN et TURNER, 1967) qu'il effectue par l'intermédiaire de la nitrogénase (BERGERSEN et TURNER, 1967 ; KOCH et coll., 1967).

L'ensemble de ce mécanisme est contrôlé génétiquement. On a pu isoler des mutants bactériens incapables d'assurer la symbiose et perturbés à différents niveaux. Ils sont classés en non nodulants (Nod⁻) ou en non fixateurs d'azote (Fix⁻). Des phénotypes de ces mutants ont été décrits par rapport au développement nodulaire en précisant la structure du nodule au-delà de laquelle la maturation est bloquée. VINCENT (1980) a présenté une revue générale de ces travaux et a proposé un code décrivant les différents phénotypes isolés. La figure 1 présente la séquence des différentes étapes symbiotiques et les codes phénotypiques dérivés des mutants obtenus chez *R. trifolii* (ROLFE et coll., 1981).

2.2. La fixation de l'azote

2.2.1. Généralités

Rhizobium ne fixe l'azote *in vivo* que lors de sa symbiose avec les Légumineuses. En effet, le complexe enzymatique impliqué dans ce mécanisme n'apparaît dans la cellule bactérienne que lorsque celle-ci s'est transformée en bactéroïde lors de la maturation des nodules de la racine des plantes (BERGERSEN et TURNER, 1967). Cependant, quelques souches à croissance lente développent le mécanisme lors de leur croissance *in vitro* (PAGAN et coll., 1975 ; BERGERSEN et GIBSON, 1977).

L'ammonium est le premier produit formé durant la fixation de l'azote (KENNEDY, 1966). La présence dans le bactéroïde à la fois de la nitrogénase et des enzymes impliquées dans l'assimilation des ions ammonium (glutamate déshydrogénase : GDH EC 1.4.1.3. ; glutamine synthétase : GS EC 6.3.1.2. ; glutamate synthase : GOGAT EC 2.6.1.53) a fait penser à l'origine que cet ammonium était assimilé dans le bactéroïde et ensuite excrété dans le cytosol de la plante-hôte sous forme d'acides aminés :

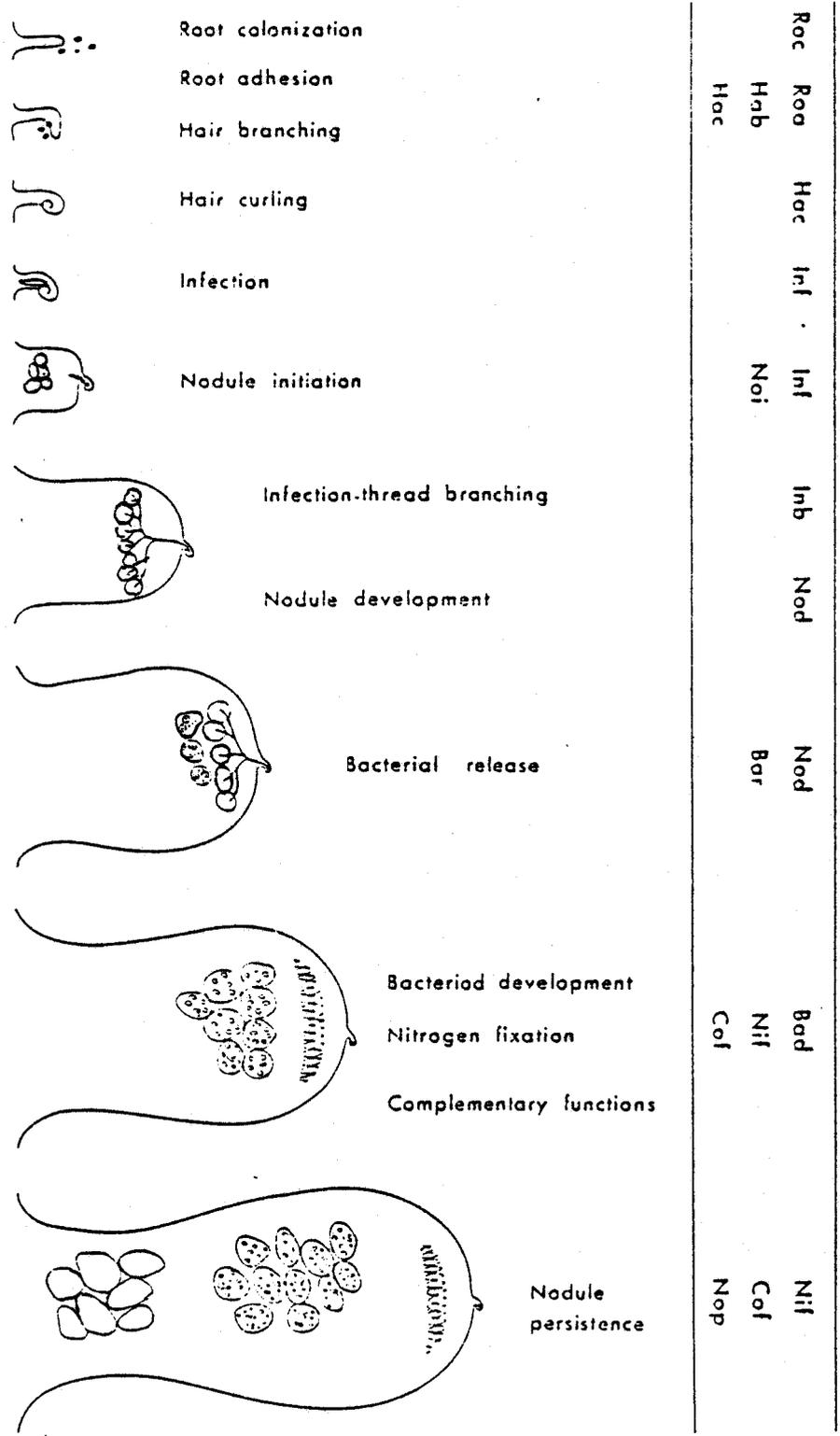
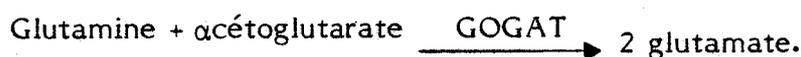
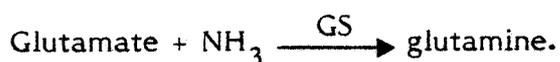
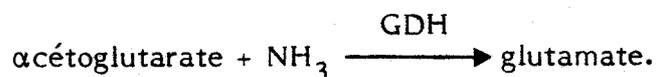


Figure 1 - Etapes du développement d'un nodule fixateur d'azote chez le Trèfle et code phénotypique de mutants de *R. trifolii* modifiant différents stades de la maturation (d'après ROLFÉ et coll., 1981).





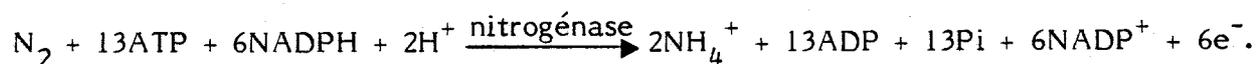
On sait aujourd'hui que l'ammonium est excrété du bactéroïde et assimilé par le cytosol végétal (MIFLIN et LEA, 1976). Ceci est en accord avec les observations de BERGERSEN dès 1971 et d'O'GARA et SHANMUGAM en 1976.

2.2.2. La nitrogénase

Le complexe enzymatique catalysant la réduction de l'azote est commun à tous les organismes fixateurs. Il a fait l'objet de nombreux travaux rapportés dans la Revue Générale de WINTER et BURRIS (1976). Il porte le nom de nitrogénase, enzyme protéique constituée de plusieurs sous-unités.

Chez la plupart des organismes, il est constitué de deux composants majeurs de poids moléculaire de 200 000 et 50 000 respectivement. Le plus important, la molybdoferredoxine, contient du molybdène et du fer non héminique et est constitué de 4 sous-unités. Le plus petit, l'azofferredoxine n'est constitué que de 2 sous-unités contenant du fer (ORME-JOHNSON et coll., 1977). La carence en molybdène ou en fer peut réduire la capacité fixatrice d'azote (LA RUE, 1977).

En présence d'ATP et d'agents réducteurs puissants, la nitrogénase réduit l'azote en ammonium à température ambiante et à pression atmosphérique. Chez les bactéries symbiotiques, ces réducteurs, dont la nature n'est pas encore clairement établie, semblent être des nicotinamides-adénines dinucléotides phosphates réduites (WONG et coll., 1971) :



Cette réaction nécessite 355 KJ/ion ammonium formé (BERGERSEN, 1971 ; EVANS et coll., 1980). Elle est pratiquement deux fois plus efficace que le procédé de réduction industriel qui nécessite 680 KJ/mole NH_3 . Cet apport d'énergie correspond dans les procédés biologiques ou industriels à l'énergie d'activation de la réaction (qui est très élevée à cause de la triple liaison de l'azote moléculaire) à laquelle il faut ajouter, dans le procédé industriel, l'énergie nécessaire à la production d'hydrogène.

2.2.3. Contrôle de la biosynthèse de la nitrogénase

La glutamine synthétase participe directement au contrôle génétique de la fixation de l'azote en agissant comme un facteur de contrôle positif, activant la transcription de la nitrogénase. En présence de quantités importantes de glutamine ou de NH_4^+ , elle est inactivée par adénylation et ne peut plus se fixer sur le gène promoteur voisin du site de fixation de l'ARN polymérase, d'où une absence de synthèse de la nitrogénase (BISHOP et coll., 1976 ; SCOWCROFT et coll., 1976 ; STREICHER et VALENTINE, 1977 ; AUSUBEL et coll., 1977).

2.2.4. Régulation de l'activité de la nitrogénase

2.2.4.1. Régulation par la pression partielle en oxygène

La nitrogénase est très rapidement inactivée par l'oxygène (BERGERSEN, 1971). Dans le nodule, c'est la léghémoglobine synthétisée en partie par la plante-hôte (DILWORTH, 1969 ; VERMA et BAL, 1976) qui régule la concentration en oxygène au niveau des sites du complexe nitrogénasique (TAJIMA et coll., 1985). Alors que les chaînes protéiques formant la partie globine de la molécule sont codées par l'ADN de la plante (DILWORTH, 1969 ; BAULCOMBE et VERMA, 1978 ; SULLIVAN et coll., 1981) et synthétisées par les ribosomes du cytoplasme de la cellule végétale (VERMA et BAL, 1976 ; VERMA 1982), il semble que l'hème est principalement fourni par les bactéroïdes. Cette affirmation s'appuie sur les observations suivantes :

- les bactéroïdes sont capables de convertir l'acide δ amino lévulinique en hème (DILWORTH, 1969 ; CUTTING et SCHULMAN, 1969) ;
- leur production en hème **in vitro** augmente considérablement lorsqu'ils sont sous faible pression partielle en oxygène (AVISSAR et NADLER, 1978) ;
- des mutants auxotrophes hème⁻ forment des nodules inefficients dans lesquels on n'observe pas d'accumulation de léghémoglobine (VERMA et LONG, 1983).

Ce pigment rouge, qui témoigne de l'efficacité d'une souche par la simple observation des nodules, a une très grande affinité pour l'oxygène (WITTENBERG et coll., 1974) et est localisé entre la membrane de séquestration d'origine végétale (GOODCHILD, 1978) et les structures pariétales des bactéroïdes (BERGERSEN et GOODCHILD, 1973). Ceux-ci nécessitent cependant des quantités importantes d'oxygène pour produire les réducteurs issus du métabolisme respiratoire et impliqués dans la réduction de l'azote. La léghémoglobine facilite la diffusion de

l'oxygène tout en maintenant la faible pression partielle en gaz de façon à ne pas entraver le fonctionnement de la nitrogénase (BERGERSEN et coll., 1973 ; TJEPKEMA et YOCUM, 1974 ; WITTENBERG et coll., 1974).

2.2.4.2. Régulation par l'apport énergétique

La nitrogénase a besoin d'ATP pour fonctionner, c'est lui qui va jouer le rôle le plus important dans la régulation de son activité (KOCH et coll., 1977). Celle-ci est directement proportionnelle au rapport cellulaire ATP/ADP et a un seuil minimum très bas, en-dessous duquel elle est inactive (APPLEBY et coll., 1975). CHING, en 1976, montre que l'ATP produit lors de la respiration stimule l'activité nitrogénasique *in vivo* en augmentant la charge énergétique de la cellule. Cette notion de charge énergétique est celle d'ATKINSON (1968, 1969) et est définie comme le rapport des concentrations de $(ATP + 0,5 ADP)/(ATP + ADP + AMP)$ en présence d'adénylate kinase, EC 2.7.4.3.). La valeur d'équilibre est égale à 0,8, les valeurs 1 et 0 correspondant respectivement à la présence d'ATP seul ou d'AMP seul.

L'adénylate kinase participe à la production d'ATP pour la maintenance du métabolisme de base du bactéroïde et de la fixation de l'azote durant les périodes de manque de substances organiques énergétiques, mais ceci durant un temps limité par la disponibilité d'ADP.

L'ATP est régénéré lors de l'utilisation par la cellule bactérienne des produits de la photosynthèse de la plante (ALLISON, 1975 ; BERGERSEN, 1970 ; CHING et coll., 1975 ; GERSON et coll., 1978 ; etc...). Les chaînes de phosphorylation oxydative sont très efficaces (DE HOLLANDER et coll., 1979) et un complexe ATPasique différent est synthétisé lors de la différenciation de la cellule bactérienne en bactéroïde pendant la symbiose (SKOTNICKI et ROLFE, 1979).

3. - LE METABOLISME DU CARBONE CHEZ LES BACTEROÏDES

3.1. Nutrition carbonée des bactéroïdes

Une très grande variété de substances organiques est disponible dans le cytosol de la plante-hôte pour alimenter en énergie les bactéroïdes de **Rhizobium** et assurer la réduction de l'azote. Cependant, peu de ces composés peut être utilisé par les cellules bactériennes, il s'agit d'acides organiques, d'aldéhydes ou d'alcools.

Les bactéroïdes de **R. leguminosarum** sont capables d'utiliser le succinate, le fumarate, le malate et le pyruvate mais pas le glucose, l'histidine ou le para-hydroxybenzoate (GLENN et DILWORTH, 1981a).

Le fructose, le ribose, le saccharose, le mannitol, le lactose, le galactose et le glycérol sont oxydés à des taux très bas (TUZIMURO et MEGURA, 1960). A concentration élevée (0,5 M) le glucose et le fructose stimulent cependant la respiration des bactéroïdes de **R. leguminosarum**, ainsi que l'acétaldéhyde, l'acétate, l'éthanol, le glyoxylate, le propionaldéhyde, le pyruvate, le pyruvaldéhyde, le butyraldéhyde, le succinate, le semi-aldéhyde succinique et le benzaldéhyde (TUZIMURO et MEGURA, 1960 ; PETERSON et LA RUE, 1981).

3.2. Le transport des produits carbonés chez les bactéroïdes

L'étude du mécanisme de transport chez les bactéroïdes de **Rhizobium** est très récente.

3.2.1. Le transport des hexoses et de leurs dérivés

Le transport du glucose s'effectue par un mécanisme passif de diffusion facilitée chez les bactéroïdes de **R. leguminosarum** (HUDMANN et GLENN, 1980 ; GLENN et DILWORTH, 1981b ; DE VRIES et coll., 1982 ; HOOYMANS et LOGMAN, 1984) et chez ceux de **R. japonicum** (REIBACH et STREETER, 1984). Il en est de même :

- pour le fructose chez ceux de **R. leguminosarum** (GLENN et coll., 1984a ; HOOYMANS et LOGMAN, 1984) et chez ceux de **R. cowpea** (SAROSO et coll., 1984) ;
- pour le saccharose et le lactose chez ceux de nombreux **Rhizobium** (GLENN et DILWORTH, 1981b) ;
- pour le saccharose chez ceux de **R. japonicum** (STREETER et REIBACH, 1984) ;
- pour le D-pinitol, le myo-inositol et le glucose-6-phosphate chez ceux de **R. japonicum** (REIBACH et STREETER, 1984).

La plupart de ces études d'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'inaccessibilité de cette protéine pour son substrat causée par la déformation des cellules lors de la vie symbiotique ou durant leur isolement, à l'endommagement de la perméase ou encore au non respect de la polarité de la membrane.

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.

3.2.2. Le transport des acides organiques

L'étude du mécanisme de transport de ces composés est particulièrement intéressante quand on sait qu'ils sont facilement oxydés par les bactéroïdes et qu'ils fournissent l'énergie au complexe nitrogénasique (BERGERSEN, 1977 ; PETERSON et LA RUE, 1981). On a pu montrer également que l'utilisation des acides dicarboxyliques du cycle de Krebs était la source principale d'énergie du bactéroïde (RONSON et PRIMROSE, 1979 ; GLENN et BREWIN, 1981 ; RONSON et coll., 1981 ; GARDIOL et coll., 1982 ; FINAN et coll., 1983 ; REIBACH et STREETER, 1983 ; KOUCHI et YONEYAMA, 1984).

Le transport du succinate a été étudié chez les bactéroïdes de *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1980 ; DE VRIES et coll., 1982 ; FINAN et coll., 1983), de *R. japonicum* associé à celui du malate (REIBACH et STREETER, 1984 ; SAN FRANCISCO et JACOBSON, 1985) ainsi que de *R. cowpea* aussi associé à celui du malate (SAN FRANCISCO et JACOBSON, 1985). Il est réalisé par un système de transport d'acides dicarboxyliques en C_4 (Dct), il est constitutif, actif et dépendant d'une membrane énergisée, et peut véhiculer le succinate, le fumarate, le malate et d'autres analogues (GLENN et coll., 1980).

Le transport du succinate par le système Dct n'est pas modifié par le malonate, le citrate, le phénylsuccinate, le N-butylmalonate ou l'arséniate, mais est inhibé par le succinate, le 2-2-difluorosuccinate, le fumarate, l'oxalo-acétate, le dinitrophénol et le para-trifluorométhoxy-phénylhydrazone (FINAN et coll., 1983). Dans d'autres travaux, le transport du succinate est inhibé par le dinitrophénol et l'azide mais non par l'arséniate (GLENN et coll., 1980).

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 (FINAN et coll., 1983 ; REIBACH et STREETER, 1984 ; SANS FRANCISCO et JACOBSON, 1985).

L'organisation et la régulation des gènes de structure du système Dct ont été étudiées chez *R. leguminosarum* (RONSON et coll., 1984) et chez *R. meliloti* (BOLTON et coll., 1986). Un système Dct fonctionnel est essentiel chez le bactéroïde pour le fonctionnement de la réduction de l'azote aussi bien sur des cellules isolées (FINAN et coll., 1983) que sur des plantes entières nodulées (ELKAN et KWIK, 1968 ; GLENN et BREWIN, 1981 ; RONSON et coll., 1981 ; FINAN et coll., 1983 ; ARWAS et coll., 1986).

3.3. Voies de dégradations mises en évidence

3.3.1. Voies générales de catabolisme

Nous n'avons encore aujourd'hui que peu d'informations concernant le potentiel enzymatique des bactéroïdes impliqué dans la dégradation des produits carbonés.

Les hydrates de carbone ne sont en général pas métabolisés par les bactéroïdes de *Rhizobium* (TUZIMURO et MEGURA, 1960 ; BERGERSEN et TURNER, 1975) alors que les acides organiques sont une source de carbone et d'énergie pour les bactéroïdes de *R. leguminosarum* (GLENN et DILWORTH, 1981a) et de *R. japonicum* ainsi que les aldéhydes et les alcools (TUZIMURO et MEGURA, 1960 ; BERGERSEN et TURNER, 1975 ; PETERSON et LA RUE, 1981).

Il faut cependant noter que les enzymes-clé des voies d'Entner-Doudoroff et de Dickens-Horecker sont présents chez les bactéroïdes de *R. leguminosarum* mais à un taux d'activité identique à celui observé sur des cellules correspondantes cultivées sur malate, ou encore à un taux nettement moindre comparé à celui obtenu sur des cellules cultivées sur glucose (GLENN et coll., 1984b). Par contre, chez les bactéroïdes de *R. japonicum* on ne trouve aucun des enzymes impliqués dans les trois voies principales de dégradation des hydrates de carbone (EMP, ED, DH) mais il existe chez eux des hexoses-kinases (STREETER et REIBACH, 1984).

3.3.2. Le catabolisme des hexoses

L'utilisation des hexoses en tant que source principale d'énergie pour les bactéroïdes est généralement mise en doute. En effet, des mutants glucokinase⁻ (RONSON et PRIMROSE, 1979 ; GLENN et coll., 1984b), fructokinase⁻ (GLENN et coll., 1984b), phosphoglucose isomérase⁻ (ARIAS et coll., 1979) et pyruvate déshydrogénase⁻ (GLENN et coll., 1984) développent sur les Légumineuses correspondantes des nodules efficaces, bien que la nodulation soit retardée (ARIAS et coll., 1979 ; GLENN et coll., 1984 ; ARWAS et coll., 1986). Par ailleurs, DUNCAN, en 1981, décrit un mutant fructokinase⁻ de *R. meliloti* développant sur la luzerne des nodules inefficaces.

3.3.3. Le catabolisme des acides organiques

Les acides organiques sont considérés comme la source d'énergie principale des bactéroïdes (TUZIMURO et MEGURA, 1960 ; RONSON et PRIMROSE, 1979 ; TRINCHANT et RIGAUD, 1979 ; RONSON et coll., 1981 ; GARDIOL et coll., 1982). Ils possèdent un cycle de Krebs fonctionnel par lequel ils utilisent ces acides (KURZ et LA RUE, 1977 ; STOVALL et COLE, 1978 ; DUNCAN et FRAENKEL, 1979 ; GARDIAL et coll., 1982 ; KARR et coll., 1984 ; TAJIMA et coll., 1986). Des mutants succinate déshydrogénase⁻ (GARDIOL et coll., 1982) ou α -cétoglutarate déshydrogénase⁻ (DUNCAN et FRAENKEL, 1979) donnent des nodules inefficaces.

Certaines activités enzymatiques anapéroiques ont été observées : carboxylases et malate synthétase (LOWE et EVANS, 1962 ; JOHNSON et coll., 1966).

Les bactéroïdes de *Rhizobium*, comme les cellules libres en cultures âgées, accumulent des réserves carbonées sous la forme de poly- β -hydroxybutyrate (FORSYTH et coll., 1958) qui peuvent représenter jusqu'à 50 % de la matière sèche chez les bactéroïdes de *R. japonicum* (WONG et EVANS, 1971).

Ce PHB est utilisé dès lors qu'il manque une source de carbone. Chez le bactéroïde, il est dépolymérisé en β -hydroxybutyrate, déshydrogéné en acéto-acétate qui est dégradé par l'intermédiaire du cycle de Krebs (WONG et EVANS, 1971 ; KARR et coll., 1984). Il peut ainsi alimenter la nitrogénase en composés réducteurs et en ATP (KLUCAS et EVANS, 1958). Son métabolisme semble être lié au fonctionnement du cycle glyoxalique (WONG et EVANS, 1971) qui génère des composés en C-4 pouvant jouer le rôle de squelettes carbonés pour l'assimilation

des ions ammonium (KRETOVICH et coll., 1977) au moins au niveau de la maintenance des bactéroïdes.

Le propionate peut également être utilisé (DE HERTOIGH et coll., 1964) et rejoindre le succinyl-CoA par l'intermédiaire du méthylmalonyl-CoA obtenu par carboxylation du propionyl-CoA.

3.3.4. Le catabolisme des aldéhydes et des alcools

Les aldéhydes et les alcools que l'on retrouve dans le nodule de Soja (PETERSON et LA RUE, 1982) sont oxydés par une aldéhyde déshydrogénase non spécifique pouvant travailler sur l'acétaldéhyde, le propionaldéhyde, le butyraldéhyde, le benzaldéhyde, le semi-aldéhyde succinique et le pyruvaldéhyde.

4. - LE METABOLISME DU CARBONE CHEZ LES CELLULES LIBRES

4.1. Nutrition carbonée des cellules libres

De nombreux auteurs ont étudié l'utilisation des sources de carbone par *Rhizobium* (ZIPFEL, 1911 ; FRED, 1912 ; BALDWIN et FRED, 1927 ; GEORGI et ETTINGER, 1941 ; LANGE, 1961) mais la plupart d'entre eux emploient des milieux complexes dont la source d'azote est apportée par une quantité appréciable d'eau de levure. Leurs résultats sont imprécis et peuvent prêter à confusion si l'on sait que cette eau de levure contient en solution des mannanes dont l'hydrolyse et la dégradation peuvent interférer avec la source de carbone testée.

GRAHAM, conscient de ce problème, met au point une technique simple de visualisation de l'utilisation de substrats carbonés en boîte de Pétri contenant un milieu très pauvre en extrait de levure (GRAHAM, 1964). Ses résultats permettent d'affirmer que toutes les souches à croissance rapide sont capables d'utiliser pour leur croissance les 20 sources de carbone différentes testées, choisies parmi les oses simples, les disaccharides et les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques. Par contre, les souches à croissance lente possèdent des exigences plus marquées. Elles dégradent préférentiellement le glucose, le citrate de sodium, le xylose, le mannitol, l'arabinose, le galactose et le fructose.

Quant aux modifications du pH qui accompagnent la dégradation de ces substrats, elles ne sont pas spécifiques de la vitesse de croissance des souches mais varient d'après GRAHAM (1964) selon la nature de la source de carbone.

Ces différences dans la nutrition carbonée des souches à croissance rapide et des souches à croissance lente, d'abord énoncées par ALLEN et ALLEN en 1950, se sont vues confirmer par de nombreux auteurs (cf. 1. - Le genre **Rhizobium**) et sont résumées dans le tableau 2 proposé par STOWERS (1985).

On peut préciser :

- que les souches à croissance lente incapables de se développer à partir d'acides organiques peuvent cependant les incorporer et les oxyder (KEELE et coll., 1969 ; KEELE et coll., 1970 ; STOWERS et ELKAN, 1983 ; STOWERS et ELKAN, 1984b) ;
- que le mannitol traditionnellement utilisé pour la croissance de **Rhizobium** au laboratoire donne des réponses très variables, en particulier avec les souches à croissance lente (ELKAN et KWIK, 1968 ; CHAKRABARTI, 1981) ;
- que le glycérol est la source de carbone universellement utilisée bien que d'une façon générale les souches à croissance lente ont un taux de croissance, dans ces conditions, beaucoup plus faible que sur glucose ou galactose (ARIAS et MARTINEZ-DRETS, 1976) ;
- que la souche particulière de **R. japonicum** à croissance rapide de STOWERS et EAGLESHAM (1984) a un profil proche de l'ensemble des souches à croissance rapide mis à part qu'elle ne pousse ni sur citrate seul, ni sur dulcitol seul.

Il faut noter, par ailleurs, que depuis quelques années seulement, plusieurs équipes recherchent les possibilités de développement de **Rhizobium** à partir des composés carbonés aromatiques disponibles en quantité dans les sols. A ce propos, on sait que d'une façon générale les souches à croissance lente peuvent utiliser une plus grande diversité de ces produits que les souches à croissance rapide (PARKE et ORNSTON, 1984). **R. meliloti** est le plus limité et ne peut utiliser que l'antranilate, le protocatechuate et le quinate (PARKE et ORNSTON, 1984). **R. trifolii** et **R. leguminosarum** utilisent le benzoate, le catéchol, le para-coumarate, le férulate, le para-hydroxybenzoate, le protocatéchuate, le 3-4-5-trihydroxybenzoate, le 3-5-dihydroxybenzoate et le dihydroférulate. L'utilisation du salicylate est variable selon les souches (MUTHUKUMAR et coll., 1982 ; PARKE et ORNSTON, 1984 ; CHEN et coll., 1984). Nous n'avons que peu d'informations sur **R. trifolii** dont une souche utilise le catéchol, le para-hydroxybenzoate et le salicylate (MUTHUKUMAR et coll., 1982).

4.2. Le transport des produits carbonés chez les cellules libres

L'étude des mécanismes de transport chez **Rhizobium** est récente. Les travaux ont été effectués pour la plupart chez les cellules libres de **R. leguminosarum**. Le

Source de carbone	Souches à croissance rapide			Intermédiaire	Souches à croissance lente	
	^a Groupe A	Groupe B	Groupe C	Groupe D	Groupe E	Groupe F
Glucose	+ ^b	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Gluconate	N.D. ^c	N.D.	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+ ^d	+	+
Rhamnose	+	+ ^e	+	- ^d	N.D.	N.D.
Dulcitol	+	+ ^e	-	-	N.D.	N.D.
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	-	N.D.	N.D.
Sucrose	+	+	+	+	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	-	N.D.	N.D.
Glycérol	N.D.	N.D.	+	+	+	+
Pyruvate	+	N.D.	+	-	+	-
Citrate	+	+	-	-	-	-
Succinate	+	N.D.	+	+	+	+
Fumarate	+	N.D.	+	-	N.D.	-
Malate	+	N.D.	+	-	-	+

Tableau 2 - Utilisation de différentes sources de carbone pour la croissance de Rhizobium (d'après STOWERS, 1985).

- ^a Groupe A : *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli* (GRAHAM, 1964).
 Groupe B : *Rhizobium* spp. à croissance rapide (TRINICK, 1980).
 Groupe C : *R. japonicum* à croissance rapide (STOWERS et EAGLESHAM, 1984).
 Groupe D : *Rhizobium* à croissance intermédiaire (STOWERS et EAGLESHAM, 1983).
 Groupe E : *R. japonicum* (ELKAN et KWIK, 1968).
 Groupe F : *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1984a).

- b + : indique que la plupart des souches testées utilise la source de carbone.
 c : non déterminé.
 d - : indique que la plupart des souches testées n'utilise pas la source de carbone.
 e + : indique que plus d'une souche est capable d'utiliser la source de carbone.

transport des disaccharides, des hexoses (tels que glucose, fructose et mannose) et de certains de leurs dérivés (comme le malate et le succinate) sont les mieux étudiés.

4.2.1. Le transport des disaccharides

D'une façon générale, les souches de *Rhizobium* à croissance lente sont incapables d'utiliser pour leur croissance les disaccharides (GRAHAM, 1964 ; ELKAN et KWIK, 1968 ; MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970). Les souches à croissance rapide, par contre, se développent sur saccharose, lactose, raffinose, tréhalose.

Le transport du saccharose chez *R. leguminosarum* et chez *R. trifolii* est constitutif alors qu'il est inductible chez *R. meliloti* ainsi que chez une souche de *R. cowpea* à croissance rapide (GLENN et DILWORTH, 1981b).

Le transport du lactose est inductible chez les souches à croissance rapide (GLENN et DILWORTH, 1981b). Chez *R. meliloti*, l'absence de phospho- β -galactosidase permet de penser que ce substrat carboné n'est pas phosphorylé pendant son transport (TIMBLIN et KAHN, 1984).

Les souches à croissance rapide possèdent au moins deux systèmes de transport différents pour les disaccharides : l'un spécifique pour le lactose, l'autre pour le saccharose, le maltose et le tréhalose (GLENN et DILWORTH, 1981b).

4.2.2. Le transport des hexoses

Les transports 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 résumées dans le tableau 3 proposé par THEODOROPOULOS, 1986.

4.2.2.1. Aspect énergétique de ces systèmes

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 (tab. 3).

Les découplants énergétiques (azide de sodium, 2-4-dinitrophénol, carbonyle-cyanide métachlorophénylhydrazone), 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

Espèce et souche étudiées	Inhibition du transport par										Références		
	Paramètres cinétiques					NEM						Nature de l'accumulation	Nature du système
	Substrat transporté	Km (a) (c) Km ₁	Vmax (b) (c) Vmax ₁	Découplants énergétiques	Cyanure	Fluorure	Arseniate	active par énérgisation de la membrane	constitutif				
<i>R. leguminosarum</i> WU 235	glucose α MeG	1670 297	ND ND	++	++	++	-	-	-	-	active par énérgisation de la membrane	constitutif	Hudman et Glenn, 1980
RBL 1	glucose 2DG α MeG	2,3 54 12,2	29 5800 146	7,6 20,5 2,9	11,5 6,1 12,5	++ ++	+	+	+	+	ND ND ND	"	De Vries et coll., 1982
MNF 3841	fructose	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	"	"	Glenn et coll. 1984a
<i>R. meliloti</i> L5-30	fructose	2	ND	++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	"	Inductible	Gardiol et coll., 1980
L5-30	mannose			++	++	++	-	-	-	-	"	Constitutif	Arias et coll., 1982
<i>R. cowpea</i> 32 H ₁	glucose	ND	ND	++	+	++	+	+	+	+	ND	ND	Stowers et Elkan, 1983
NGR 234	fructose	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	"	Inductible	Saroso et coll., 1984

Tableau 3 - Les différents systèmes de transport des hexoses et leurs caractéristiques chez les cellules libres de *Rhizobium* (d'après THEODOROPOULOS, 1986).

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

gradient de protons et d'électrons. 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 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 -méthyl 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** L5-30, 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'arséniate, 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'arséniate est accumulé par le système de transport du phosphate. Ils suggèrent alors que la non-inhibition des systèmes de transport des hexoses par l'arséniate 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'arséniate.

Enfin, des études d'inhibition, effectuées en présence du NEM ou d'EDTA (éthylène diamine tétracétique acide), ont montré que le site actif des perméases possède des groupements thiols et que son fonctionnement nécessite quelquefois la présence d'ions bivalents (MULONGOY et ELKAN, 1978 ; HUDMAN et GLENN, 1980 ; DE VRIES et coll., 1982 ; STOWERS et ELKAN, 1983).

4.2.2.2. 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, dont la structure est proche de celle du fructose, est transporté par la fructose perméase chez **R. leguminosarum** MNF 3841 et chez **R. cowpea** NGR 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 -méthyl-glucose et 2-désoxy-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 analogue 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.

4.2.2.3. La régulation de ces systèmes

La nature inductible ou constitutive de chacune des perméases a été décrite (tab. 3). 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* NGR 234 et chez *R. meliloti* L5-30, est inductible, puisque des cellules cultivées sur différents autres substrats sont incapables de transporter le fructose.

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 (UCKER et SIGNER, 1978 ; LIM et SHANMUGAN, 1979 ; RONSON et PRIMROSE, 1979b ; Mc GETRICK et coll., 1985 ; RÖHM et WERNER, 1985).

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.

4.2.3. Le transport des acides organiques

La succinate et la malate perméase ont été étudiées chez les cellules libres de *R. leguminosarum*, *R. japonicum*, *R. trifolii* et *R. cowpea* (tab. 4).

Ces études ont 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. 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 sont de l'ordre du micromolaire (μM) et varient en fonction des espèces étudiées, selon un facteur de 1 à 4.

Espèce et souche étudiées	Paramètres cinétiques							Inhibition du transport par			Références
	Substrat transporté	Km (a)	Vmax (b)	Découplants énergétiques	NEM	Cyanure	Arséniate	Nature de l'accumulation	Nature du système		
<i>R. leguminosarum</i> GF 160	succinate malate	2,6	78					active par énérgisation de la membrane		Finan et coll., 1981	
	succinate malate	1,9	36	++	ND	ND	-	"	inductible	"	
	succinate	ND	ND	++	++	++	-	"	constitutif	Glenn et coll., 1980	
<i>R. cowpea</i> NGR 234	succinate	ND	ND	++	ND	ND	ND	"	inductible	Saroso et coll., 1984	
	succinate malate	10 6,1	23 7,7	++ ++	++ ++	++ ++	- -	" "	constitutif	San Francisco et Jacobson, 1985	
<i>R. japonicum</i> USDA I-110	succinate malate	7,5 6,7	22,5 12,6	++ ++	++ ++	++ ++	- -	" "	" "	San Francisco et Jacobson, 1985	
	succinate	3,8	1,6	++	ND	++	-	"	plutôt inductible	Mc Allister et Lepo, 1983	
	succinate	1,8	3,3	++	ND	++	-	"	"	"	
<i>R. trifolii</i> CF 7012	succinate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	inductible	Ronson et coll., 1981	

Tableau 4 - Les différents systèmes de transport des intermédiaires du cycle de Krebs et leurs caractéristiques chez les cellules libres de *Rhizobium* (d'après THEODOROPOULOS, 1986).

abréviations utilisées : ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ; - : pas d'inhibition ; (a) : valeurs exprimées en $\mu\text{Molaire}$; (b) : valeurs exprimées en nmoles/mn x mg de protéines.



Les systèmes mis en évidence (Dct System) sont semblables chez les souches à croissance rapide (GLENN et coll., 1980 ; FINAN et coll., 1981 ; RONSON et coll., 1981) et chez les souches à croissance lente (McALLISTER et LEPO, 1983 ; SAROSO et coll., 1984 ; SAN FRANCISCO et JACOBSON, 1985). Le système Dct est capable de transporter le succinate, le malate et le fumarate mais aussi pour **R. cowpea** NGR 234, l'acide oxalo-acétique (SAROSO et coll., 1984).

Les analogues du succinate ont des effets variables sur le transport de cet acide organique, ceci en fonction de leur degré de substitution et de la position des substituants. Le 2-2-di-méthyl-succinate réalise l'inhibition compétitive la plus efficace (GLENN et coll., 1980 ; SAROSO et coll., 1984) ainsi que l'acide itaconique chez **R. cowpea** (SAROSO et coll., 1984). Le méthyl-succinate et le 2-3-diméthyl-succinate et l'acide itaconique ont des effets limités chez **R. leguminosarum** (GLENN et coll., 1980), dus à l'affinité moindre pour la perméase. Il est intéressant de noter que l'ester de diméthyl-succinate n'a aucun effet sur le fonctionnement du transporteur, ce qui suggère que un ou deux des groupements carboxyliques du succinate doivent rester libres pour que la molécule soit transportée (GLENN et coll., 1980). Ceci rejoint les observations de GHEI et KAY (1973) concernant le transport du succinate chez **Bacillus subtilis**.

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, **R. japonicum** USDA 110 et USDA 217 et **R. cowpea** NGR 234, 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 (tel le glutamate) ; 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 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. Voies de dégradation mises en évidence

4.3.1. Voies générales de catabolisme

Depuis très longtemps déjà, les chercheurs se sont intéressés à l'utilisation des carbohydrates en tant que sources de carbone et d'énergie par les cellules de **Rhizobium** en culture ou en symbiose ; mais comparativement, très peu d'équipes ont étudié le détail des voies cataboliques empruntées, se limitant le plus souvent à la mise en évidence de certaines activités enzymatiques appartenant aux trois voies principales de dégradations des hydrates de carbone :

- la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas ou voie de la glycolyse ou voie des hexoses di-phosphate ;
- la voie d'Entner-Doudoroff ou voie du KDPG (2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate) ;
- la voie de Dickens-Horecker ou voie des pentoses ou voie des hexoses mono-phosphates.

4.3.1.1. La voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (ANNEXE)

Le fonctionnement de cette voie chez **Rhizobium** est très variable et dépendant de la souche. Quand il est observé, son taux d'activité est très bas (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; SIDDIQUI et BANERJEE, 1975 ; MULONGOY et ELKAN, 1977a ; STOWERS et ELKAN, 1983).

L'activité de la phosphofructokinase (EC 2.7.1.1.1) n'est jamais détectée chez **R. trifolii**, indiquant pour cette espèce l'impossibilité d'utiliser cette voie (RONSON et PRIMROSE, 1979a). Par contre, l'activité de cette enzyme est détectée sur des cellules de **Rhizobium** 32H1 lorsque la souche est cultivée sur glucose et non lorsqu'elle est cultivée sur fructose, mannitol, gluconate ou succinate (STOWERS et ELKAN, 1985).

La fructose diphosphate aldolase (EC 4.1.2.1.3), autre enzyme clé de la voie EMP, a été caractérisée chez **R. trifolii** (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; JORDAN, 1962 ; RONSON et PRIMROSE, 1979a), chez **R. leguminosarum** et **R. meliloti** (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; JORDAN, 1962), chez **R. japonicum** (MULONGOY et ELKAN, 1977) et chez **R. cowpea** (STOWERS et ELKAN, 1983). Il ne semble cependant pas que cette enzyme participe au fonctionnement de la voie de EMP. Elle est plutôt impliquée selon STOWERS et ELKAN (1983) dans le fonctionnement d'un cycle des hexoses permettant la synthèse de glucose-6-phosphate à partir de glycéraldéhyde 3P (HOCHSTER et KATZNELSON, 1957) et alimentant la gluconéogenèse. Ce cycle fait intervenir la triose phosphate isomérase (EC 5.3.1.1),

la fructose diphosphate aldolase (EC 4.1.2.13), l'hexose diphosphatase (EC 3.1.3.11) et la phosphoglucose isomérase (EC 5.3.1.9).

4.3.1.2. La voie d'Entner-Doudoroff (ED) (ANNEXE)

La voie d'Entner-Doudoroff existe et fonctionne à la fois chez les souches de *Rhizobium* à croissance rapide et chez les souches de *Rhizobium* à croissance lente. Elle a été caractérisée chez *R. leguminosarum* (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; GLENN et coll., 1984b), chez *R. meliloti* (KATZNELSON, 1955 ; KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; ARIAS et coll., 1979), chez *R. trifolii* (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; RONSON et PRIMROSE, 1979a), chez *R. phaseoli* (KATZNELSON, 1955), chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1969 ; KEELE et coll., 1970 ; MULONGOY et ELKAN, 1977) et chez *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1984b).

La dégradation de la plupart des hexoses se fait par la voie d'Entner-Doudoroff (KEELE et coll., 1970 ; STOWERS et ELKAN, 1984b).

4.3.1.3. La voie de Dickens-Horecker (DH) (ANNEXE)

La voie de Dickens-Horecker n'est observée que chez les souches de *Rhizobium* à croissance rapide (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972). Elle a été caractérisée chez *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979a) et chez *R. leguminosarum* (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; GLENN et coll., 1984b).

Les souches à croissance lente ne possèdent pas l'une des enzymes clé de cette voie : la 6-phosphogluconate déshydrogénase à NADP^+ (EC 1.1.1.44) participant à la réaction de décarboxylation oxydative du 6-phosphogluconate en ribulose-5-phosphate. Ceci est observé chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1969 ; MARTINEZ-DRETS et coll., 1977 ; MULONGOY et ELKAN, 1977) et chez *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1983) qui possèdent par contre une 6-phosphogluconate déshydrogénase à NAD^+ (EC 1.1.1.43). De larges controverses existent encore aujourd'hui quant à la nature de la réaction catalysée par cette dernière enzyme :

- pour MARTINEZ-DRETS et coll. (1977), la 6-PG-déshydrogénase à NAD^+ qu'ils ont partiellement purifiée catalyse la décarboxylation oxydative du 6-phosphogluconate en ribulose-5-phosphate, comme l'enzyme à NADP^+ . Ils excluent l'intervention de deux enzymes, une déshydrogénase et une décarboxylase comme chez *Leuconostoc mesenteroïdes* (YASHIMA et KITAHARA, 1968) puisque l'addition au milieu réactionnel de semi-carbazide n'a pas d'effet. Selon ces auteurs, la similitude entre la NAD^+ 6-PG-déshydrogénase de *R. japonicum* et celle de *Pseudomonas facilis* (BOWIEN et SCHLEGEL, 1972) vient enrichir le nombre d'observations établissant des relations philogéniques étroites entre ces deux genres.

4.3.1.4. Le cycle de Krebs

Dès 1957, KATZNELSON et ZAGALLO montrent que *R. leguminosarum*, *R. meliloti* et *R. trifolii* sont capables d'oxyder de nombreux intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques.

En 1960, TUZIMURA et MEGURO démontrent qu'en culture, *R. japonicum* peu oxyder l' α -céto-glutarate, le fumarate et le succinate. Ces résultats font curieusement suggérer aux auteurs que les souches possèdent le potentiel enzymatique nécessaire au déroulement du cycle de Krebs.

En 1964, GRAHAM montre que le fumarate, le malate, le pyruvate, le succinate et le citrate peuvent servir de source de carbone pour la croissance de souches de *Rhizobium* à croissance rapide et de certaines souches à croissance lente.

En 1966, JOHNSON et coll. remarquent que si *R. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* et *R. trifolii* oxydent rapidement le pyruvate de sodium et l'acétate de sodium, ils ne peuvent pas utiliser ces substrats pour leur croissance. Les auteurs pensent que la cause en est due à l'absence d'isocitrate-lyase qui ne permet pas le renouvellement normal des composés en C_4 accepteurs des deux substrats pour leur intégration dans le cycle de Krebs.

On sait aujourd'hui que le cycle de KREBS est fonctionnel pour l'ensemble des souches de *Rhizobium* à croissance lente ou à croissance rapide. Il a été décrit chez *R. meliloti* (HORNEZ, 1976 ; DUNCAN et FRAENKEL, 1979), chez *R. leguminosarum* (KURZ et LA RUE, 1977), chez *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979a), chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1969 ; KEELE et coll., 1970 ; MULONGOY et ELKAN, 1977a) et chez *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1983 ; STOWERS et ELKAN, 1984a).

Son fonctionnement est démontré soit par la mise en évidence d'activités enzymatiques spécifiques (DUNCAN et FRAENKEL, 1979 ; GARDIOL et coll., 1982), soit par des études de respirométrie : l'utilisation de pyruvate spécifiquement marqué au ^{14}C sur ses différents carbones permet de déterminer l'origine du dioxyde de carbone libéré durant son oxydation, $C1 > C2 > C3$. La libération sous forme de dioxyde de carbone tout d'abord du carbone C1 (carboxyl-carbone) suivi du C2 (carbonyl-carbone) et enfin du C3 (méthyl-carbone) indique que le pyruvate est totalement oxydé par l'intermédiaire du cycle de Krebs (KEELE et coll., 1969 ; KEELE et coll., 1970 ; MULONGOY et ELKAN, 1977a ; STOWERS et ELKAN, 1983 ; STOWERS et ELKAN, 1984a).

En résumé, nous pouvons proposer les schémas métaboliques de STOWERS (1985) décrivant le catabolisme du carbone pour les souches de *Rhizobium* à croissance rapide (fig. 2) et pour les souches à croissance lente (fig. 3).

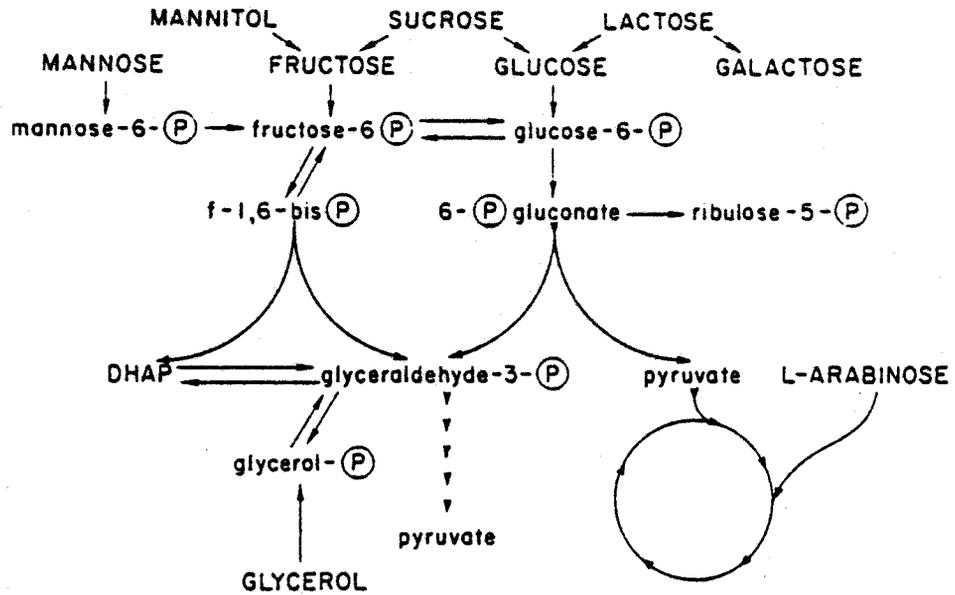


Figure 2 - Voies de dégradation du carbone chez les souches de *Rhizobium* à croissance rapide (STOWERS, 1985).

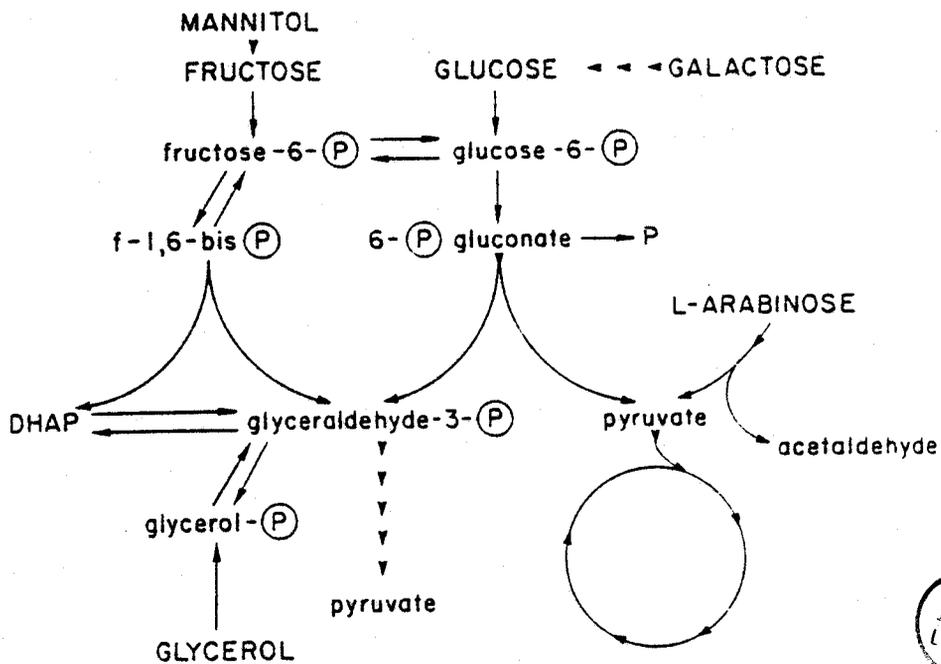


Figure 3 - Voies de dégradation du carbone chez les souches de *Rhizobium* à croissance lente (STOWERS, 1985).

4.3.2. Catabolisme des disaccharides

4.3.2.1. Catabolisme du saccharose

Seules les souches de *Rhizobium* à croissance rapide peuvent dégrader le saccharose (MARTINEZ-DRETS et coll., 1974 ; GLENN et DILWORTH, 1981b).

La présence de l'invertase (EC 3.2.1.2.6) n'est détectée que dans les extraits cellulaires de *R. meliloti*, *R. leguminosarum* et *R. trifolii* après culture sur saccharose, lactose ou maltose (MARTINEZ-DRETS et coll., 1974). Son activité est largement supérieure lorsque les cellules sont cultivées sur saccharose plutôt que sur les autres sources de carbone, l'enzyme est inductible (MARTINEZ-DRETS et coll., 1974 ; GLENN et DILWORTH, 1981b).

Il a été décrit une invertase extracellulaire chez *R. japonicum* (SINGH et coll., 1980).

4.3.2.2. Catabolisme du lactose

Seules les souches de *Rhizobium* à croissance rapide peuvent dégrader le lactose (GLENN et DILWORTH, 1981b).

La β -galactosidase (EC 3.2.1.23) a été détectée après culture sur lactose dans les extraits cellulaires de *R. meliloti* (NIEL et coll., 1977 ; UCKER et SIGNER, 1978 ; GLENN et DILWORTH, 1981b), de *R. leguminosarum* et de *R. trifolii* (GLENN et DILWORTH, 1981b).

La régulation de l'activité et de la synthèse de la β -galactosidase est variable selon les souches. L'enzyme est inductible chez *R. meliloti* WU 60 (GLENN et DILWORTH, 1981b) et partiellement inductible chez *R. meliloti* 2011 (NIEL et coll., 1977). Elle est constitutive chez *R. leguminosarum* WU 163, WU 235, WU 3841 et chez *R. trifolii* WU 290 (GLENN et DILWORTH, 1981b)

C'est pour *R. meliloti* 2011 que l'on connaît le mieux l'activité β -galactosidase. En effet :

- NIEL et coll. (1977) ont mis en évidence chez cette souche deux enzymes A et B à propriétés très différentes (Km mesurés sur le paranitrophényl- β -D-galactopyranoside, inactivation thermique) et présentant une activité β -galactosidase du même ordre de grandeur en absence d'inducteur. Par contre, en présence de lactose, l'activité de l'enzyme A devient quelquefois plus forte que celle de l'enzyme B. Physiologiquement, cependant, l'enzyme B ne permet pas ou presque la croissance sur lactose du mutant 2011 L⁻i ayant perdu la capacité de synthétiser l'enzyme A. En fait cette enzyme B, dont la synthèse est inductible par le cellobiose, est capable d'hydrolyser le paranitrophényl- β -D-glucopyranoside et le

paranitrophényl- β -D-galactopyranoside avec des Km respectifs de 135 μ M et 6,4 mM. Ceci prouve que l'enzyme B est une β -glucosidase (EC 3.2.1.21) à activité β -galactosidase (NIEL et coll., 1980) ;

- UCKER et SIGNER (1978) montrent que l'activité de la β -galactosidase est dix fois plus importante lorsque *R. meliloti* 2011 est cultivé en présence de lactose plutôt qu'en présence de mannose ou de succinate. De plus, l'addition de succinate qui est une excellente source de carbone pour la croissance de *R. meliloti*, à des cellules poussant sur lactose, est suivie rapidement de la réduction de l'activité β -galactosidase des cellules en croissance.

Les auteurs observent une croissance diauxique de *R. meliloti* 2011 sur un milieu synthétique contenant 0,1 % de succinate et 0,1 % de lactose. Ce phénomène n'est pas levé par l'addition d'AMPc au milieu. Les auteurs parlent de "Catabolic Repression like Phenomenon" chez *R. meliloti*. On peut aussi penser que dans ces conditions expérimentales, l'AMPc ne pénètre pas dans les cellules bactériennes.

4.3.3. Catabolisme des hexoses et de leurs dérivés

4.3.3.1. Catabolisme du glucose

Chez la plupart des souches de *Rhizobium*, le glucose est catabolisé uniquement par la voie d'Entner-Doudoroff. Ceci est démontré soit par la recherche d'activités enzymatiques spécifiques (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; KEELE et coll., 1969 ; GLENN et coll., 1984b), soit par radiorespirométrie (KEELE et coll., 1969 ; STOWERS et EAGLESHAM, 1984).

La production de pyruvate à partir de 6-phosphogluconate ainsi que la présence de la 6-phosphogluconate déshydratase (EC 4.2.1.12) et de la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase (EC 4.1.2.14) a été démontrée chez *R. leguminosarum* (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972 ; GLENN et coll., 1984b), chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1969) et chez *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1983).

L'utilisation en respirométrie du glucose marqué au 14 C spécifiquement sur certains carbones permet de suivre la cinétique de production de CO_2 en fonction de l'origine des radicaux carbonés oxydés :

- pour *R. japonicum* ATCC 10324 (KEELE et coll., 1969), $\text{C1} = \text{C4} > \text{C2} > \text{C3} = \text{C6}$;
- pour *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1983), $\text{C1} > \text{C3,4} > \text{C6} > \text{C2}$.

Théoriquement, si la voie d'Entner-Doudoroff était la seule utilisée pour la dégradation du glucose, le CO_2 issu de C1 devrait être égal à celui issu de C4 et la distribution devrait être : $\text{C1} > \text{C3,4} > \text{C2} > \text{C6}$. Le fait que la plus grande partie du CO_2 provient des carbones 1,3 et 4 indique, en absence de la voie des pentoses, l'utilisation de la voie d'Entner-Doudoroff pour *R. japonicum* et *R. cowpea*. Chez ce

dernier, la libération du CO_2 en provenance du C6 se fait avant celle du CO_2 du C2. Ceci s'explique par le fonctionnement simultané du cycle des hexoses qui permet par les activités réverses de quelques enzymes de la glycolyse de passer de la glycéraldéhyde-3-phosphate au glucose-6-phosphate qui peut réalimenter la voie d'Entner-Doudoroff. Si le glucose n'était oxydé que par ce cycle, l'évolution du taux de $^{14}\text{CO}_2$ serait $\text{C1} > \text{C6} > \text{C2} > \text{C3,4}$ (STOWERS et ELKAN, 1983).

De nombreux auteurs ont décrit la participation au moins partielle de la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas à la dégradation du glucose (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; SIDDIQUI et BANERJEE, 1975 ; MULONGOY et ELKAN, 1977a ; STOWERS et ELKAN, 1983) et d'autres rapportent des informations contraires soit pour les souches à croissance rapide (RONSON et PRIMROSE, 1979a), soit pour les souches à croissance lente qui ne possèdent pas la fructose 1-6-diphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972).

MULONGOY et ELKAN (1977a) pensent que les voies d'EMP et de ED opèrent simultanément chez *R. japonicum* et relient le fonctionnement de la glycolyse au rendement de la fixation de l'azote des souches en symbiose. En effet, c'est pour la souche de *R. japonicum* I110, la plus efficiente, que la voie de EMP domine alors que pour la souche LI-110, moins efficiente, la voie d'ED est la plus importante.

4.3.3.2. Catabolisme du fructose

Le métabolisme du fructose chez *Rhizobium* est encore aujourd'hui peu connu. Une fructokinase cytoplasmique (EC 2.7.1.4) a été mise en évidence chez *R. meliloti* (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970), chez *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979) et chez *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984b).

En 1980, GARDIOL et coll. décrivent l'obtention chez *R. meliloti* L5-30 de mutants UR3 (phosphoglucose isomérase moins et fructokinase moins), UR4 (fructokinase moins), UR5 (révertant). Le mutant UR4 ne pousse pas ni sur fructose, ni sur mannitol, ni sur sorbitol mais se développe en présence de glucose ou de mannose. La fructokinase est donc spécifique du fructose ; son produit, le fructose-6-phosphate est ensuite dégradé par la voie d'Entner-Doudoroff (ARIAS et coll., 1979).

De plus, une relation entre l'activité de la fructokinase et les polyols déshydrogénases semble exister. En effet, le mutant UR4 accumule le fructose et dans ce cas les déshydrogénases apparaissent alors que chez la souche sauvage, elles ne sont induites que par le mannitol et le sorbitol.

En 1984, GLENN et coll. (1984b) utilisent le Tn5 sur *R. leguminosarum* MNF 3841 et obtiennent des mutants fructokinase négatif qui ne poussent ni sur fructose, ni sur sorbitol, ni sur mannitol, se développent lentement sur saccharose et normalement sur les autres sources de carbone. Les révertants qui ont retrouvé la capacité d'utiliser le fructose ont une fructokinase altérée, thermolabile, que l'on peut partiellement protéger par le substrat. La dégradation du fructose chez ces révertants, via le sorbitol et le glucose ou via le sorbitol-6-phosphate et le glucose-6-phosphate est exclue du fait des trop faibles activités enzymatiques correspondantes mesurées. Bien qu'il y ait une sorbitol déshydrogénase NAD⁺ dépendante, induite dans les cellules cultivées en présence de fructose, l'activité de l'aldose-réductase NADP⁺ dépendante est faible avec un équilibre marqué en faveur de la formation de sorbitol (VELLE, 1975). De plus, *R. leguminosarum* MNF 3841, comme *R. meliloti* (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970), ne possèdent pas la sorbitol-6-phosphate déshydrogénase.

Ces observations prouvent que chez ces révertants capables à nouveau de se développer en présence de fructose, celui-ci est bien métabolisé par la fructokinase en fructose-6-phosphate.

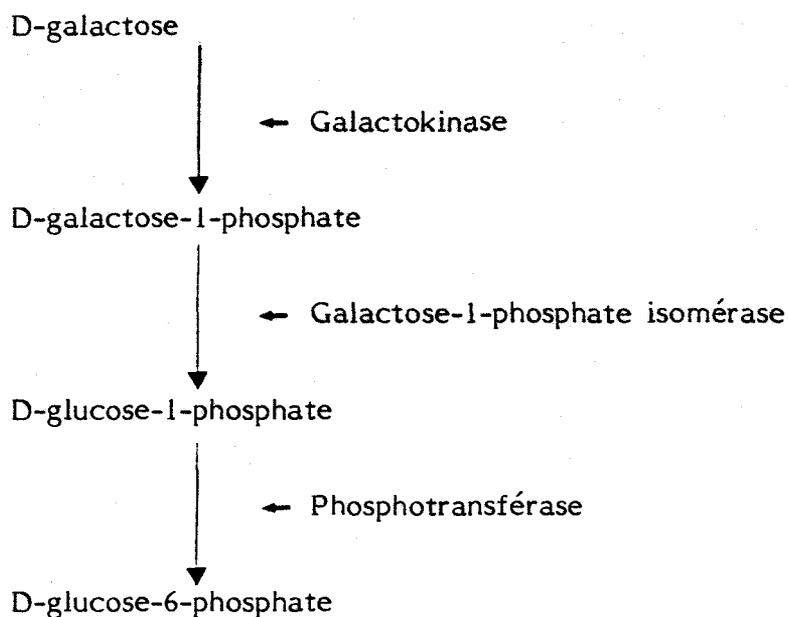
4.3.3.3. Catabolisme du mannose

Le catabolisme du mannose n'a été étudié que chez *R. meliloti* par ARIAS et coll., 1982. Ces auteurs ont utilisé la nitrosoguanidine pour obtenir des mutants métaboliques modifiés sur la voie d'utilisation du mannose. Ils ont pu ainsi montrer que ce substrat pénètre par système de transport actif avant d'être phosphorylé par une mannokinase (EC 2.7.1.7) en mannose-6-phosphate, isomérisé ensuite par une mannose-6-phosphate isomérase (EC 5.3.1.8) en fructose-6-phosphate. Celui-ci est alors dégradé par la voie d'Entner-Doudoroff.

4.3.3.4. Catabolisme du galactose

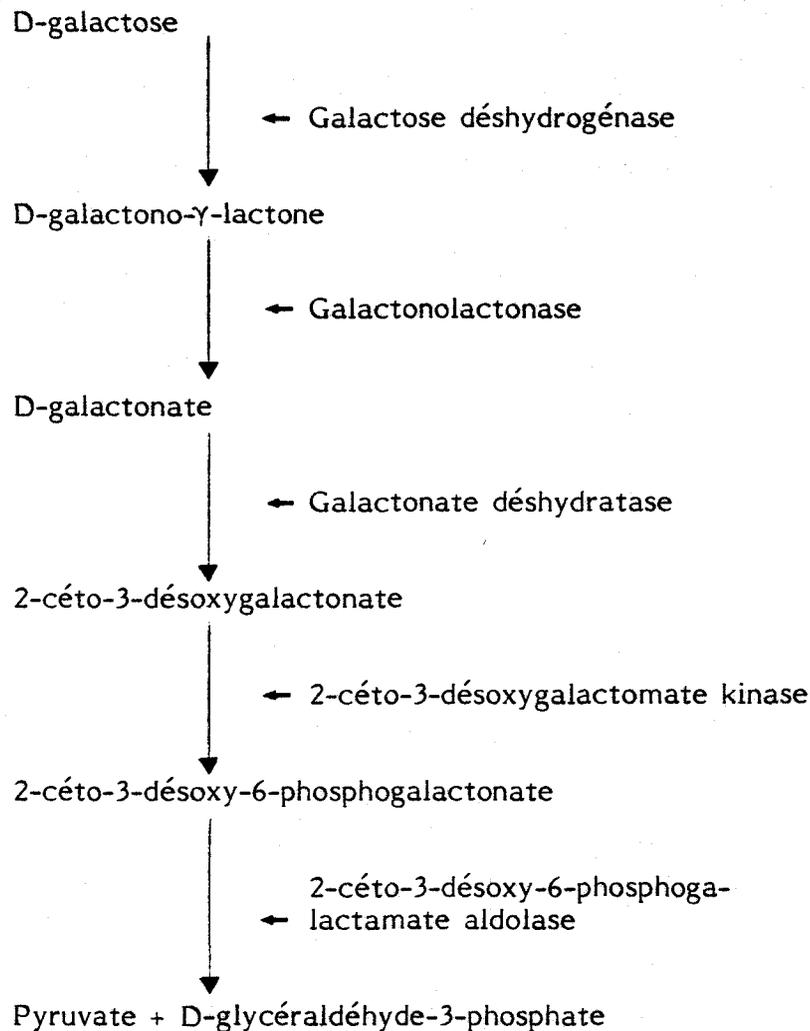
Le catabolisme du galactose n'a été étudié que chez *R. meliloti* très récemment (ARIAS et CERVENANSKY, 1986).

On a décrit la galactose déshydrogénase NADP⁺ dépendante chez *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979a) et la galactose déshydrogénase NAD⁺ NADP⁺ dépendante chez *R. meliloti* (CERVENANSKY et ARIAS, 1984). Le fonctionnement de la voie d'Entner-Doudoroff et le comportement du mutant de *R. meliloti*, glucose-6-phosphate déshydrogénase négative, décrits dans ces travaux montrent que la voie de Leloir (MAXWELL et coll., 1962) n'est pas utilisée pour le catabolisme du galactose chez *Rhizobium*. Cette voie, décrite pour les Entérobactéries permet de passer du galactose au glucose-6-phosphate par les intermédiaires suivants :



Voie de Leloir

ARIAS et CERVENANSKY (1986) ont mis en évidence des activités enzymatiques spécifiques du métabolisme du galactose : galactose déshydrogénase, lactonase, galactonate déshydratase (EC 4.2.1.6), 2-céto-3-désoxy-6-phosphogalactonate--aldolase et galactokinase (EC 2.7.1.6). La mutagénèse par la nitrosoguanidine leur a permis d'obtenir un mutant incapable de se développer sur galactose, galactonate ou lactose et poussant normalement sur glucose, fructose, mannose et L-arabinose. Ce mutant est 2-céto-3-désoxy-6-phosphogalactonate moins. De ces différentes observations, les auteurs concluent à l'existence de la voie de De Ley-Doudoroff (DE LEY et DOUDOROFF, 1957) chez *R. meliloti* et du passage par cette voie pour la dégradation du galactose comme chez *Pseudomonas* :



Voie de De Ley et Doudoroff

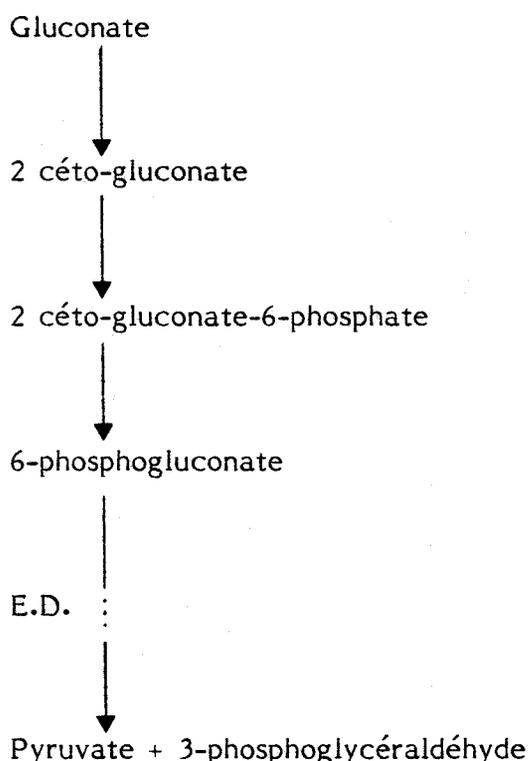
4.3.3.5. Catabolisme du gluconate

Le catabolisme du gluconate n'a été étudié que chez les souches de *Rhizobium* à croissance lente : *R. japonicum* (KEELE et coll., 1970) et *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1984b). Chez ces souches, le gluconate est transporté et phosphorylé par une gluconate kinase en 6-phosphogluconate. Celui-ci est métabolisé en glycéraldéhyde-3-phosphate et en pyruvate par la voie d'Entner-Doudoroff. Il semble que c'est la seule voie de dégradation du gluconate chez les microorganismes (WANG et coll., 1959 ; RAJ, 1967 ; EISENBERG et DOBROGOSZ, 1967).

Cependant, STOWERS et ELKAN (1984b) montrent qu'une partie du gluconate utilisé par *R. cowpea* est dégradé par la voie du céto-gluconate (KG pathway) comme chez *Acetobacter melagenum* (KATZNELSON et coll., 1953), chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1970), chez *Alcaligenes entrophus* (NANDADASA et coll., 1974) et chez *Pseudomonas aeruginosa* (WHITING et coll., 1976).

La voie du céto-gluconate est une voie métabolique non phosphorylée conduisant à la production d'acide α -céto-glutarique (KATZNELSON et coll., 1953). Son rôle est de servir une séquence anaplérotique fournissant des composés en C4 du cycle des acides tricarboxyliques qui peuvent manquer lors de la croissance des souches. La possession de cette voie du céto-gluconate chez *R. cowpea* lui est spécialement avantageuse puisqu'il peut oxyder le pyruvate et l'acétate mais ne peut les utiliser comme seule source de carbone pour sa croissance (STOWERS et ELKAN, 1984b).

Bien que la voie du céto-gluconate puisse avoir une fonction biosynthétique en fournissant des intermédiaires importants, elle peut certainement fournir de l'énergie par une voie phosphorylée comme chez *Pseudomonas aeruginosa* (WHITING et coll., 1976) ou *Alcaligenes eutrophus* (NANDADASA et coll., 1974). Dans ce cas, on observe l'évolution suivante :



Cette voie du céto-gluconate peut aussi, par des activités réverses, fournir des composés en C6 (STOWERS et ELKAN, 1984b).

STOWERS et ELKAN (1984b) mettent en évidence cette voie chez *R. cowpea* en s'appuyant sur des mesures radiorespirométriques et sur la détection d'activités enzymatiques spécifiques telle que la gluconate déshydrogénase cytoplasmique. Ils constatent l'apparition dans les milieux de culture de *R. cowpea* contenant du gluconate, de 2 céto-gluconate après trois jours d'incubation et de 2-5-dicétogluconate après six ou seize jours selon les souches. Le glucose, le fructose ou le mannitol ne

donnent jamais lieu à ces accumulations. La voie du céto-gluconate chez les souches de *Rhizobium* à croissance lente semble spécifique de l'utilisation du gluconate.

4.3.3.6. Catabolisme des polyols

Parmi les polyols, le mannitol est le plus couramment employé comme source de carbone dans les milieux de culture. Chez *R. meliloti* (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970), chez *R. japonicum* (KUYKENDALL et ELKAN, 1977) et chez *R. trifolii* (PRIMROSE et RONSON, 1980), le mannitol est réduit en fructose par une mannitol déshydrogénase (EC 1.1.1.67).

Chez *R. meliloti*, deux polyols déshydrogénases NAD^+ dépendantes sont induites par culture sur D-mannitol, D-arabitol ou D-sorbitol. L'une réduit le mannitol et le sorbitol en fructose et l'autre réduit l'arabitol en xylulose (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970).

Chez *R. trifolii*, on distingue cinq polyols déshydrogénases NAD^+ dépendantes :

- une inositol déshydrogénase pour l'inositol,
- une ribitol déshydrogénase pour le ribitol,
- une D-arabitol déshydrogénase pour le D-arabitol, le D-sorbitol et le D-mannitol,
- une xylitol déshydrogénase pour le xylitol et le D-sorbitol,
- une dulcitol déshydrogénase pour le dulcitol, le ribitol, le xylitol et le sorbitol.

Tous les polyols, exceptés l'inositol et le xylitol, induisent la synthèse de plusieurs déshydrogénases. L'exception remarquée pour l'inositol peut s'expliquer par sa structure cyclique très différente de celle des autres polyols (PRIMROSE et RONSON, 1980). Des inductions croisées analogues ont été décrites chez *R. meliloti* (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970), chez *Cellobacterium polyoltrophicus* (SCOLNICK et LIN, 1962) et chez *Azotobacter agilis* (MARCUS et MARR, 1961).

Chez *R. japonicum*, KUYKENDALL et ELKAN (1977) caractérisent une mannitol déshydrogénase NAD^+ dépendante, inductible, réduisant à la fois le D-mannitol et le D-arabitol. Ces auteurs relient la possibilité d'utiliser le mannitol et la capacité de réduire l'azote en ammonium lors de la symbiose : les mutants mannitol déshydrogénase négative sont beaucoup plus efficaces. KUYKENDALL et ELKAN (1977) proposent l'explication suivante : la 6-phosphogluconate NAD^+ dépendante est inhibée allostériquement par le D-mannitol (MULONGOY et ELKAN, non publié). La présence de D-mannitol déshydrogénase intracellulaire se traduit par une diminution de la capacité d'utiliser le glucose et par conséquent de diminuer en symbiose les possibilités de fixation de l'azote. Cette relation entre utilisation du glucose et fixation de l'azote a été décrite par MULONGOY et ELKAN (1977a).

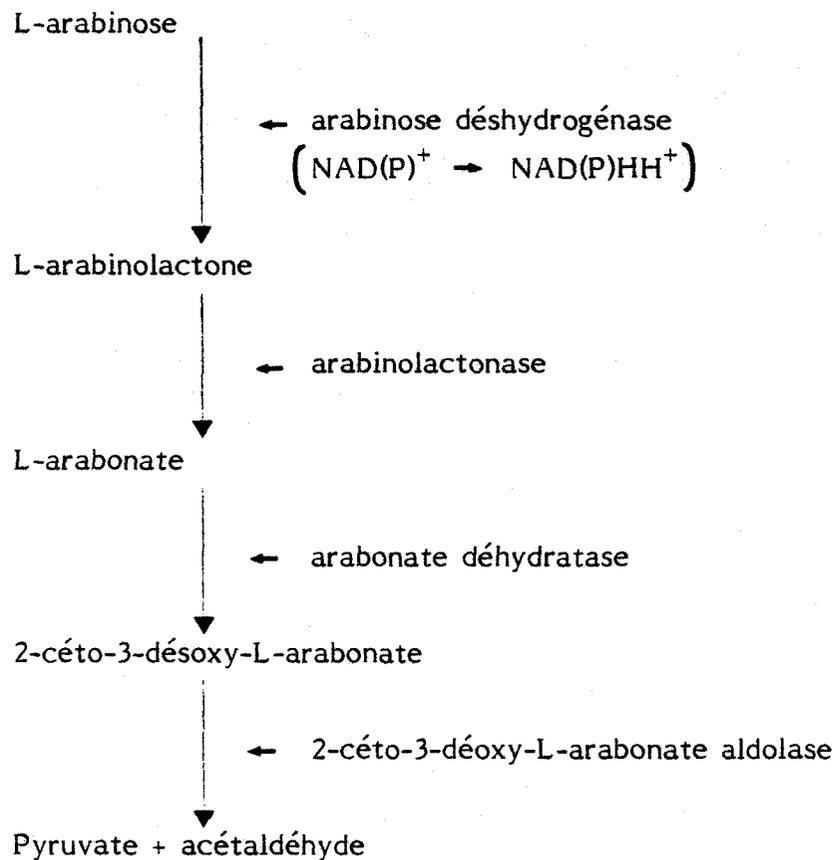
La régulation du métabolisme des polyols peut être contrôlée par le glucose. KUYKENDALL et ELKAN (1977) observent chez *R. japonicum* une nette diminution de l'activité mannitol déshydrogénase chez des cellules cultivées sur glucose plus mannitol. RONSON et PRIMROSE (1979b) montrent chez *R. trifolii* que le glucose est responsable de la répression catabolique et de l'inhibition catabolique des enzymes impliquées dans l'utilisation des polyols. Ces mécanismes sont semblables à ceux qui fonctionnent chez *Escherichia coli* (McGINNIS et PAIGEN, 1969 ; McGINNIS et PAIGEN, 1973 ; AMARAL et KORNBERG, 1975) : la présence d'une "bonne" source de carbone (glucose ou inositol par exemple pour *R. trifolii*) réprime très fortement la formation d'enzymes inductibles nécessaires à la dégradation de sources de carbone moins efficaces (ribitol ou dulcitol) mais ne répriment pas la formation d'enzymes inductibles nécessaires à la dégradation d'autres "bonnes" sources de carbone.

4.3.4. Catabolisme des pentoses

Alors que le D-ribose ou le D-xylose est métabolisé par la voie classique non oxydative des pentoses phosphates (D.H.), aboutissant à la formation de fructose-6-phosphate, le L-arabinose est dégradé selon une autre voie permettant la croissance du mutant phosphoglucose isomérase négative de *R. meliloti* (ARIAS et coll., 1979). Une attention particulière est donc apportée au métabolisme du L-arabinose d'autant plus qu'il est utilisé différemment par les souches de *Rhizobium* à croissance rapide et les souches à croissance lente (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972).

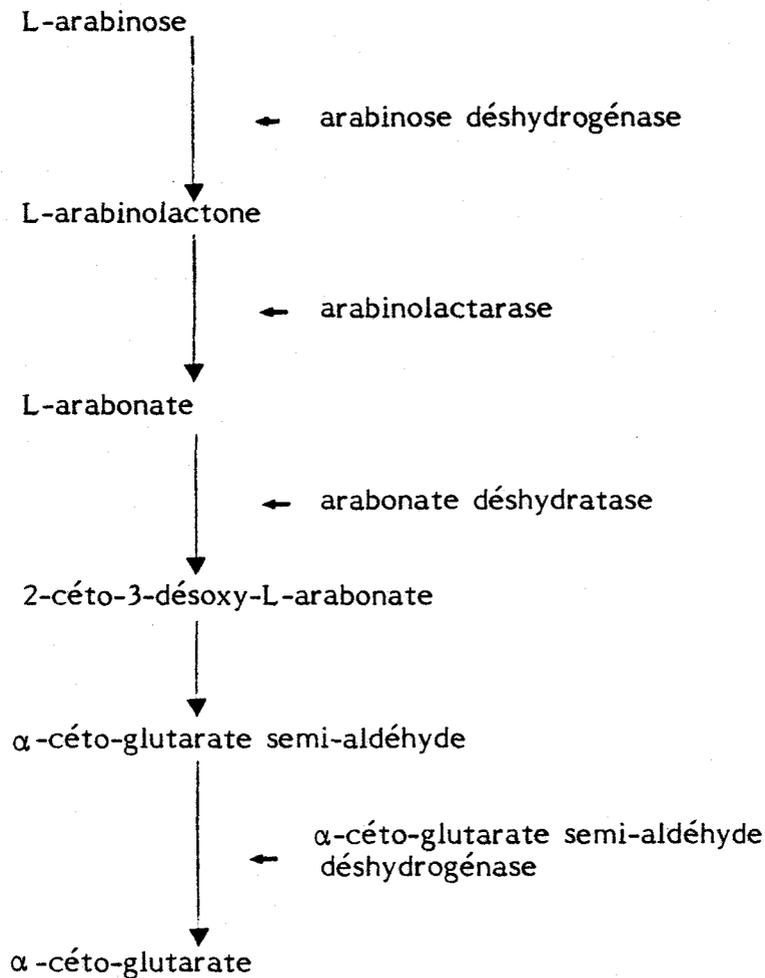
Le L-arabinose est généralement une bonne source de carbone pour la croissance des *Rhizobia* (GRAHAM, 1964). Il a même été utilisé pour exprimer la fixation d'azote par des cellules libres en culture sous conditions particulières (PAGAN et coll., 1975 ; BERGERSEN et coll., 1976).

Chez *R. japonicum*, PEDROSA et ZANCAN (1974) mettent en évidence sur des extraits cellulaires des activités enzymatiques spécifiques en identifiant et en dosant les produits des réactions. Selon ces auteurs, la séquence de dégradation du L-arabinose est la suivante :



Dégradation du L-arabinose par les souches de Rhizobium à croissance lente

Chez *R. meliloti*, DUNCAN et FRAENKEL (1979) ne mettent jamais en évidence la 2-céto-3-déoxy-L-arabonate aldolase sur des extraits de cellules cultivées sur glucose ou L-arabinose alors que l'activité enzymatique est dans tous les cas présente chez *R. japonicum*. Par contre, ces auteurs mesurent une activité très importante chez *R. meliloti* de l' α -céto-glutarate semi-aldéhyde déshydrogénase et proposent pour cette souche la séquence de dégradation suivante :



Dégradation du L-arabinose par les souches de Rhizobium à croissance rapide

Cette séquence est confirmée par l'isolement et l'étude d'un mutant α -céto-glutarate déshydrogénase négative.

DUNCAN et FRAENKEL (1979) ont montré également que les souches de **R. leguminosarum**, **R. trifolii** et **R. phaseoli** possèdent l' α -céto-glutarate semi-aldéhyde déshydrogénase et ne possèdent pas la 2-céto-3-désoxy-L-arabonate aldolase alors que c'est exactement l'inverse pour **R. japonicum** et **R. cowpea**.

L'étude du métabolisme de l'arabinose est donc importante dans la différenciation des souches de **Rhizobium** à croissance rapide et des souches à croissance lente.

4.3.5. Catabolisme des acides dicarboxyliques

Le fumarate, le malate et le succinate sont d'excellentes sources de carbone pour le développement des souches de *Rhizobium* à croissance rapide mais sont peu ou pas utilisés par les souches de *Rhizobium* à croissance lente (GRAHAM, 1964).

Lorsqu'ils sont utilisés, ces acides sont métabolisés par le cycle de Krebs (KEELE et coll., 1969 ; KEELE et coll., 1970 ; MULONGOY et ELKAN, 1977a ; GARDIOL et coll., 1982 ; STOWERS et ELKAN, 1983 ; STOWERS et ELKAN, 1984b). L'étude de l'oxydation de ces acides a été menée soit sur des cellules en culture libre (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; TUZIMURA et MEGURO, 1960), soit sur des cellules isolées de nodules (TUZIMURA et MEGURO, 1960 ; STOVAL et COLE, 1978 ; TRINCHANT et RIGAUD, 1979 ; TRINCHANT et coll., 1981).

L'utilisation du succinate est liée à la capacité de réduction de l'azote chez les cellules libres (KURZ et LA RUE, 1975 ; PANKHURST, 1981) et chez les bactéroïdes (PETERSON et LA RUE, 1981). L'isolement de mutants métaboliques perturbés sur la dégradation du succinate induit en symbiose des nodules inefficients alors que les révertants retrouvent les possibilités de fixation d'azote des souches-mères. C'est le cas pour :

- un mutant de *R. trifolii* déficient en systèmes de transport des acides dicarboxyliques (RONSON et coll., 1981) ;
- des mutants de *R. leguminosarum* incapables de transporter et d'oxyder le succinate (GLENN et BREWIN, 1981) ;
- un mutant de *R. meliloti* succinate déshydrogénase (EC 1.3.9.9.1) négative (GARDIOL et coll., 1982). Ce mutant, incapable de se développer sur succinate, glutamate, acétate, pyruvate ou arabinose, se développe sur glucose, fructose, saccharose et d'autres hydrates de carbone. En symbiose, il induit tardivement la formation de nodules qui restent blancs et inefficients.

4.3.6. Catabolisme des composés en C3 et en C2

4.3.6.1. Catabolisme du glycérol

Après incorporation, le glycérol est phosphorylé par une glycérol-kinase (EC 2.7.1.30) en glycérol-phosphate. Celui-ci est déshydrogéné par une glycérol-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.8) en glycéraldéhyde-3-phosphate qui est métabolisé par la voie classique en pyruvate (ARIAS et MARTINEZ-DRETS, 1976). Les deux enzymes de la voie du glycérol sont induites par ce substrat.

4.3.6.2. Catabolisme du pyruvate

Le pyruvate est oxydé par l'intermédiaire du cycle de Krebs chez *R. meliloti* (HORNEZ, 1976 ; DUNCAN et FRAENKEL, 1979 ; GARDIOL et coll., 1982), chez *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979a), chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1969 ; KEELE et coll., 1970 ; MULONGOY et ELKAN, 1977a) et chez *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1983 ; STOWERS et ELKAN, 1984b).

Il peut aussi être carboxylé pour former de l'acide oxalo-acétique (DUNCAN et FRAENKEL, 1979) ou être réduit en lactate (TRINCHANT et RIGAUD, 1974).

4.3.6.3. Catabolisme du propionate

Le propionate, par l'intermédiaire du méthyl-malonyl-coenzyme A, est transformé en succinate qui est métabolisé par le cycle de Krebs (DE HERTOUGH et MAYEUX, 1964).

4.3.6.4. Catabolisme de l'acétate

L'acétate est dégradé par le cycle de Krebs chez *R. meliloti* (DUNCAN et FRAENKEL, 1979) et chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1969).

Le cycle du glyoxal est utilisé lors de la croissance sur acétate mais pas pour le métabolisme du pyruvate (JOHNSON et coll., 1966) ou du L-arabinose chez *R. meliloti* (DUNCAN et FRAENKEL, 1979). L'isocitrate lyase (EC 4.1.3.1.) et la malate synthétase (EC 4.1.3.2) sont détectées sur les cellules cultivées sur oléate. Mais l'isocitrate lyase n'est pas détectée sur les cellules cultivées sur D-mannitol, sur succinate, sur glycérol ou sur L-glutamate (JOHNSON et coll., 1966).

4.3.6.5. Catabolisme de l'acétaldéhyde

Chez *R. japonicum*, l'acétaldéhyde est oxydé par une aldéhyde déshydrogénase NAD⁺ dépendante (EC 1.2.1.3) non spécifique et travaillant aussi avec le propionaldéhyde, le butyraldéhyde, le benzaldéhyde et la semi-aldéhyde succinique (PETERSON et LA RUE, 1982).

4.3.7. Catabolisme des composés aromatiques

Nous avons vu que *Rhizobium* pouvait utiliser pour sa croissance toute une série de composés aromatiques divers. Chez *R. leguminosarum* et chez *R. trifolii*, les enzymes participant à la dégradation de ces composés sont inductibles (CHEN et coll., 1984).

Le protocatechuate est oxydé par la voie du β -céto-adipate (HUSSIEN et coll., 1974 ; MUTHUKUMAR et coll., 1982 ; CHEN et coll., 1984 ; PARKE et ORNSTON, 1984) comme le benzoate, le catéchol, le parahydroxybenzoate, le shikimate et le quinate (MUTHUKUMAR, 1982).

5. - CONCLUSION

Le genre **Rhizobium** regroupe donc un ensemble de bactéries du sol capables d'infecter spécifiquement les racines des Légumineuses. Ces souches établissent des relations symbiotiques qui s'expriment par la réduction de l'azote atmosphérique et son intégration dans des composés organiques alimentant le métabolisme général du végétal et de la bactérie.

Si le fonctionnement et la régulation du complexe nitrogénasique permettant la production d'ions ammonium sont maintenant bien élucidés, par contre l'origine de l'énergie consommée dans ces conditions fait l'objet de nombreuses controverses. En effet, les bactéroïdes concentrent encore correctement les acides dicarboxyliques mais ils ont perdu la capacité d'accumuler les glucides. On sait pourtant que la réduction de l'azote par voie symbiotique est directement liée à l'activité photosynthétique de la plante. En effet, la défoliation, la décapitation ou la simple mise à l'obscurité de plants de Soja conduit à l'arrêt progressif de l'activité de la nitrogénase (HARDY et coll., 1968 ; WONG et EVANS, 1971 ; GERSON et coll., 1978). Pour de nombreuses espèces végétales, les produits de la photosynthèse sont véhiculés dans la plante par le phloème sous la forme de saccharose (ZIMMERMAN, 1960). Il en est de même pour les Légumineuses alimentant leurs nodules (BURLEY, 1961 ; PATE, 1962 et 1975). On y retrouve comme composés carbonés majeurs le saccharose, le glucose et le fructose (LAWRIE et WHEELER, 1975 ; ANTONIW et SPRENT, 1978 ; DAVIS et NORDIN, 1983) mais aussi des acides organiques en quantité importante mais moindre, tels que le malate et le succinate (STUMPF et BURRIS, 1979 ; DE VRIES et coll., 1980 ; DAVIS et NORDIN, 1983 ; REIBACH et STREETER, 1983).

On remarque qu'encore peu de connaissances précises sont acquises sur les possibilités métaboliques des bactéroïdes. Ceci est certainement dû, au vu des modifications pariétales importantes les fragilisant, à la difficulté de les isoler tout en maintenant leur intégrité. De plus, leur fonctionnement *in vivo* a lieu dans des conditions de pression partielle en oxygène, contrôlée par la leghémoglobine. Il est

donc nécessaire de respecter ces conditions durant toutes les phases d'isolement et d'expérimentations si l'on veut maintenir la totalité de leurs capacités enzymatiques.

Chez les cellules libres de *Rhizobium*, par contre, de nombreux travaux ont été effectués sur l'utilisation des glucides et de leurs dérivés ainsi que sur celle des acides organiques. Toutefois, de nombreuses questions restent encore posées : par exemple le rôle de la 6-phospho-gluconate à NAD^+ dont les produits de la réaction sont encore controversés, ou encore le rôle de la glycolyse qui est très discret chez les cellules libres mais qui est corrélé à l'augmentation de l'activité fixatrice d'azote chez *R. japonicum* (MULONGOY et ELKAN, 1977a).

L'utilisation de mutants a montré que la capacité de transporter les acides dicarboxyliques en C_4 est déterminante pour le fonctionnement de la réduction de l'azote par les bactéroïdes (RONSON et coll., 1981 ; FINAN et coll., 1983 ; ARWAS et coll., 1985 ; ARWAS et coll., 1986) mais leur croissance et leur maturation en sont indépendantes et peuvent se faire aux dépens d'autres composés.

A peu d'exceptions près (DUNCAN, 1981), les mutants déficients, dans l'utilisation des glucides, donnent des nodules efficaces (RONSON et PRIMROSE, 1979b ; GLENN et coll., 1984 ; DILWORTH et coll., 1986). Le couplage de l'approche génétique et de la biochimie métabolique, appliqué depuis quelques années à *Rhizobium*, doit permettre de préciser les séquences métaboliques spécifiques impliquées dans les différentes étapes de l'installation de la symbiose et dans la fourniture d'énergie pour la production d'azote réduit.

De l'ensemble de cette étude bibliographique, il ressort le rôle important des glucides et de leurs dérivés ainsi que celui des acides dicarboxyliques dans l'établissement de la relation symbiotique entre *Rhizobium* et les Légumineuses. Aussi avons-nous choisi cette espèce pour l'étude de la dégradation du glucose et du fructose. Nous abordons également la régulation du catabolisme de ces oses simples par le succinate de sodium.

Les connaissances actuelles de l'utilisation de ces substrats par les bactéroïdes sont encore aujourd'hui très partielles. Ceci est certainement dû à la difficulté d'obtention du matériel biologique. Les auteurs travaillent surtout à préciser le fonctionnement métabolique des cellules libres.

Les travaux sont réalisés le plus souvent sur *R. leguminosarum*, *R. japonicum* et plus récemment sur *R. cowpea*. Peu de choses sont connues pour *R. meliloti*. Or ce groupe d'inoculation :

- rassemble les souches infectant la luzerne, Légumineuse dont l'intérêt économique est important pour nos pays européens ;
- appartient à l'ensemble des espèces de **Rhizobium** à croissance rapide dont nous possédons de nombreuses souches au laboratoire.

Nous avons donc choisi d'étudier la dégradation des substrats carbonés par cette espèce, **R. meliloti**, en particulier le glucose et le fructose. En effet, outre que ces deux oses sont en quantité très importante dans les nodules des plantes infectées, ils représentent de plus un modèle tout à fait spécial à l'origine de la mise en évidence d'une particularité métabolique de l'espèce en culture libre, permettant encore hypothétiquement de mieux comprendre son fonctionnement en symbiose.

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

I. - LES SOUCHES BACTERIENNES

1.1. Origine

Nous avons utilisé soit des souches de la collection du Laboratoire, soit des souches fournies par des Centres de collection ou des Laboratoires extérieurs.

1.1.1. Souches du Laboratoire

Ces souches sont isolées à partir des nodules de racines de Légumineuses de différentes espèces.

Les nodules sont sectionnés des racines qui les portent et nettoyés à l'eau. Ils sont ensuite désinfectés par immersion durant 5 mn dans une solution de chlorure mercurique à 2,5 %, additionnée de Teepol à 0,5 %. A partir de ce moment, les manipulations se font en conditions stériles : verrerie et matériel. Les nodules sont rincés 10 fois de suite par de l'eau distillée stérile afin d'être certain d'avoir éliminé toute trace de désinfectant. Ils sont ensuite placés dans 2 ml d'une solution de saccharose à 20 % et broyés par l'extrémité d'un agitateur de verre. La suspension obtenue est isolée à l'ose sur un milieu de croissance très riche et bien adapté au développement des Rhizobia : le milieu de Wright (WRIGHT, 1926). Les clones obtenus après 4 à 6 jours d'incubation sont réisolés, repiqués et contrôlés par leur nodulation *in vitro* de Légumineuses aseptiques.

Les souches sont conservées soit :

- par repiquages réguliers sur tube incliné de milieu RC gélosé plus fructose à 1 % et maintenus au réfrigérateur ;
- par lyophilisation sur lait cystéiné de suspensions cellulaires denses en ampoules et scellées sous vide ;
- par congélation à - 18°C, après addition de glycérol stérile à raison de 20 %, de cultures cellulaires sur milieu TY.

Toutes ces souches sont identifiées par la première lettre de leur nom d'espèce suivie du numéro d'ordre de leur isolement. Leur origine est définie par l'abréviation UST LILLE 1 (Université des Sciences et Techniques de Lille).

1.1.2. Souches extérieures au Laboratoire

Nous avons conservé leur identification d'origine donnée soit par les Laboratoires extérieurs, soit par les Centres de collection.

Les différentes abréviations utilisées sont les suivantes :

- CIAT : Centre International d'Agriculture Tropicale de Marseille.
- CSIRO : Common wealth Scientific and Industrial Research Organisation, Camberra, Australie.
- RIO : Research Institute Ontario, Canada.
- RCR : Rothamsted Collection of **Rhizobium**, Harpenden, Herbfordshire, Angleterre.
- UWA : University of Western Australia, Nedlands, Australie.

Toutes ces souches sont également contrôlées par leur nodulation **in vitro** de Légumineuses aseptiques.

1.2. Les souches des différents groupes d'inoculation

1.2.1. Souches de R. meliloti

Souche	Origine
2011 D	J. DENARIE (Versailles)
A 145	Hollande (Kampen)
Tu 20	Tunisie
44	F. PICHINOTY CIAT
Su 47	CSIRO
A 161	Hollande (Kampen)
Fm 1	France (Dijon)
M5S	UST Lille I
M11S	UST Lille I
M13S	UST Lille I
M14S	UST Lille I
21	F. PICHINOTY CIAT
12	RIO (Canada)
M 1-5	Belgique (Gembloux)
2001	F. PICHINOTY RCR
2003	F. PICHINOTY RCR
2004	F. PICHINOTY RCR
Wu 498	UWA
Wu 499	UWA
Ar 16	Tunisie
2011 S ₂	RCR
2011 R ²	RCR
Ve 26	M. OBATON (Dijon)
M3S	UST Lille I
M5N1	UST Lille I
M17S	UST Lille I
M20S	UST Lille I
HDI	UST LILLE I

1.2.2. Souches de R. leguminosarum

Nom de la souche	Origine
L2S	UST Lille I
L3S	UST Lille I
L4S	UST Lille I
L21S	UST Lille I

1.2.3. Souches de R. trifolii

Nom de la souche	Origine
T5S	UST Lille I
T7S	UST Lille I
T27S	UST Lille I
T35S	UST Lille I

1.2.4. Souches de R. phaseoli

Nom de la souche	Origine
P2S	UST Lille I
P7S	UST Lille I
P11S	UST Lille I
P12S	UST Lille I



1.3. Contrôle de l'infectivité des souches de Rhizobium : le test de nodulation

1.3.1. Principe

Le seul critère que nous possédons actuellement pour vérifier l'appartenance au genre **Rhizobium** d'une souche sauvage isolée est la nodulation **in vitro** d'une Légumineuse appartenant à son groupe d'inoculation.

Les graines sont d'abord désinfectées, mises à germer stérilement sur milieu solide puis placées en culture hydroponique aseptique. Les plantules sont contaminées par une suspension cellulaire de la souche à tester. L'apparition de nodules sur les racines témoigne de l'appartenance de la bactérie au genre **Rhizobium**.

Ce test n'est valable que pour les souches sauvages. En effet, certains mutants ont perdu leur possibilité infectieuse et sont dits Nod⁻. Pour eux, leur appartenance au genre **Rhizobium** ne peut se faire que par la mise en évidence de marqueurs génétiques et leur comparaison avec ceux de la souche sauvage d'origine.

1.3.2. Réalisation du test

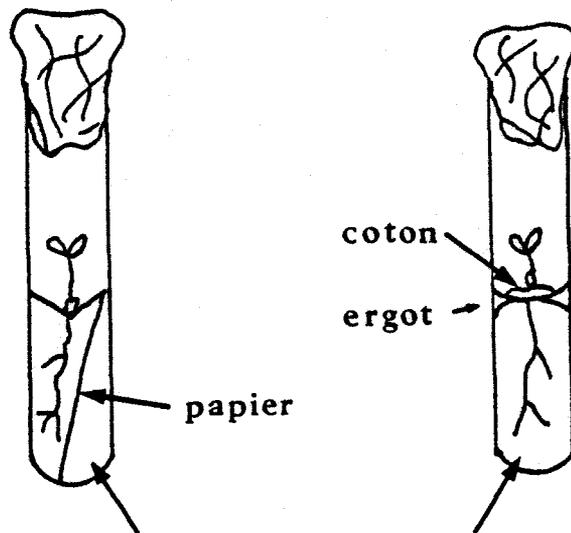
1.3.2.1. Prégermination aseptique des graines de Légumineuses

Les graines sont d'abord désinfectées par immersion 5 mn dans une solution de chlorure mercurique à 2,5 % additionnée de 0,5 % de Teepol, celui-ci facilitant le mouillage des particules. Rincées une dizaine de fois à l'eau distillée, elles sont ensuite placées stérilement sur un milieu de culture bactérien permettant de contrôler pendant la prégermination en incubation à 30°C l'absence de contaminations résiduelles.

Les graines germées sont récupérées après 3 ou 4 jours d'incubation. Les petites graines (Luzerne, Trèfle) sont traitées ensuite tel quel, les grosses graines (Pois, Haricot) subissent l'ablation des cotylédons préconisée par BONNIER et BROUWERS (1959) de façon à développer par la suite des mini-plantules à partie aérienne réduite capables de noduler dans des tubes en verre de 30 x 200.

1.3.2.2. Culture hydroponique aseptique des Légumineuses

Les petites graines prégermées sont placées stérilement dans des tubes de 20 x 200 cotonnés, soit sur un support de papier à chromatographie dument plié, soit sur du coton hydrophile maintenu en place par des ergots. Il en est de même pour les grosses graines dans des tubes de 30 x 200 (fig. 4).



Milieu de NICOL et THORNTON (1941)

Figure 4 - Mise en place de plantules de Légumineuses en culture aseptique.

Le milieu nutritif minéral utilisé est le milieu de NICOL et THORNTON (1941) sans nitrate de sodium. Les plantules sont placées en serre à 20°C et à 80 % d'humidité. La phase diurne est de 16 h.

1.3.2.3. Inoculation des plantules

Dès l'apparition des racines secondaires (après une semaine en moyenne de croissance), les plantules sont contaminées par l'addition au milieu nutritif d'une suspension dans le tampon de non prolifération d'environ 10^8 cellules bactériennes lavées.

En cas de test positif, les nodules apparaissent après 3 ou 4 semaines.

2. - LES MILIEUX

2.1. Les milieux de culture bactériens

Lorsqu'ils doivent être utilisés solides, ces milieux sont gélifiés par addition de 15 g par litre d'agar.

2.1.1. Le milieu de Wright (WRIGHT, 1926)

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4, 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,2 g

CaSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Ca CO ₃	0,1 g
Eau de levure	100 ml
Mannitol	10 g
E.D. QSP	1 litre

pH 7,2 à 7,5

Stérilisation 120°C, 20 min

L'extrait de levure fraîche (eau de levure) est obtenu par autoclavage à 120°C pendant 20 mn de 100 g de levure fraîche de boulangerie dans 1 litre d'eau distillée. La suspension autoclavée est filtrée à chaud sur un papier filtre jusqu'à colmatage de ce dernier. Le filtrat obtenu est jaune limpide et est conservé à la température du Laboratoire après avoir été réautoclavé à 120°C pendant 20 mn (communication personnelle de J. BRAKEL à B. COURTOIS).

2.1.2. Le milieu TY (BERINGER, 1974)

CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,88 g
Tryptone Difco	5,0 g
Extrait de levure	3,0 g
E.D. QSP	1 litre

pH 7,2 à 7,5

Stérilisation 120°C, 20 min

2.1.3. Le milieu RC (LAIRD, 1932 modifié par DELATTRE, 1971)

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
Extrait de levures	1,0 g
E.D. QSP	1 litre

pH 7,2 à 7,5

Stérilisation 120°C, 20 min

Ce milieu doit être complété extemporanément par une source de carbone à raison, en général, de 10 g/l. S'il s'agit d'un hydrate de carbone, la stérilisation se fait en solution concentrée (20 %) à 105°C durant 20 mn.

2.1.4. Le milieu RHB1 (DELATTRE, 1971)

K_2HPO_4	1,0 g
$MgSO_4, 7H_2O$	0,2 g
NH_4NO_3	1,0 g
E.D. QSP	1 litre
pH 7,2 à 7,5	

Stérilisation 120°C, 20 mn

La biotine (vitamine H) et la thiamine (vitamine B₁) sont stérilisées par filtration sur membrane de porosité 0,22 µ. Elles sont ajoutées au milieu à raison respectivement de 10 µg/l et 500 µg/l.

Ce milieu doit également être complété d'une source de carbone dans les mêmes conditions que le milieu RC.

2.2. Le milieu de non prolifération bactérienne (MNP)

Il est constitué d'un tampon dit de non prolifération (TNP).

$MgSO_4, 7H_2O$	0,2 g
K_2HPO_4	1,0 g
E.D. QSP	1 litre
pH 7	

Stérilisation 120°C, 20 mn

auquel on ajoute une source de carbone dans les mêmes conditions que pour les milieux RC et RHB₁.

2.3. Le milieu de culture des Légumineuses

Il s'agit du milieu de NICOL et THORNTON (1941).

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4, 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$FePO_4$	1,0 g
$Ca_3(PO_4)_2$	2,0 g
$FeCl_3, 6H_2O$	0,01 g
$NaNO_3$	0,5 g
E.D. QSP	1 litre
pH 6,8 - 7,2	

Stérilisation 105°C, 30 mn

3. - LA MUTAGENESE ET L'ISOLEMENT DE MUTANTS METABOLIQUES

La souche sauvage est cultivée sur milieu TY liquide, à 30°C et en agitation jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance : on obtient une population de l'ordre de 10^9 cellules par ml.

Les bactéries sont récupérées par centrifugation à 8 000 g durant 10 mn. Le culot est lavé deux fois par un tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (Tris maléate 50 mM, pH 6,1). Resuspendues dans ce même tampon, les bactéries sont traitées par la N-méthyl-N'-nitro-nitrosoguanidine à raison de 200 µg/ml à 30°C durant 20 mn.

Les cellules ainsi traitées sont lavées deux fois dans le TNP et mises à nouveau en culture sur TY liquide. Une nouvelle culture est réalisée sur milieu RHB₁ plus fructose à 10 g/l. On ajoute la pénicilline G (2 000 µ/ml) au début de la phase exponentielle de croissance.

Après 24 h d'incubation à 30°C, les survivants (1 %) sont lavés, réisolés et déposés en spots sur milieu TY solide. Les mutants, dans cet exemple, fructose négatif sont identifiés par répliques sur milieu RHB₁ solide plus fructose.

4. - LES CONDITIONS DE CULTURE

4.1. Cultures en chambre chaude

Toutes les cultures en petit volume sont réalisées soit en tubes (10 ml), en erlens (300 ml) ou en fioles à toxines (1 000 ml), placés en chambre thermorégulée à 30°C durant des temps variables :

- soit sur plateau d'agitation alternative (120 aller-retours/mn) ;
- soit sur table d'agitation rotative ayant un excentrique de 20 mm et tournant à 105 tours/mn.

Le suivi du développement microbien s'effectue par mesure à 620 nm de la densité optique (DO) des suspensions cellulaires.

4.2. Cultures en biophotomètre

4.2.1. Principe

Nous avons utilisé un biophotomètre prototype conçu et construit par MARAIS et coll. (1981). L'appareil permet de suivre l'évolution de la croissance bactérienne dans 15 tubes à la fois, placés en conditions de température et d'agitation contrôlée. L'intervalle des temps de mesure est programmable et l'ensemble des données est rapporté par une imprimante annexée.

4.2.2. 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 h. Les cellules sont récupérées après centrifugation (8 000 g, 20 mn), lavées dans du TNP, centrifugées à nouveau et reprises dans du TNP afin d'obtenir une suspension cellulaire de DO (mesurée à 620 nm) égale à 1 (environ $1,2 \times 10^9$ cellules/ml).

Les différents milieux sont inoculés avec 1 % de leur volume de cette suspension cellulaire.

4.2.3. Cultures et suivi

Les cultures sont réalisées dans des tubes de 18 x 200 fermés par un bouchon plastique non hermétique et contenant au maximum 10 ml de milieu.

La température d'incubation est réglée à 30°C et l'agitation de type Vortex à 500 rpm.

Le suivi de la croissance microbienne est réalisé par mesure de la densité optique de chacun des tubes à 600 nm. La fréquence choisie est de 15 mn.

4.3. Cultures en fermenteurs

L'utilisation de bioréacteurs a été réalisée à trois occasions :

- lors de l'étude du rôle de la pression partielle en oxygène dans les milieux pour le fonctionnement de la voie du 2 céto-gluconique chez *R. meliloti*. Pour cela nous avons réalisé des incubations microbiennes en conditions variables de transfert en oxygène (KLa) ;

- lors de la préparation de cellules bactériennes pour les études des phénomènes de transport, essentiellement pour le glucose. En effet, lors de travaux précédents (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, à pH régulé ;

- lors de la mise en évidence de croissances diauxiques de *R. meliloti* sur un mélange de substrats carbonés par le suivi de la concentration en oxygène des milieux lors d'un transfert de gaz constant. Cette technique permet, sans prélèvements donc sans risque de contamination, de suivre la cinétique de croissance du microorganisme.

4.3.1. Description du matériel

Nous avons choisi d'utiliser le fermenteur de plus petit volume disponible au Laboratoire : il s'agit d'un bioréacteur de 5 l au total, de 3 l utiles, conçu et réalisé par Setric Génie Industriel (fig. 5).

Cette unité de fermentation est équipée d'unités :

- de mesure et de régulation de la température,
- d'agitation variable,
- de mesure et de régulation du pH,
- de mesure de l'oxygène dissous,
- de détection et de régulation de mousses.

4.3.2. Pratique d'une fermentation

4.3.2.1. Préparation du matériel

Toutes les pièces du réacteur sont rigoureusement nettoyées au détergent et à l'eau et remontées rigoureusement en veillant à l'état et à la position des différents joints.

Le réacteur est chargé de 3 l de milieu RHB₁ et l'ensemble est autoclavé à 120°C durant 45 mn. La source de carbone, dont la nature et la concentration varie

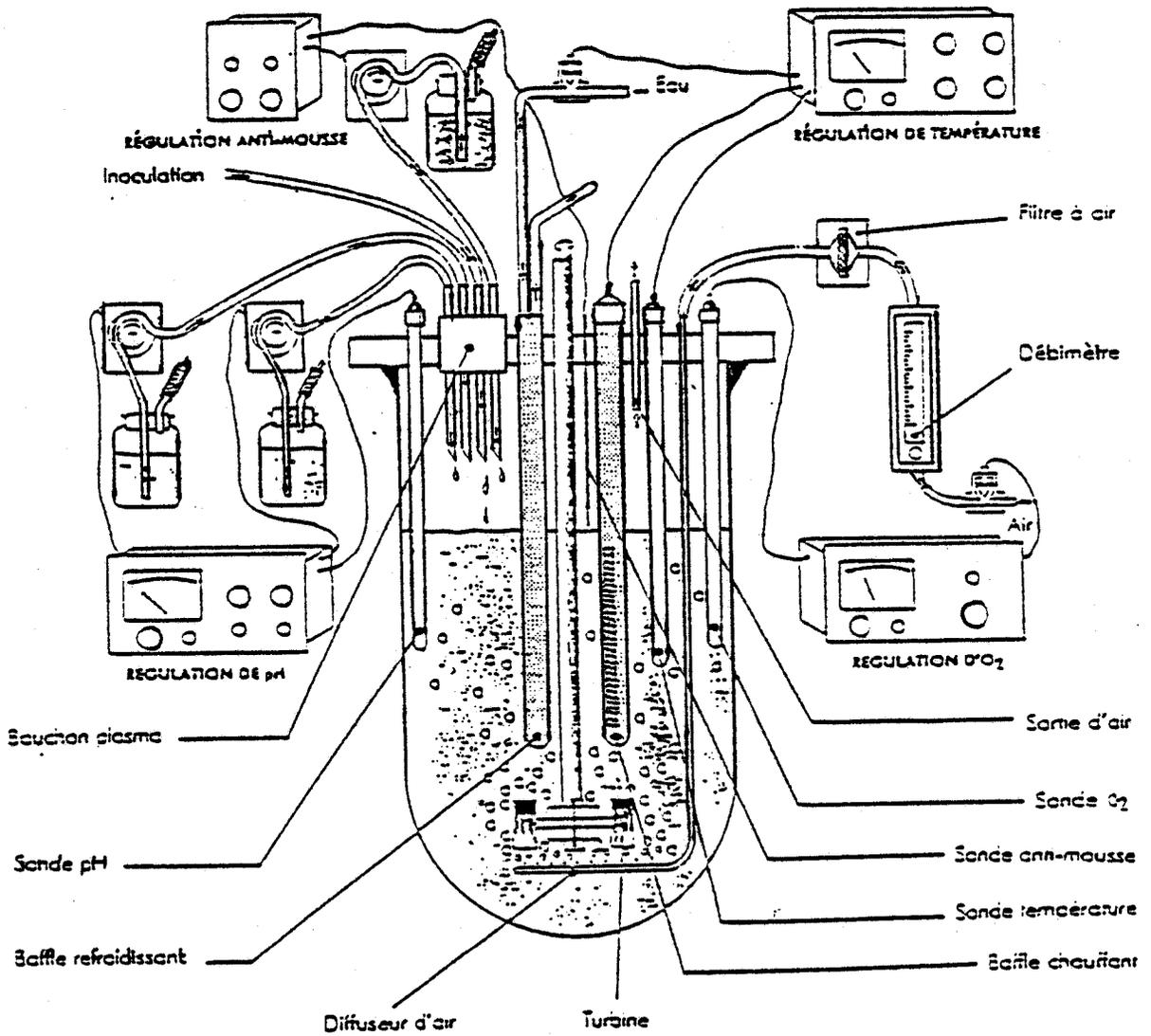


Figure 5 - Vue éclatée de la conception d'un bioréacteur Setric Génie Industriel.

selon les manipulations, est stérilisée séparément et additionnée stérilement au milieu avant son inoculation.

4.3.2.2. Réalisation de la 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 en agitation alternative.

Dans un deuxième temps, les fioles de préculture contenant 300 ml de RHB₁ additionné du substrat à 10 g/l sont inoculés par ces tubes à raison de 10 % de leur volume. La croissance est alors réalisée sur table d'agitation rotative à 30°C durant 24 h.

4.3.2.3. 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. La suspension obtenue sert d'inoculum au réacteur.

4.3.2.4. Conditions de culture

Les conditions de culture sont variables en fonction des trois occasions d'utilisation des bioréacteurs que nous avons eues :

- lors de la préparation de cellules bactériennes pour les études de phénomènes de transport, le milieu RHB₁ est additionné de glucose à raison de 10 g/l. La croissance est réalisée à 30°C durant 16 h. Le pH est régulé entre 6,8 et 7,2 durant toute la durée de la fermentation. Le KLa est constant et égal à 60 h⁻¹ ;
- lors de l'étude de croissances diauxiques, le milieu RHB₁ est additionné de chacun des substrats à raison de 1 g/l. La croissance est réalisée durant 20 h à 30°C. Le pH n'est pas régulé. Le KLa est constant et égal à 35 h⁻¹ ;
- lors de l'étude du rôle de l'oxygène sur le fonctionnement de la voie du 2 céto-gluconique, les travaux sont réalisés en deux phases : une phase de production de cellules en masse suivie d'une phase de mise en non prolifération de ces cellules dans des conditions différentes d'oxygénation.

La préparation des cellules en masse se fait sur milieu TY additionné de glucose à raison de 10 g/l. La fermentation dure 20 h à pH non régulé et à 30°C. Le KLa est constant et égal à 60 h⁻¹. En fin de croissance, les cellules sont récupérées par centrifugation sur rotor d'essorage continu, lavées par le TNP et stockées à + 4°C à forte densité (DO = 10) dans ce même tampon.

La mise en non prolifération en réacteur par dilution de cette suspension-mère dans le TNP additionné de glucose à raison de 10 g/l est réalisée de façon à obtenir une DO = 1,0. L'incubation se fait à 30°C sous des transferts en oxygène variables (KLa = 15 ou 22 ou 30 ou 37,5 ou 45 ou 60 h⁻¹). Le pH n'est pas régulé, il y a donc acidification. La manipulation est arrêtée lorsque les valeurs de pH atteintes ne sont plus compatibles avec l'activité biologique, soit après 40 à 80 h de fonctionnement.

4.3.3. Détermination du coefficient de transfert en oxygène : le KLa

Lors de leur activité métabolique, les microorganismes ne sont capables de consommer l'oxygène que lorsque celui-ci se trouve dissous dans la phase aqueuse des milieux d'incubation. La faible solubilité dans l'eau de ce gaz (0,234 mM à saturation à 20°C) fait qu'il est nécessaire de le renouveler régulièrement au fur et à mesure de sa consommation. En effet, en deçà d'une concentration critique, il devient facteur limitant et agissant comme substrat, il obéit à la loi établie par MONOD (1942) liant le taux de croissance μ à la concentration le concernant selon la relation :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[O_2]}{K_{O_2} + [O_2]}$$

μ_{\max} = taux de croissance maximum

$[O_2]$ = concentration en O₂ dissous

K_{O_2} = concentration en O₂ dissous pour laquelle la valeur de μ observée est égale à la moitié de la valeur de μ_{\max} .

Pour éviter que l'oxygène soit facteur limitant, il est nécessaire de le transférer à la masse liquide à une vitesse telle que sa concentration soit supérieure à sa concentration critique, variable selon le microorganisme et ses conditions de développement.

La capacité d'un fermenteur d'assurer ce transfert est évaluée par le coefficient de transfert en oxygène $K_L a$. Ce coefficient dépend en particulier de la géométrie du réacteur et de son mode d'agitation et d'aération. Il est le produit de K_L , coefficient global du transfert de masse par rapport au film liquide qui s'exprime en cm^3/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} .

4.3.3.1. Théorie et principe de mesure

La réoxygénation des milieux en fermentation est assurée par l'injection d'air au travers de diffuseurs poreux. Le transfert de l'oxygène de la bulle gazeuse vers les sites de son utilisation dans les cellules comporte plusieurs étapes décrites par TSAO et KEMPE (1960) (fig. 6).

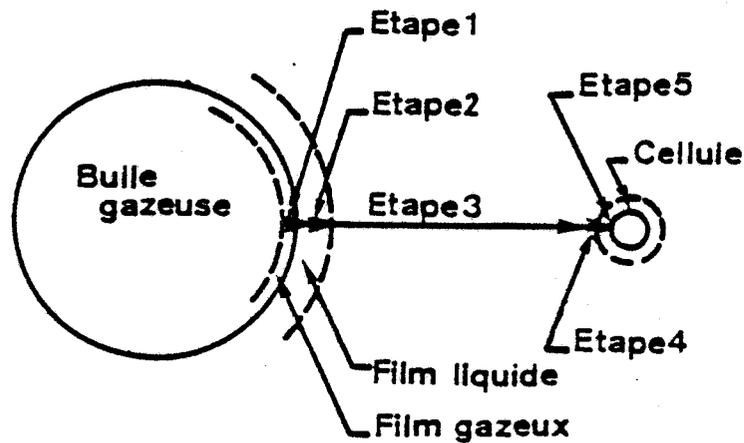


Figure 6 - Les différentes étapes du transfert d'oxygène en fermentation (d'après TSAO et KEMPE, 1960)

Ce transfert unidirectionnel s'effectue au travers de plusieurs films, chacun d'eux exerçant sur lui une certaine résistance. On considère que l'interface gaz-liquide, côté bulle est doublée d'un film gazeux (étape 1) et du côté liquide d'un film liquide (étape 2), ce dernier exerçant une grande influence sur le transfert. L'oxygène dissous diffuse alors vers les cellules (étape 3) au contact desquelles se trouvent un nouveau film liquide (étape 4). L'oxygène doit enfin pénétrer dans la cellule bactérienne.

Plusieurs théories permettent d'établir l'équation de transfert (théorie des films laminaires, théorie de la diffusion continue) mais elles conduisent toutes finalement à la même expression de l'équation de transfert :

$$\frac{dC_L}{dt} = KLa (C^* - C_L)$$

- $\frac{dC_L}{dt}$ = vitesse de transfert de l'oxygène (mmoles O₂/l x h)
- KL = le coefficient global de transfert de masse par rapport au film liquide (cm/h). Il est égal au rapport du coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau et de l'épaisseur du film au travers duquel s'effectue le transfert
- a = la surface spécifique d'échange (cm²/cm³)
- C* = la concentration en oxygène dissous (mmoles O₂/l) en équilibre avec p, la pression partielle en oxygène dans la phase gazeuse

De cette équation, on peut déduire que la vitesse de transfert de l'oxygène est maximale quand C_L = 0.

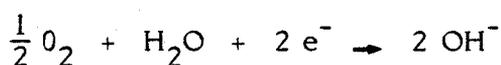
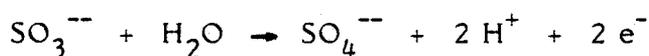
4.3.3.2. Détermination par méthode chimique

Nous avons appliqué cette méthode pour la mesure des KLa en milieu placé sur table d'agitation et pour les réacteurs faiblement agités et aérés.

Cette méthode a été proposée par COOPER (1944).

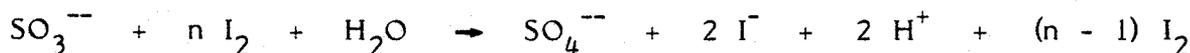
L'évaluation de la capacité de transfert du dispositif est ramenée à celle de la vitesse d'oxydation d'une solution de sulfite de sodium en sulfate, placée dans le bioréacteur et soumise aux conditions d'aération - agitation dans lesquelles on veut évaluer le KLa.

La réaction d'oxydo-réduction est la suivante :

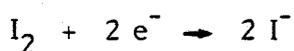
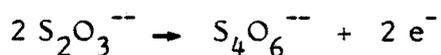


Cette réaction a lieu en présence d'ions Cu⁺⁺ comme catalyseur. On peut mettre en oeuvre une solution 0,25 M de sulfite de sodium.

Cette réaction chimique est très rapide, sa vitesse n'étant limitée que par la vitesse de dissolution de l'oxygène. La vitesse de disparition du sulfite par oxydation permet d'évaluer le KLa. A différents intervalles de temps, on prélève un échantillon de solution en cours d'oxygénation. On dose le sulfite qui n'a pas été oxydé par iodométrie, à l'aide d'iode en excès :



On dose en retour l'iode en excès par la réaction globale :



Tant que la solution étudiée renferme du sulfite, la concentration C_L est nulle. L'évolution de la concentration en sulfite en fonction du temps est une droite dont la pente est égale à $KL_a \cdot C^*$, dont on déduit le KL_a .

Cette méthode est relativement facile à mettre en oeuvre et présente le grand avantage d'être peu coûteuse. Certaines manipulations, telles que les transports d'échantillons doivent être faits à l'abri de l'air pour éviter les réactions parasites.

Toutefois, une solution de sulfite ne réagit pas du tout comme un milieu de culture, ni a fortiori comme la culture microbienne elle-même. Enfin, cette méthode ne convient pas à l'évaluation du KL_a de petits bioréacteurs dont les capacités de transferts sont importantes. Elle comporte alors une grande imprécision.

4.3.3.3. Détermination par méthode physique

Nous avons appliqué cette méthode pour la mesure des KL_a dans les bioréacteurs grâce à l'utilisation d'une sonde polarographique stérilisable immergée dans le fermenteur. Le signal électrique fourni permet d'enregistrer, en continu, la concentration en oxygène dissous, ou plus exactement la tension en oxygène.

A l'aide de ces sondes, on peut conduire des mesures de KL_a selon trois types de méthodes :

- la méthode statique, conduite dans le milieu de culture, en absence de micro-organismes (CORRIEU, 1975) ;
- la méthode dynamique, conduite dans le milieu de culture inoculé, lors du déroulement de la fermentation (TAGUCHI et HUMPHREY, 1966) ;
- la méthode du bilan gazeux. Cette méthode nécessite un appareillage coûteux et difficile à manipuler. Son intérêt est de se prêter à la détermination en ligne du KL_a et au suivi de son évolution possible au cours de la culture, du fait de la modification des propriétés rhéologiques du milieu (lors de la synthèse des exopolysaccharides par *Rhizobium* par exemple) ou de la modification des interfaces gaz-liquide par différents métabolites sécrétés au cours du déroulement de la culture.

Cette méthode suppose de mesurer les débits de gaz entrant et sortant, de déterminer les teneurs en oxygène de ces gaz et enfin, par sonde, de déterminer C_L de façon à ce qu'elle ne devienne pas inférieure à la concentration critique et permette de calculer le KLa . L'utilisation de débitmètres très précis est obligatoire (débitmètres massiques) ainsi que celle d'analyseur de gaz, par résonance magnétique nucléaire par exemple.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus à ceux de la méthode de COOPER et coll. (1944), nous avons choisi d'appliquer la méthode statique de CORRIEU (1975).

Cette méthode est donc conduite dans le milieu de culture en l'absence des cellules. Elle permet de déterminer la valeur du KLa dans les conditions où se déroulera la fermentation.

Après avoir saturé le milieu de culture en oxygène dissous, on arrête l'aération et on injecte de l'azote dans la solution. La concentration en oxygène dissous diminue et tend vers 0. On reprend alors l'injection d'air dans les conditions de débit à tester. La concentration C_L augmente et la façon dont elle augmente dépend de la capacité de transfert du dispositif, dans les conditions (aération - agitation) d'expérience (fig. 7).

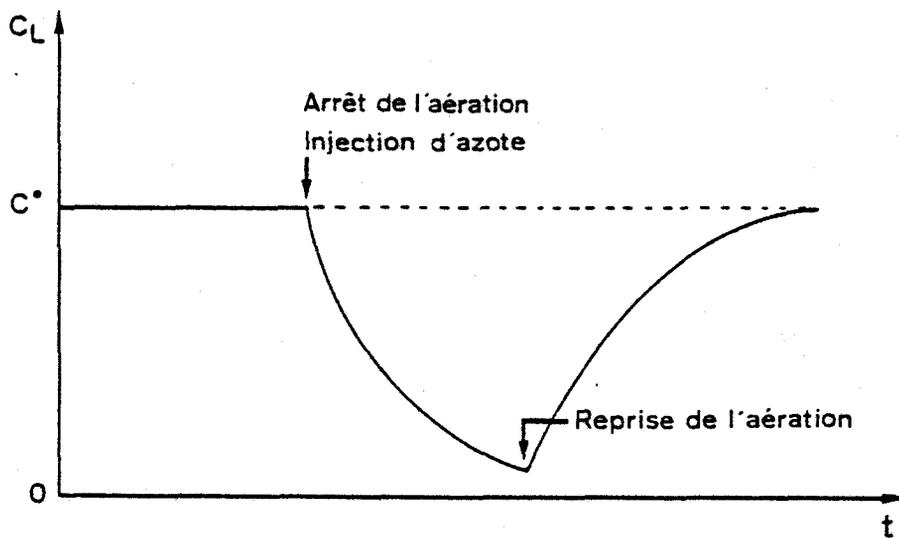


Figure 7 - Cinétique de resaturation de l'oxygène dissous dans un réacteur.

On déduit le $K_L a$ de la courbe de variation de C_L en fonction du temps de deux façons. Tout d'abord, on peut tracer la courbe des variations de :

$$\frac{dC_L}{dt} = f(C^* - C_L)$$

La pente de la droite obtenue est égale à $K_L a$.

On peut également procéder par intégration de l'équation de transfert :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L)$$

On déduit :

$$\frac{dC_L}{C^* - C_L} = K_L a \cdot dt$$

Au temps $t = 0$, c'est-à-dire quand on reprend l'aération, $C_L = 0$ d'où :

$$\log \frac{C^*}{C^* - C_L} = K_L a (t - t_0)$$

On porte donc, à partir de la courbe $C_L = f(t)$, les variations de $\log \frac{C^*}{C^* - C_L}$ en fonction du temps. La droite obtenue a pour pente $K_L a$.

5. - METHODES UTILISEES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les nodules des plantules inoculées sont sectionnés et traités selon la méthode de FINAN et coll. (1983) que nous avons modifiée partiellement.

Lavés par un tampon phosphate 0,025 M, pH 6,8, durant 2 h, les nodules sont incubés une nuit à + 4°C dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans ce même tampon.

Lavés à nouveau 4 h à + 4°C dans le tampon phosphate, ils sont fixés selon le principe de RYTER et KELLENBERGER (1958) :

- immersion dans une solution d'acide osmique à 1 % dans le tampon phosphate, 2 h à + 4°C ;
- lavage en tampon phosphate une nuit à + 4°C ;
- immersion dans une solution d'acétate d'uranyl à 2 % dans l'eau distillée, 2 h à + 4°C ;
- lavage à l'eau distillée, 2 h à + 4°C ;
- déshydratation à + 4°C par . l'éthanol à 50 %, 2 fois 15 mn,
 - . l'éthanol à 75 %, 2 fois 15 mn,
 - . l'éthanol à 95 %, 2 fois 15 mn,
 - . l'éthanol absolu, 2 fois 15 mn,
 - . l'oxyde de propylène, 3 fois 20 mn ;
- préinclusion dans un mélange oxyde de propylène et résine à 50/50, une nuit ou plus jusqu'à évaporation ;
- inclusion en résine araldite 4 h suivie d'une polymérisation à 60°C durant 3 jours.

Les blocs sont coupés par un couteau de diamant monté sur "Porter Blum". Les coupes, montées sur grille, sont colorées soit par le citrate de plomb (REYNOLDS, 1963), soit par l'acide périodique plus le protéinate d'argent (THIERY, 1967).

L'observation est faite au microscope électronique HITACHI HU12, 75 kv.

6. - METHODES RESPIROMETRIQUES

6.1. Principes généraux

La mesure des échanges gazeux respiratoires est effectuée par l'emploi du respiromètre de Warburg. Il comprend un bain-marie thermostaté dans lequel on place l'échantillon soumis à l'étude. Cet échantillon est contenu dans une fiole à deux anses latérales, reliée à un manomètre. Fiole et manomètre constituent une unité solidaire fixée sur un bâtis mobile dont le mouvement commandé provoque une agitation continue de l'échantillon.

Les principes généraux sont ceux énoncés par UMBREIT et coll. (1959).

L'étude de la respiration sur différents hydrates de carbone nous oblige à mesurer à la fois la quantité d'oxygène consommée mais aussi la quantité de dioxyde de carbone dégagée. En effet, la comparaison des valeurs des quotients respiratoires ainsi déterminée $\frac{Q_{CO_2}}{Q_{O_2}}$ et des valeurs théoriques peut nous permettre de préciser si la dégradation oxydative du substrat carboné en dioxyde de carbone et en eau est complète.

6.2. Conditions expérimentales

Rhizobium meliloti est cultivé durant 16 h à 30°C en agitation rotative sur milieu RC additionné de glucose à raison de 10 g/l. Les cellules sont récupérées par centrifugation, lavées deux fois par le TNP et remises en suspension dans ce même tampon de façon à obtenir une densité optique à 620 nm égale à 9.

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

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

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

Tableau 5 - Modèle de répartition des différents éléments lors d'une manipulation type en appareil de Warburg.



Rôle de chacun de ces ensembles :

- Ensemble 1 : thermobaromètre. Il sert à corriger d'éventuelles variations de température ou de pression qui peuvent se produire au cours de la manipulation. Il convient de retrancher ou d'ajouter la lecture faite sur le thermobaromètre des lectures effectuées sur les manomètres des autres fioles (2-3-4-5).
- Ensemble 2 : mesure de la quantité d'oxygène consommé lors de la respiration endogène des cellules.

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

- Ensemble 3 : mesure de la quantité de dioxyde de carbone dégagée lors de la respiration endogène des cellules.

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

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

- Ensemble 4 : mesure de la quantité d'oxygène consommée en présence d'un substrat donné.
- Ensemble 5 : mesure de la quantité de dioxyde de carbone dégagée en présence d'un substrat donné.

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

6.3. Utilisation des radioisotopes lors du bilan respiratoire en présence d'oses

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

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

Après 4 h d'incubation, en fin de manipulation, les cellules bactériennes sont éliminées par centrifugation 10 mn à 16 300 g. Le surnageant est passé en gel-filtration (Sephadex G25) de façon à séparer le polyoside synthétisé des molécules simples non polymérisées. Les parties aliquotes radioactives des fractions sont diluées à 20 % V/V dans le liquide scintillant au dioxanne. La radioactivité est mesurée dans le spectromètre à scintillation liquide intertechnique Abac S.L. 40.

7. - MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Au cours de nos travaux, nous avons été amené à :

- rechercher les activités enzymatiques témoignant du fonctionnement de différentes voies de catabolisme des hydrates de carbone. Ces activités ont été mesurées soit sur les fractions cytoplasmiques solubles des cellules bactériennes, soit sur les fractions membranaires ;
- étudier le fonctionnement des systèmes de transport des hydrates de carbone et en définir les constantes physiques ;
- vérifier les capacités fixatrices d'azote chez un mutant métabolique en symbiose.

7.1. Mesure de l'activité des enzymes impliqués dans le catabolisme des glucides

7.1.1. Les enzymes cytoplasmiques solubles

7.1.1.1. Préparation des extraits cellulaires solubles

Un litre du milieu RHB₁ additionné de la source de carbone à 1 % est inoculé avec 10 ml d'une préculture de même composition que le milieu d'incubation.

Après incubation à 30°C sous agitation rotative pendant 18 h, les cellules sont collectées par centrifugation à 6 000 g, lavées avec du tampon phosphate de sodium pH 7,2 50 mM puis centrifugées.

On ajoute au culot 10 ml du même tampon additionné de β -mercaptoéthanol 0,1 mM.

Les cellules sont ensuite traitées aux ultrasons (MSE 150 W Ultrasonic Desintegrator ; $\lambda = 15,5 \mu$) pendant 5 périodes de 30 s séparées par intervalles de 30 s. La température ne dépasse pas 10°C. Le broyat est centrifugé pendant 30 mn à 27 000 g pour éliminer les débris membranaires.

La concentration des extraits en protéines est déterminée par le dosage de LOWRY (LOWRY et coll., 1951) ($4 < [C] \text{ prot.} < 6 \text{ mg}$). Les activités enzymatiques sont exprimées en nombre de nmoles de produit formé par minute et par mg de protéines :

$$1 \text{ UE} = X \text{ nmoles produit formé/mn} \times \text{mg protéines.}$$

7.1.1.2. Recherche d'activités enzymatiques spécifiques de différentes voies cataboliques

L'ensemble des protocoles est établi ci-après.

7.1.2. Les enzymes membranaires

7.1.2.1. Préparation des extraits membranaires

Nous avons adapté la technique mise au point par KING (1971). Les cellules stockées dans l'azote liquide sont décongelées et amenées à une concentration voisine de 0,2 g de cellules poids humide/ml d'un tampon glycine (NaOH) pH 8 ; 0,2 M.

Elles sont ensuite soumises aux ultra-sons par portion de 20 ml de suspension pendant 15 périodes de 20 s séparées par intervalle de 2 mn. La température ne devant pas dépasser 12°C. Le broyat obtenu est centrifugé 2 fois 10 mn à 7 500 g à 2°C pour éliminer les fractions lourdes puis le surnageant est centrifugé pendant 60 mn à 85 000 g.

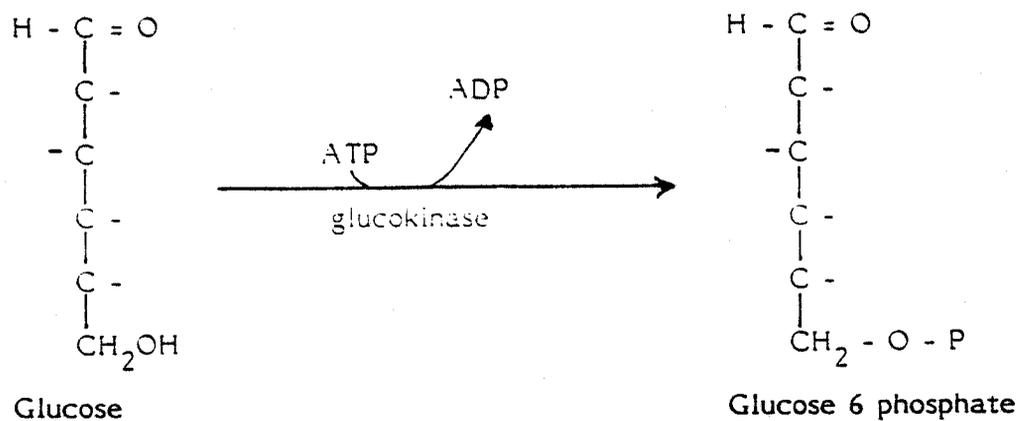
Le précipité obtenu est constitué d'un gel rouge et de débris blanchâtres. Le gel est récupéré puis lavé dans le tampon, une seconde centrifugation s'effectue dans les mêmes conditions que ci-dessus. Le gel est ensuite récupéré dans le tampon glycine NaOH pH 7,5 ; 0,2 M ; 1 % MgCl_2 .

Ces extraits ainsi préparés possèdent encore leurs chaînes d'oxydations cellulaires fonctionnelles. On y recherche les activités glucose déshydrogénase et gluconate déshydrogénase.

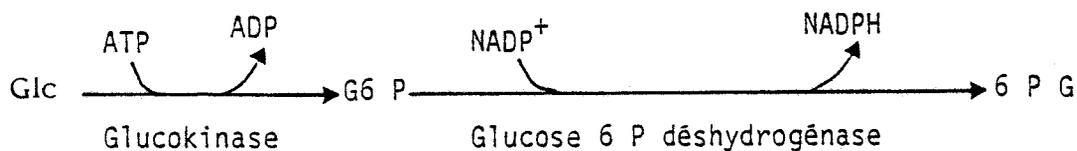
7.1.2.2. Recherche des activités déshydrogénases spécifiques

L'ensemble des protocoles est établi ci-après.

GLUCOKINASE (E.C. 2-7-1-2)

Activité

Principe de la mesure de l'activité : MULONGOY et coll., 1977a.

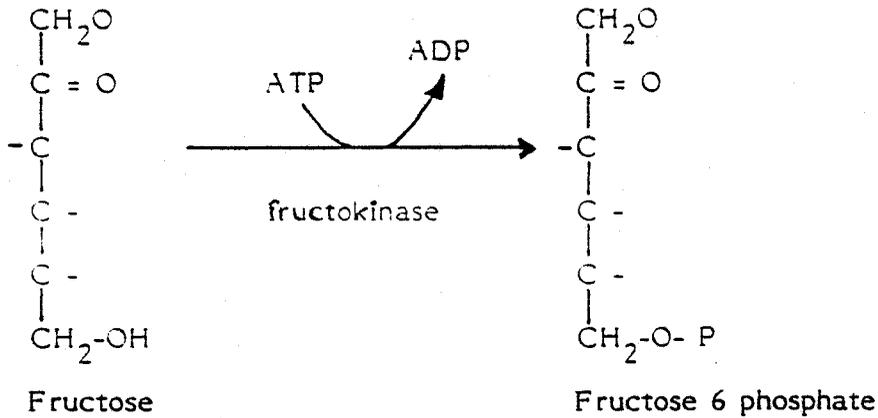
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (3 ml) contient :

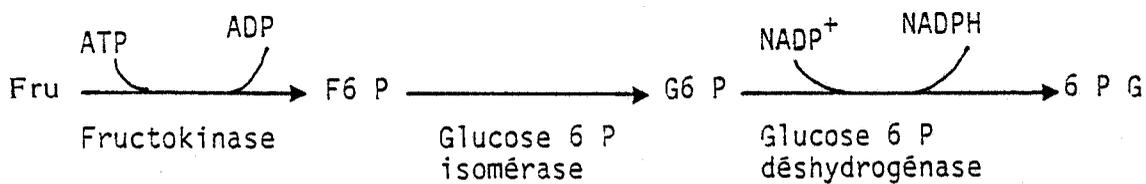
200	μmoles	de tampon Tris-HCl pH 7,65
10	μmoles	de glucose
10	μmoles	ATP
1,5	μmole	NADP ⁺ .
1,5	μmole	MgSO ₄ .
1	unité	G6P DH
extrait		



FRUCTOKINASE (E.C. 2-7-1-3)

Activité

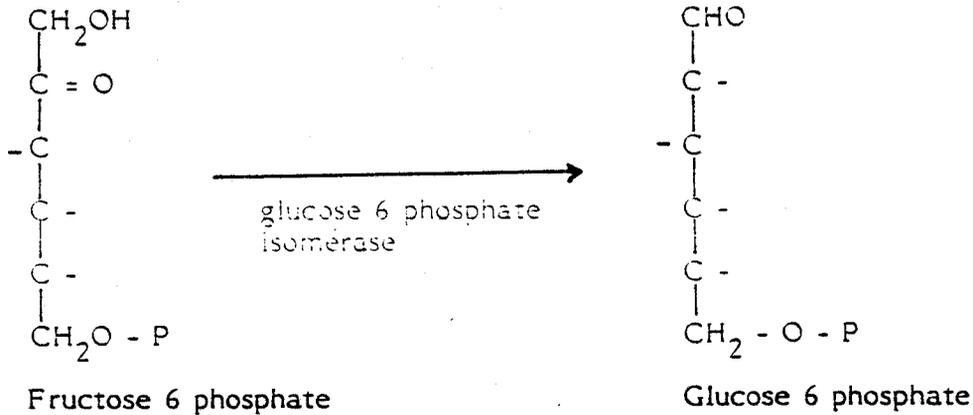
Principe de la mesure de l'activité : KEELE et coll., 1969 modifiée.

Mode opératoire

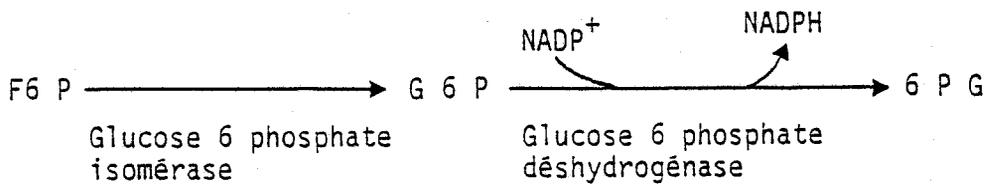
Le mélange réactionnel (3 ml) contient :

200	μmoles	tampon Tris-HCl pH 7,65
10	μmoles	fructose
10	μmoles	ATP
1,5	μmole	NADP ⁺ .
1,5	μmole	MgSO ₄ .
0,5	unité	glucose 6 P isomérase
1	unité	glucose 6 P déshydrogénase
extrait		

GLUCOSE 6 PHOSPHATE ISOMERASE (E.C. 5-3-1-9)

Activité

Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

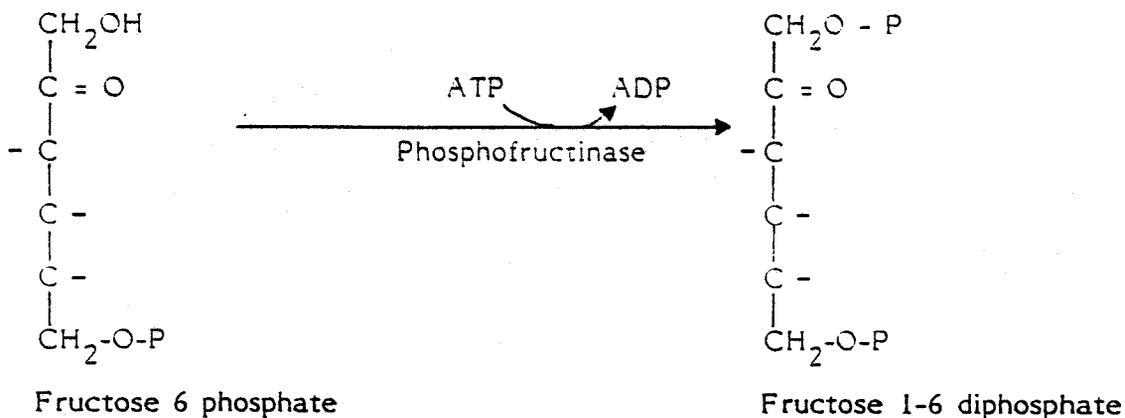
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

40	μmoles	tampon glycyl-glycine pH 8
12	μmoles	MgSO ₄ .
1	μmole	fructose 6 P
1,5	μmole	NADP ⁺ .
0,5	unité	glucose 6 P déshydrogénase
extrait		

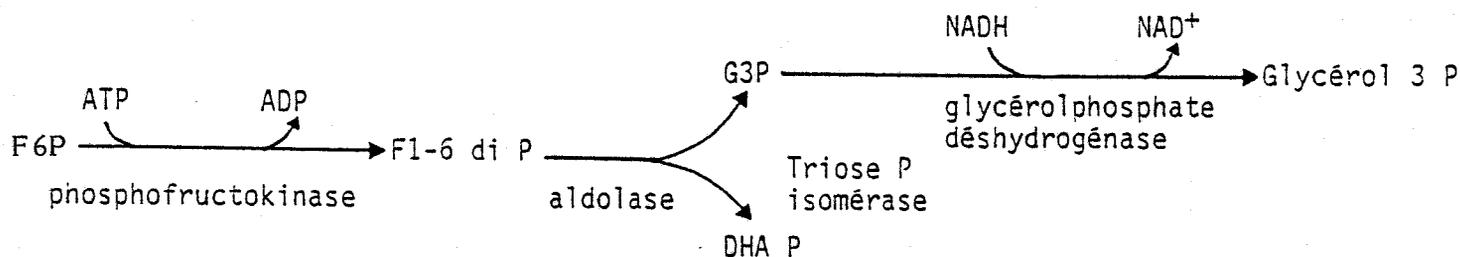


PHOSPHOFRUCTOKINASE (E.C. 2-7-1-11)

Activité

Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

On mesure la vitesse d'oxydation du NADH conduisant à la formation du glycérol 3 phosphate (STOWERS et ELKAN, 1983).

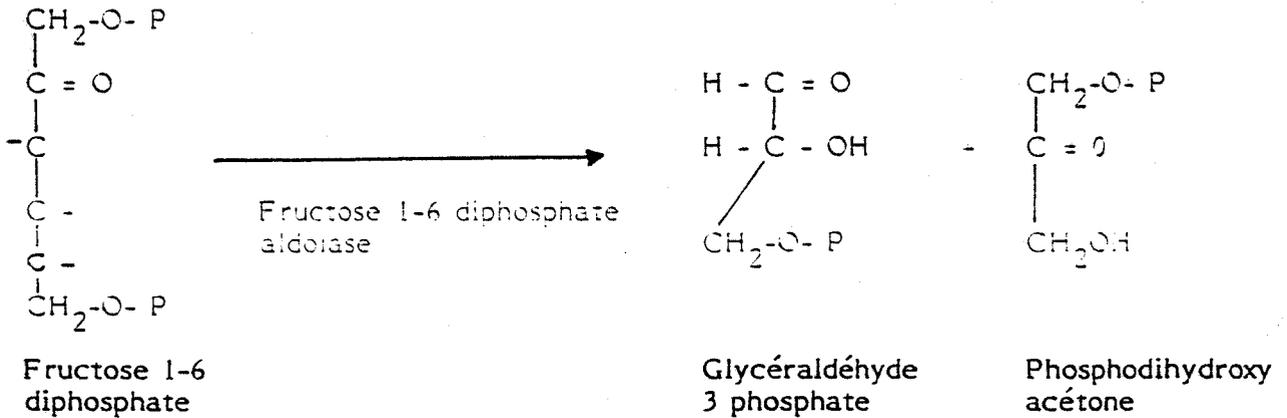
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (2 ml) contient :

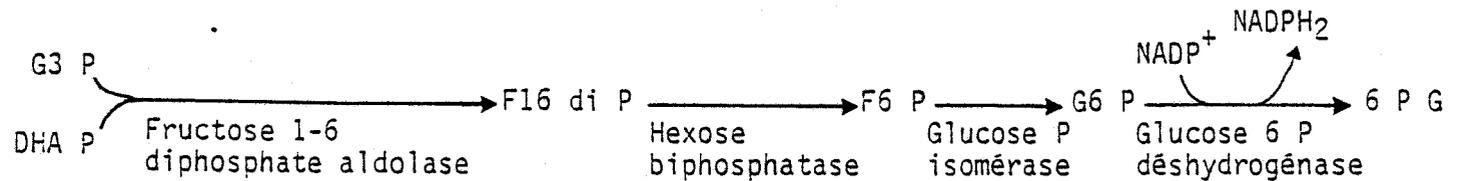
40	µmoles	phosphate Na pH 6,5
2	µmoles	Fr6 P
10	µmoles	MgCl ₂
10	µmoles	βmercaptoéthanol
10	µmoles	ATP
0.3	µmole	NADH
0,2	unité	Aldolase
3	unités	glycérol P déshydrogénase et triose P isomérase
		extrait



FRUCTOSE 1-6-DIPHOSPHATE ALDOLASE (E.C. 4-1-2-13)

Activité

Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

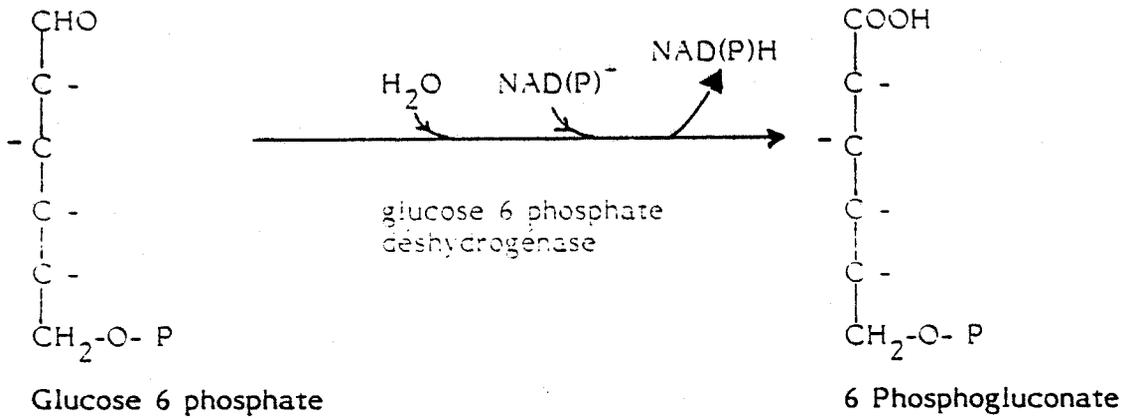
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

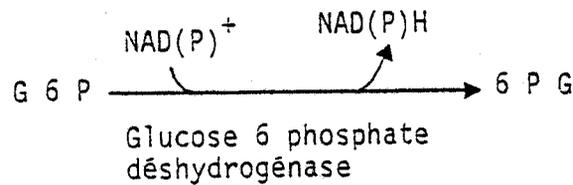
40	µmoles	de tampon glycylglycine pH 8
12	µmoles	MgSO ₄ .
3	µmoles	G3 P ⁴
3	µmoles	DHA P
0.5	unité	hexose biphosphatase
0.5	unité	glucose 6 P isomérase
0.5	unité	G6 P DN
0.3	µmole	NADP ⁺ .
		extrait



GLUCOSE 6 PHOSPHATE DESHYDROGENASE (E.C. 1-1-1-49)

Activité

Principe de la mesure de l'activité : KEELE et coll., 1969.

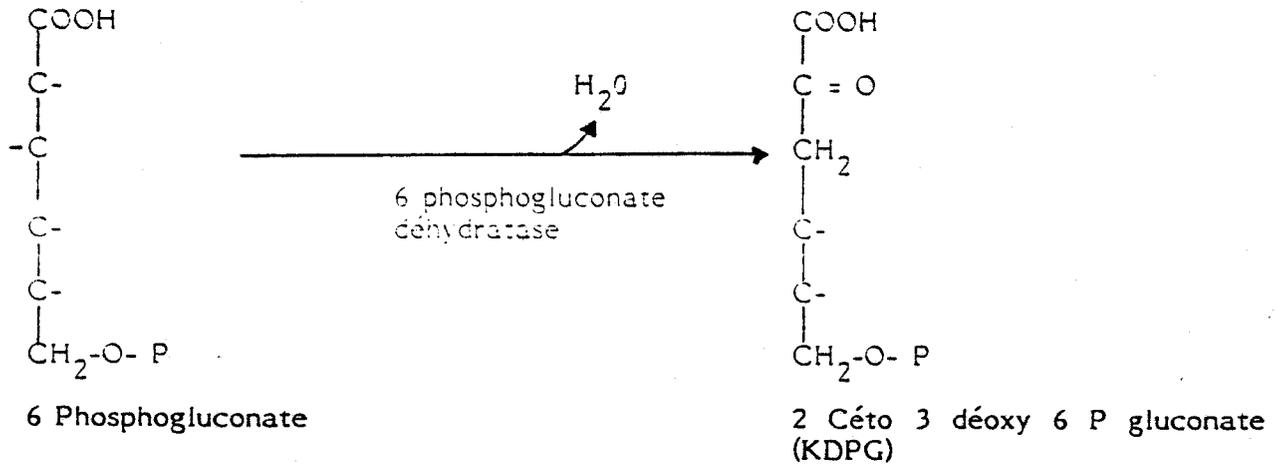
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

40	μmoles	tampon glycyl-glycine pH 8
12	μmoles	MgSO ₄ .
3	μmoles	glucose 6 phosphate
1,5	μmole	NAD(P) ⁻ .
extrait		

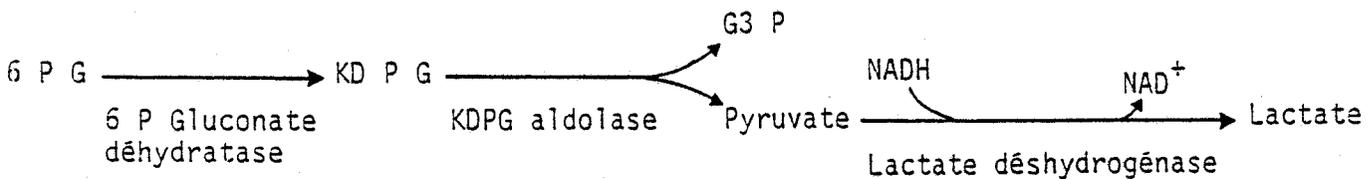


6 PHOSPHOGLUCONATE DEHYDRATASE (E.C. 4-2-1-12)

Activité

Principe de la mesure de l'activité : LESSIE et coll., 1972.

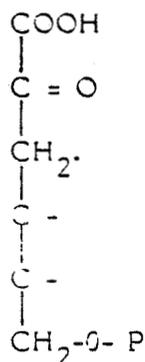
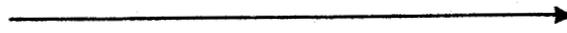
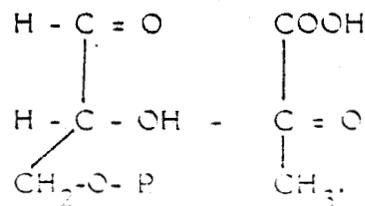
On mesure les activités combinées de cette enzyme et de la 2 céto 3 déoxy 6 phosphogluconate aldolase.

Mode opératoire

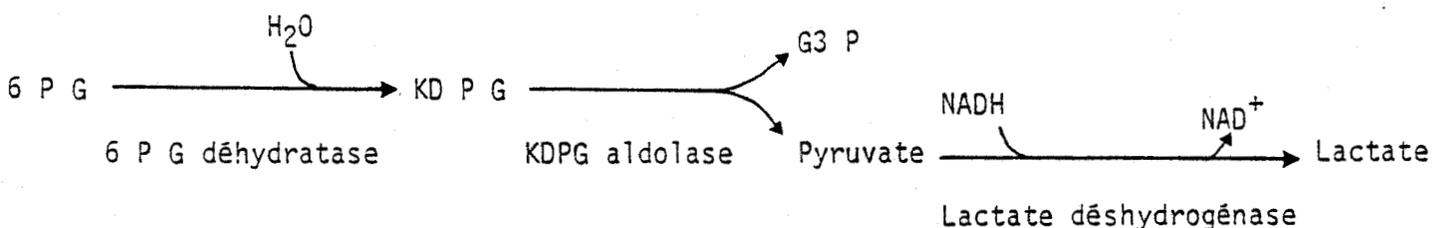
Voir Mode opératoire pour la KDPG aldolase.



2 KETO 3 DEOXY 6 PHOSPHOGLUCONATE ALDOLASE (E.C. 4-1-2-14)

Activité2 Céto 3 déoxy
6 phospho gluconate2 céto 3 déoxy 6 phosphogluconate
aldolaseGlycéraldéhyde
3 phosphate PyruvatePrincipe de la mesure de l'activité : LESSIE et coll., 1972.

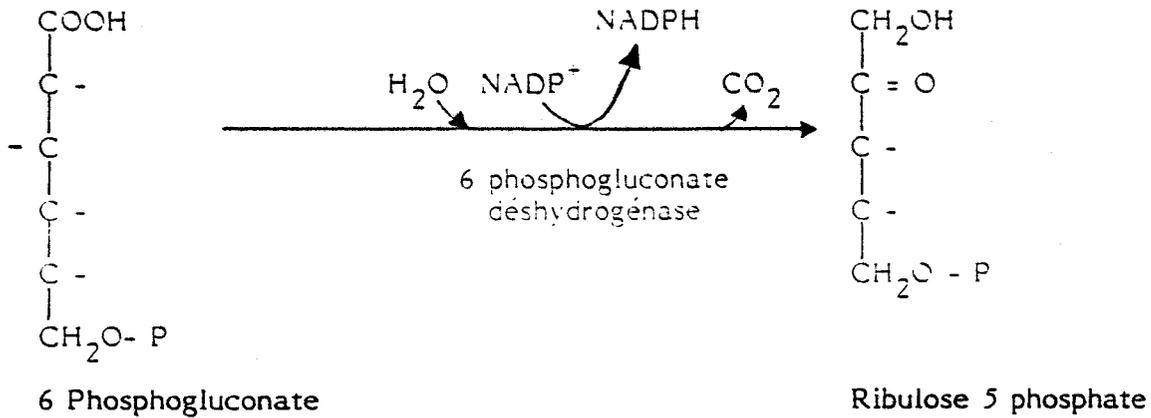
On mesure les activités combinées de cette enzyme et de la 6 phosphogluconate déshydratase.

Mode opératoire

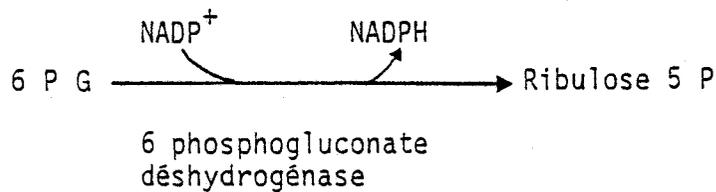
Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

200	μmoles	Tris-HCl pH 8,5
10	μmoles	βmercaptoéthanol
0.3	μmole	NADH
100	μg	lactate DH
5	μmoles	6PG
extrait		



6 PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASE A NADP^+ (E.C. 1-1-1-44)ActivitéPrincipe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

On mesure la réduction de NADP^+ à 340 nm.

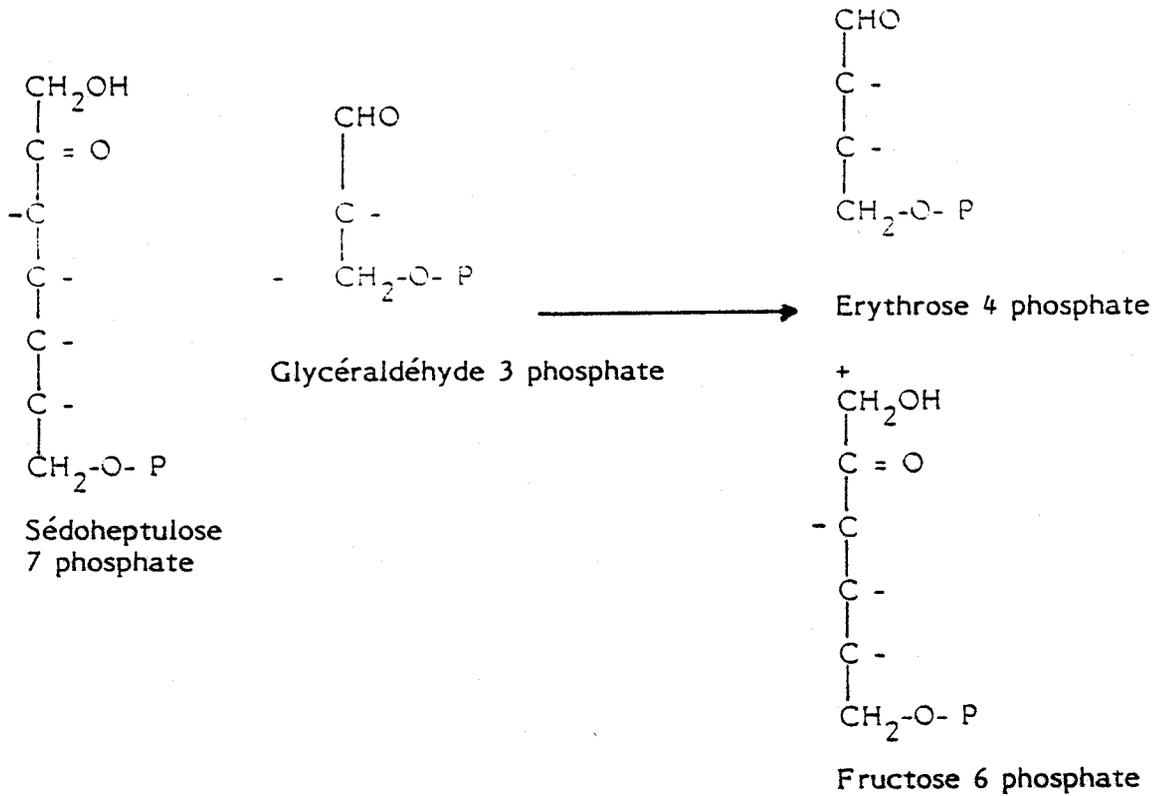
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

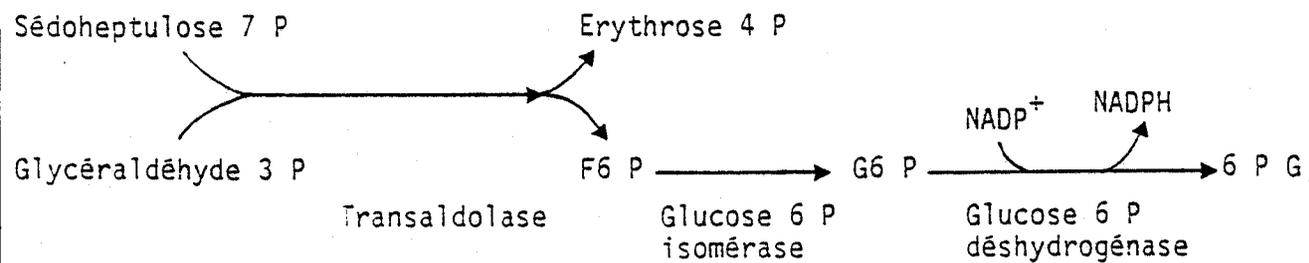
- 40 μmoles de tampon glycyl-glycine pH 8
 - 3 μmoles de 6 phosphogluconate
 - 12 μmoles de MgSO_4
 - 0,3 μmole de NADP^+ .
- extrait



TRANSALDOLASE (E.C. 2-2-1-2)

Activité

Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

Mode opératoire

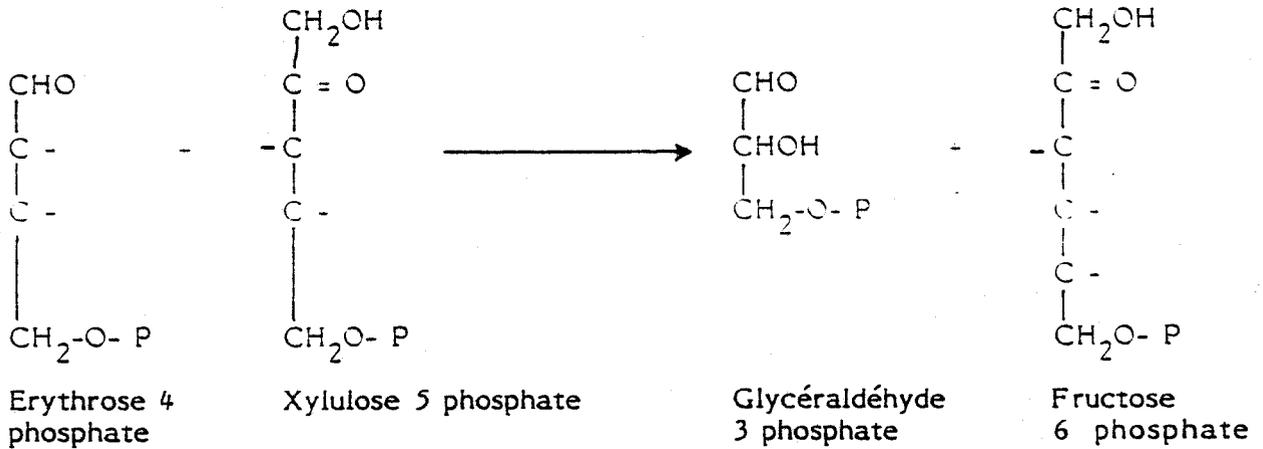
Le mélange réactionnel (1 m) contient :

40	µmoles	tampon glycyl-glycine
12	µmoles	MgSO ₄ .
0.5	unité	G6 P isomérase
0.5	unité	G6 P DH
0.3	µmole	NADP ⁻ .
3	µmoles	sédoheptulose 7 P
3	µmoles	G3 P
extrait		

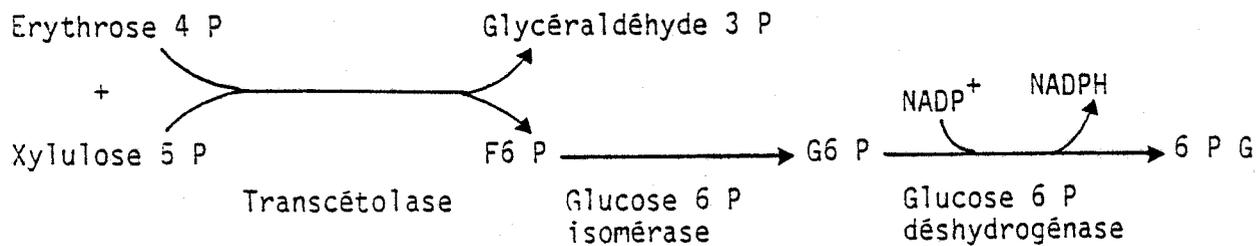


TRANSCETOLASE (E.C. 2-2-1-1)

Activité



Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.



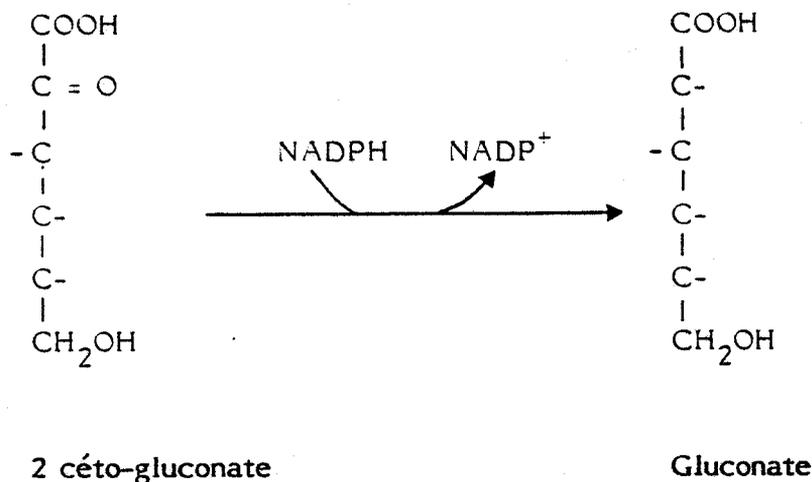
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

40	μmoles	tampon glycyl-glycine
12	μmoles	MgSO ₄ .
0,5	unité	Glucose 6 P isomérase
0,5	unité	Glucose 6 P déshydrogénase
0,3	μmole	NADP ⁻ .
3	μmoles	Erythrose 4 P
3	μmoles	Xylulose 5 P
extrait		

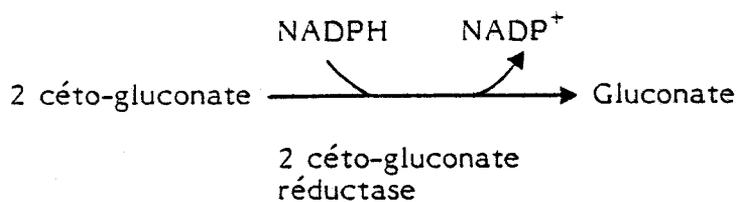


2 CETO-GLUCONATE REDUCTASE

Activité

Principe de la mesure de l'activité : KEELE et coll., 1970.

On mesure directement l'activité par variation d'absorbance à 340 nm du coenzyme en présence de 2 céto-gluconate en excès, à pH neutre.

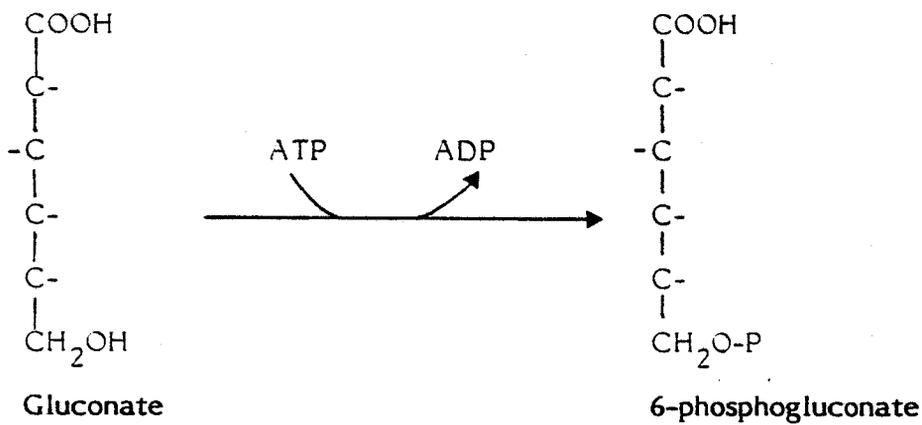
Mode opératoire

Le mélange réactionnel contient :

60	μmoles	tampon phosphate de sodium pH 7
5	μmoles	MgCl ₂
0,3	μmoles	NADPH H ⁺
20	μmoles	2 céto-gluconate de potassium
		extrait

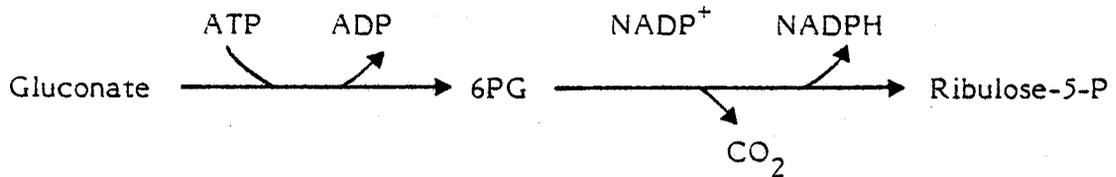


GLUCONOKINASE (EC 2.7.1.12)

Activité

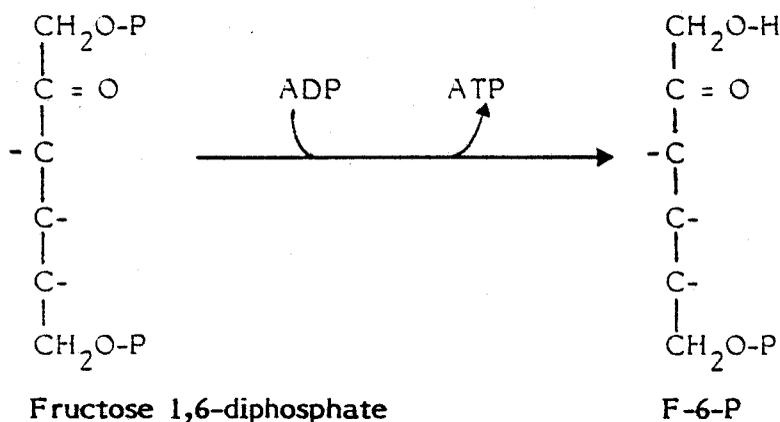
Principe de la mesure de l'activité : KEELE et coll., 1970.

La phosphorylation de l'acide gluconique est couplée à sa décarboxylation oxydative en ribulose-5-phosphate.

Mode opératoire

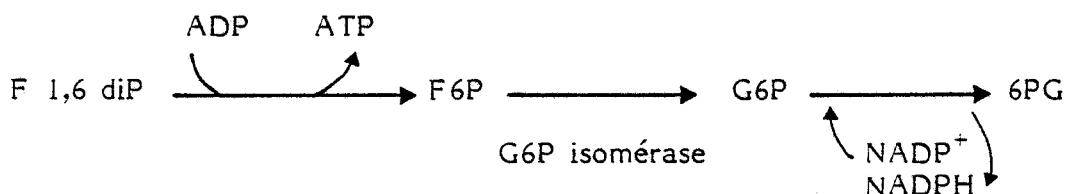
75	μmoles	tampon Tris-HCL pH 7,65
20	μmoles	gluconate
10	μmoles	ATP
10	μmoles	MgCl ₂
3	μmoles	NADP ⁺
2	unités	6-PG déshydrogénase
extrait		

HEXOSE BIPHOSPHATASE (EC 3.1.3.11)

Activité

Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

La réaction est couplée à l'isomérisation du fructose-6-phosphate en glucose-6-phosphate et à l'oxydation de ce dernier en 6-phospho-gluconate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

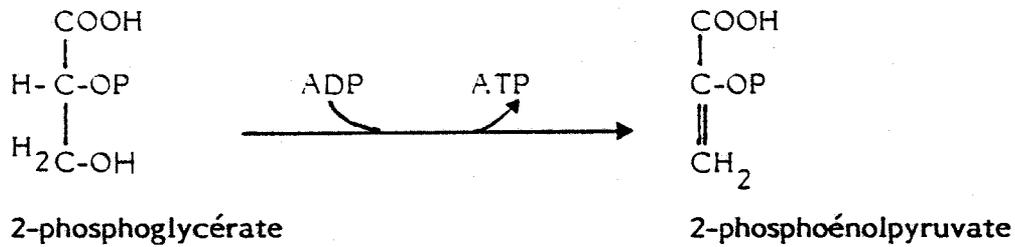
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

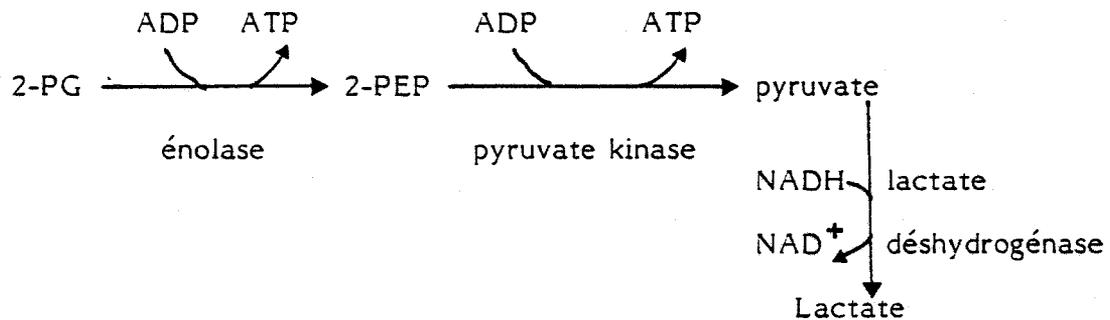
40	µmoles	tampon glycyl-glycine, pH 8
12	µmoles	MgSO ₄
3	µmoles	F 1,6 diP
1	mg	NADP ⁺
0,5	unité	G6P déshydrogénase
0,5	unité	G6P isomérase
extrait		



ENOLASE (EC 4.2.1.11)

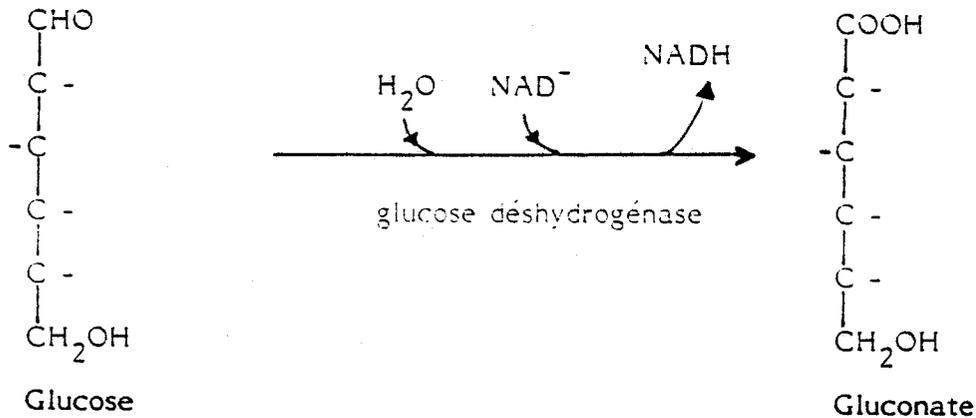
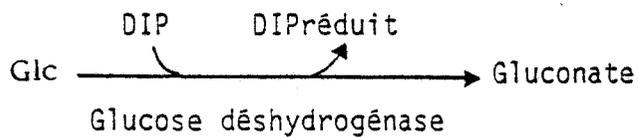
ActivitéPrincipe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

L'activité éolase est couplée à la pyruvate kinase. Le pyruvate formé est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase.

Mode opératoire

30	μmoles	tampon Tris-HCl, pH 7,5
0,3	μmole	MgSO ₄
3	μmoles	NADH ⁺
5	μmoles	ADP
0,5	unité	lactate déshydrogénase
0,5	unité	pyruvate kinase
0,5	μmole	2-P-glycérate-
extrait		

GLUCOSE DESHYDROGENASE (E.C. 1-1-1-47)

ActivitéPrincipe de la mesure de l'activité

DIP = dichlorophénolindophéno1

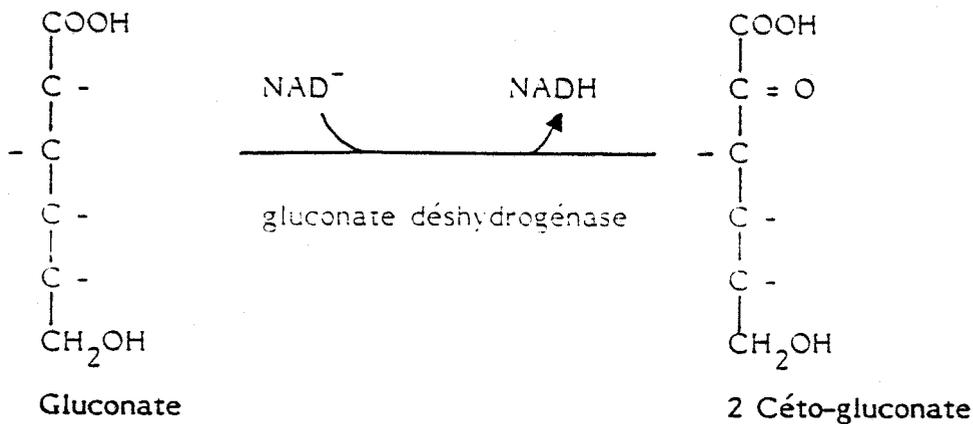
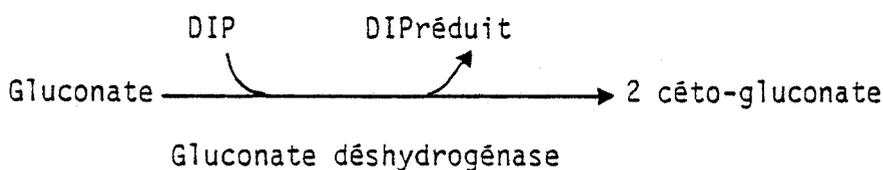
Mode opératoire

Le mélange réactionnel (2,4 ml) contient :

2	ml	tampon véronal/acide acétique pH 6,6	0.05 M
0.1	ml	MgCl ₂	0.2 M
0.05	ml	DIP à 0,3 mg/ml/tampon véronal pH 6,6	0.05 M
0.1	ml	CN ⁻ 15 mm amené à pH 6 par CH ₃ COOH	1,5 mM
0.05	ml	d'extrait membranaire	
0.1	ml	substrat	0.05 M
température 30°C			
lecture à 600 nm			



GLUCONATE DESHYDROGENASE (E.C. 1-1-99-3)

ActivitéPrincipe de la mesure de l'activitéMode opératoire

Le mélange réactionnel (2,4 ml) contient :

2	ml	tampon Malate/NaOH pH 5,8	0,05 M
0,1	ml	MgCl ₂	
0,05	ml	DIP à 0,3 mg/ml tampon véronal pH 6.6	0,05 M
0,1	ml	CN ⁻ 15 mM amené à pH 6 par CH ₃ COOH	
0,05	ml	d'extrait membranaire	
0,1	ml	substrat 30°C	
température 30°C			
lecture à 600 nm			



7.2. Mesures de l'activité des enzymes impliqués dans le transport des hydrates de carbone = les perméases

7.2.1. Préparation des cellules pour des essais d'accumulation de substrats carbonés

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 mn. 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 620 nm. Ces différentes manipulations, réalisées stérilement, permettent de conserver les suspensions cellulaires à + 4°C.

7.2.2. 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/nmole ;
- méthyl (αD-(U-¹⁴C) gluco) pyranoside ; activité spécifique : 279 mCi/nmole ;
- 2-désoxy-D(1-³H) glucose ; activité spécifique : 15 Ci/nmole ;
- D-(U-¹⁴C) fructose ; activité spécifique : 286 mCi/nmole.

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

7.2.3. Accumulation des substrats carbonés

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

La suspension cellulaire (DO 620 = 1,0 ; volume 1 ml) est préincubée à 30°C pendant 15 mn, 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 μ humides et rincés par 2 ml de TNP + NaCl à 5 % à + 0°C.

Les membranes sont séchées sous lampe infrarouge pendant 30 mn, 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".

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

7.2.4. 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 μ Ci de glucose, soit 1 μ Ci de α -méthyl-D-glucoside ou de 5 μ Ci 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 mn sur des échantillons de 0,1 ml traités comme pour des essais d'accumulation.

7.2.5. Nature des produits accumulés

7.2.5.1. Extraction du matériel accumulé

Des suspensions cellulaires de 5 ml à DO = 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 mn. Le matériel est centrifugé à 10 000 g durant 20 mn 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.

7.2.5.2. Analyse par 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 h. 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).

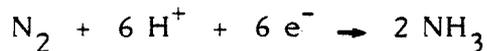
7.3. Mesure de l'activité de la nitrogénase : contrôle de l'efficacité des souches de Rhizobium

L'efficacité est la qualité de l'association **Rhizobium-Légumineuse** qui aboutit à la fixation d'azote moléculaire, ce caractère se note Fix^+ . L'utilisation de la réduction de l'acétylène en éthylène est employée pour en traduire son importance.

7.3.1. Principe de la méthode

DILWORTH (1966) et SCHOLLHORN et coll. (1967) ont montré que l'acétylène était réduit en éthylène par le système de la nitrogénase chez **Clostridium pasteurianum**.

La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la fixation d'azote ou la réduction assimilatrice d'azote. La réaction peut être schématisée de la façon suivante :



Cet enzyme est peu spécifique : elle peut transférer des électrons aux substrats homologues à l'azote comme : C_2H_2 , N_2O , HCN , etc...

La réduction de l'acétylène est réalisée suivant la réaction :



Elle correspond au transfert de deux électrons par molécule d'éthylène formée, alors qu'il faut six électrons pour réduire une molécule d'azote.

La fixation d'une molécule d'azote est réalisée de la même façon que la formation de trois molécules d'éthylène à partir d'acétylène. A partir de cette observation, il devient facile d'apprécier l'activité nitrogénase par la mesure de la production d'éthylène de plantules nodulées placées sous atmosphère enrichie en acétylène (HARDY et coll., 1968).

7.3.2. Dosage de l'éthylène

Ce dosage est effectué sur un chromatographe Intersmat IGC 112 FL selon les conditions suivantes :

- . gaz vecteur : N_2
- . température du four : 50°C
- . température d'injection : 70°C
- . température du détecteur : 115°C
- . détecteur : à ionisation de flamme

La colonne en acier inoxydable, de 2 m de longueur et de 0,31 cm de diamètre, est remplie de sphérosil XoBo 75.

7.3.3. Conditions expérimentales

Quand les plantules de Luzerne sont bien nodulées (4 semaines après l'inoculation), elles sont lavées avec de l'eau distillée, sont mises dans un flacon de 150 ml fermé hermétiquement. On prélève d'abord à l'aide d'une seringue à travers le bouchon de caoutchouc 17 ml d'air du flacon que l'on remplace par 15 ml d'acétylène soit 10 % (V/V) et 2 ml de propane dilué 100 fois par l'air (témoin interne) de façon à avoir approximativement 1,27 μ moles. Le flacon est ensuite homogénéisé par agitation manuelle. L'incubation se fait à l'étuve à 30°C. La mesure d'acétylène réduit est effectuée à différents temps (0, 3, 6, 24 h) par injection de 50 μ l dans le chromatographe en phase gazeuse, jusqu'à ce que la courbe de la formation d'éthylène atteigne un plateau.

7.3.4. Calcul de la quantité d'éthylène produite

La formule appliquée pour déterminer la quantité d'éthylène formée dans le flacon est la suivante :

$$Q = C \times K \times \frac{H_1 \text{ (C}_2\text{ H}_4\text{) éthylène}}{H_2 \text{ (C}_3\text{ H}_8\text{) propane}}$$

Q = nombre de moles de C₂ H₄ produites,

C = Nombre de moles de C₃ H₈ injectées,

K = coefficient de proportionnalité établi à partir d'un mélange en proportions égales (V/V) de C₃ H₈ et C₂ H₄ dans l'air (dans notre expérience :

$$K = \frac{\text{hauteur de pic C}_3\text{ H}_8}{\text{hauteur de pic C}_2\text{ H}_4} = 1,5$$

H₁ = hauteur de pic de C₂ H₄

H₂ + hauteur de pic de C₃ H₈

8. - RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES

8.1. Principe

L'analyse par électrochromatographie et autoradiographie d'extraits cytoplasmiques solubles, préparés à partir de cellules bactériennes incubées durant des temps brefs en présence de substrats radiomarqués, permet de mettre en évidence les premiers intermédiaires métaboliques issus de ces substrats et de les identifier par comparaison à une carte témoin.

8.2. Techniques d'électrophorèse et de chromatographie

8.2.1. Le support

Nous avons choisi le papier de cellulose (Whatmann n°1) dont les dimensions correspondent à celles des films KODAK (40 x 32 cm). Ce papier possède une texture fine et serrée à écoulement lent.

8.2.2. L'électrochromatographie

Le dépôt de l'échantillon se fait à 5 cm du bord dans le sens de la longueur et à 6 cm dans le sens de la largeur. L'électrophorèse se fait dans un appareil en toit type Durum sous 170 volts durant 8 h dans le tampon de MICHL (1951). Les feuilles sont séchées sous hotte ventilée puis introduites dans la cuve à chromatographie descendante dans le sens perpendiculaire à celui de l'électrophorèse. Le système solvant est celui de WATTEL (1961). On laisse la phase inférieure saturer le papier durant 24 h puis la phase organique est introduite dans la cuve et migre le long de la feuille durant 10 h.

8.2.3. Révélateurs chimiques pour la détermination de la position des témoins

Les oses neutres sont révélés par l'oxalate d'aniline (PARTRIDGE, 1949). Après passage à 105°C, ils apparaissent sous forme de tâche marron-noir ; il faut préciser de plus que dans ces conditions, l'acide 2 céto-gluconique est coloré en rose et le 5 céto-gluconique en jaune.

Le sédoheptulose est révélé par le réactif de KLEVESTRAND et NORDAL (1950).

Les acides aminés sont révélés par la ninhydrine en solution à 1 %, dans le mélange acide acétique-butanol (1/100, v/v).

Les acides organiques sont révélés par le vert de bromocrésol dont la zone de virage du jaune au bleu se situe de pH 3,8 à pH 5,4. On utilise une solution de l'indicateur à 0,1 % dans l'éthanol à 95°.

8.3. Conditions expérimentales : recherche des métabolites intermédiaires

8.3.1. Préparation des extraits

R. meliloti est cultivé sur milieu RHB₁ additionné de glucose ou de fructose à raison de 10 g/l. En fin de phase exponentielle, les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à 8 500 g durant 15 mn. Lavées deux fois par le TNP, elles sont remises en suspension dans ce tampon de façon à obtenir une DO₆₂₀ = 7,5.

A 2,5 ml de cette suspension, on ajoute 0,5 ml d'une solution de substrat carboné à 2 mg/ml plus les traceurs correspondants marqués uniformément au ¹⁴C. Les caractéristiques du U¹⁴C glucose et U¹⁴C fructose sont celles décrites précédemment dans les études de mécanismes de transport. Le gluconate U¹⁴C utilisé a les caractéristiques suivantes : il est préparé à partir de D(U¹⁴C) acide gluconique, activité spécifique 260 mCi/mmole.

Le temps d'incorporation est de 10 mn. L'addition de 12 ml d'éthanol à 95°, portés au préalable à la température de 45°C, permet l'arrêt de la réaction. La suspension ainsi traitée est laissée 1 h au bain-marie à 45°C, puis elle est centrifugée à 8 500 g durant 15 mn. Le surnageant est concentré jusqu'à un volume minimum à l'évaporateur rotatif sous vide pour être déposé sur le papier d'électrochromatogramme.

8.3.2. Analyse autoradiographique

L'électrochromatogramme est séché sous hotte ventilée. Chacune de ses faces est garnie d'un film KODAK, l'ensemble est placé entre deux plaques de verre sous presse à l'obscurité à 20-25°C. Le premier film est révélé après 7 jours de contact, le 2ème film après 14 jours. Les spots observés sont comparés à ceux de la carte des témoins révélés chimiquement.

9. - IDENTIFICATION DU PRODUIT ACIDE

9.1. Fabrication de dérivés 2-4-dinitrophénylhydrazones

Nous avons utilisé la 2-4-dinitrophénylhydrazine en solution dans l'acide chlorhydrique pour la condensation à froid avec notre échantillon selon la méthode de SELIGSON et SHAPIRO (1952).

9.2. Formation de dérivés quinoxalinols

Nous avons utilisé la méthode de LANNING et COHEN (1951) pour la détection et le dosage des acides 2 céto-hexoniques.

Les spectres d'absorption de l'orthophénylène diamine et des dérivés quinoxalinols sont vérifiés sur spectrophotomètre UV Unicam SP800 à défilement automatique des longueurs d'onde.

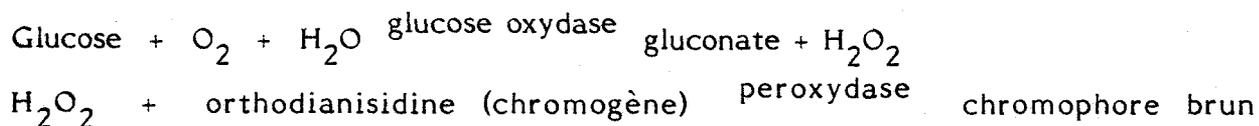
10. - METHODES DE DOSAGE

10.1. Dosage des oses neutres

Lors du calcul des rendements moléculaires de croissance de *R. meliloti* en présence de différents oses neutres, le dosage de ces derniers est effectué dans les surnageants par la méthode à l'orcinol sulfurique (MONTREUIL et SPIK, 1963).

10.2. Dosage enzymatique du glucose

Il est effectué par la glucose oxydase selon les principes énoncés par BERGMAYER et BERNT (1963) :



10.3. Dosage de l'acide 2 céto-gluconique

La méthode de WURTZ et JEHL (1957) modifiée par BRISOU (1964) a été employée. Toutes les valeurs annoncées sont corrigées de l'interférence due au glucose.

10.4. Dosage des exopolysaccharides

Les exopolysaccharides sont dosés :

- soit par voie chimique : les surnageants de milieux de culture centrifugés sont dialysés contre l'eau distillée pendant 48 h à 4°C. L'adialysable, renfermant les polysaccharides solubles, est dosé par l'orcinol sulfurique (MONTREUIL et SPIK, 1963) ;
- soit par voie radiochimique : lors de l'étude du bilan respiratoire en présence d'oses radiomarqués, les exopolysaccharides sont récupérés par filtration sur gel et dosés en scintillation liquide (COURTOIS et coll., 1982c).

10.5. Dosage des protéines

Il est effectué par la méthode de LOWRY et coll. (1951). La sérumalbumine bovine est utilisée comme standard.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

1. - ETUDE PRELIMINAIRE

1. - ETUDE PRELIMINAIRE

1.1. Introduction

Une étude préliminaire en microscopie électronique de *Rhizobium meliloti* en symbiose avec la Luzerne (*Medicago sativa*) nous a permis de visualiser avec précision le devenir des cellules bactériennes dans les tissus nodulaires végétaux.

Les différentes étapes de la transformation de ces cellules en bactéroïdes au sein du tissu végétal sont encore mal connues et sont jusqu'alors restées descriptives. On ne sait rien de la régulation des gènes qui gouvernent cette différenciation cellulaire et peu de variations métaboliques qui l'accompagnent.

1.2. Observations

Les nodules sont fixés, déshydratés et inclus dans l'araldite. Les coupes sont colorées sur grille et observées au microscope électronique.

La zone nodulaire II définie par MOSSE (1964) correspond à la zone d'infection des cellules végétales par les bactéroïdes. Dans cette région (fig. 8) on rencontre :

- des cordons infectieux qui cheminent dans le tissu nodulaire et qui assurent la dissémination des cellules bactériennes dans le cytoplasme de la plante. Sur notre photo, la position du cordon est centrale. Il traverse le cytoplasme cellulaire de part en part, enveloppé par une membrane d'origine végétale. Il apparaît formé de mucilage dans lequel sont noyées les bactéries ; celles-ci sont parfois entourées d'une auréole claire vraisemblablement due à un artefact de fixation. Leur structure est difficile à préciser, car les images de cette région sont délicates à interpréter en raison de l'accumulation du mucilage qui gêne l'observation. Il semble cependant qu'elles contiennent, comme les cellules en culture libre, de nombreux granules d'acide β -polyhydroxybutyrate (VINCENT et coll., 1962) ;

- des bactéries entourées après leur libération dans le cytoplasme végétal, d'une cytomembrane de séquestration. Quelques cellules semblent encore se diviser (fig. 9), mais la plupart d'entre elles s'élargissent et passent de la forme coccoïde ou bacillaire courte (1 μ) à des formes plus allongées. Les grains d'acide β -polyhydroxybutyrate ont disparu, ce qui suppose des modifications importantes du métabolisme. L'ADN, très localisé en un à trois nucléoïdes, se disperse dans certaines cellules (fig. 10) ; le cytoplasme reste très riche en ribosomes ;

- des formes bactériennes anormales dont la taille est très supérieure à celle des cellules en culture libre (5 à 6 μ de long). Elles ont un aspect boursoufflé et

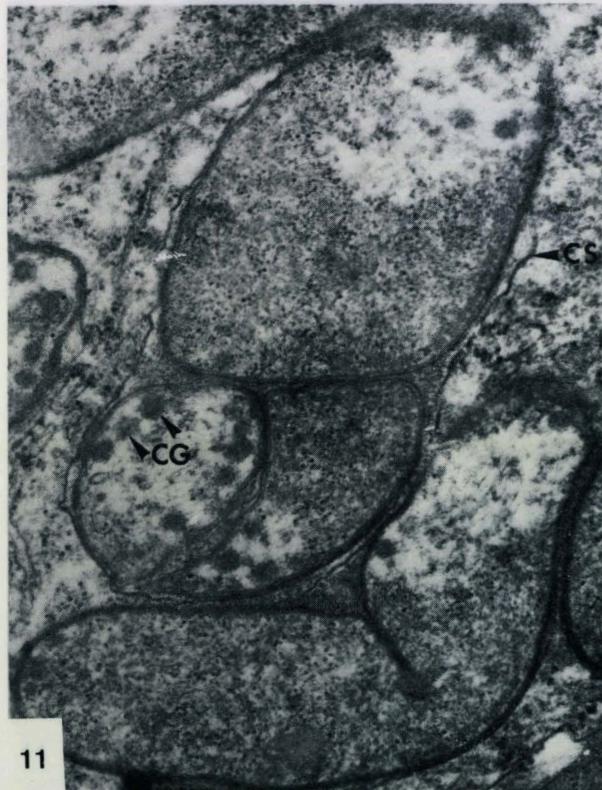
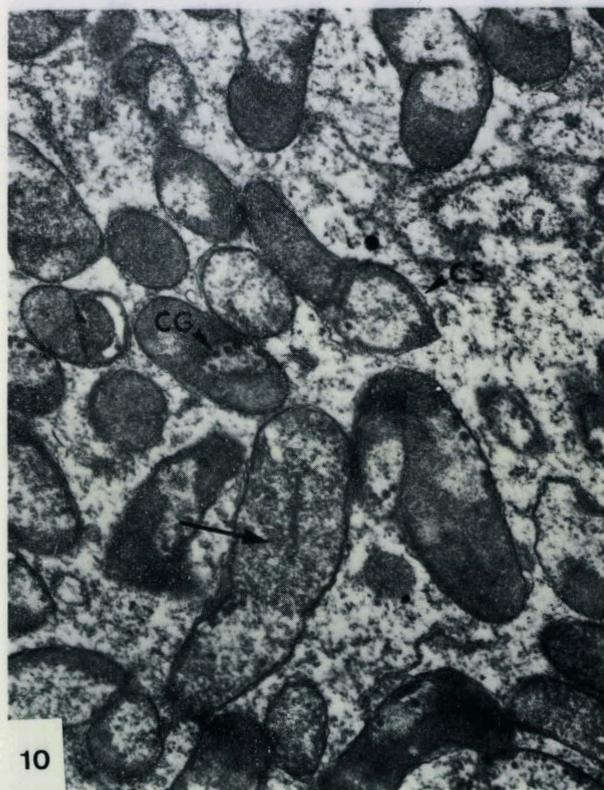
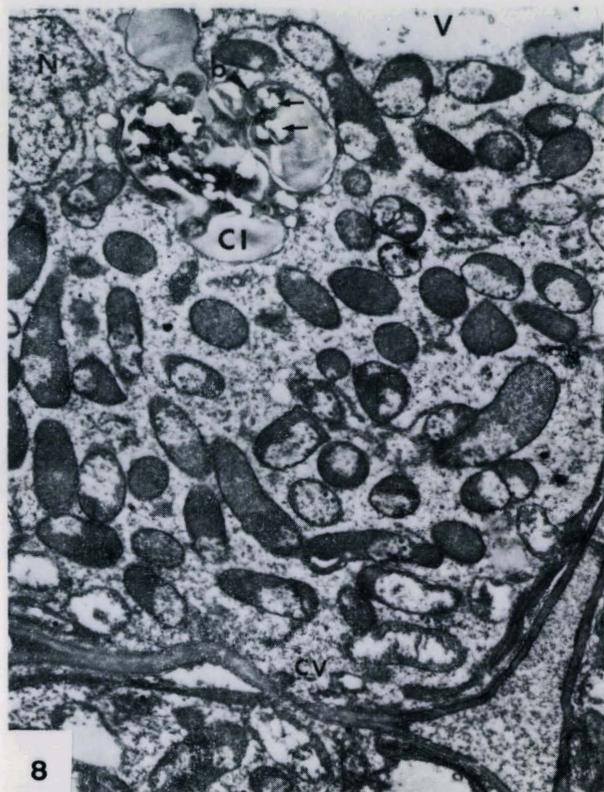


Fig. 8,9,10,11,12,14. Coloration au citrate de plomb. — Fig.13: Coloration à l'acide périodique + thio-semicarbazide + protéinate d'argent.



Planche I

Fig. 8 — Zone nodulaire II. Les bactéries (b) contenant des grains d'acide polyhydroxybutyrique (flèche) progressent dans le tissu nodulaire par l'intermédiaire d'un cordon infectieux mucilagineux (CI). Elles sont ensuite libérées dans le cytoplasme des cellules végétales (CV) ; N, noyau de la cellule végétale ; V, vacuole (G × 6 300).

Fig. 9 — Zone intermédiaire entre les zones II et III définies par Mosse. Les bactéries grossissent, certaines d'entre elles peuvent encore se diviser (flèche) ; MP, membrane pectocellulosique de la cellule végétale ; m, méat intercellulaire ; P, plasmodesme (G × 6 100).

Fig. 10, 11 — La forme générale des bactéries devient très tourmentée. Les cellules se recroquevillent dans l'espace limité par la cytomembrane de séquestration (CS). Présence de cellules à ADN dispersé (flèche) et de cellules contenant des corps granuleux (CG) (Fig. 3 : G × 14 400 ; Fig. 4 : G × 40 000).

recroquevillé (fig. 11). La coupe longitudinale donne des images très tourmentées avec présence de replis internes. Il apparaît alors des corps granuleux dont nous n'avons pu définir la nature et que nous supposons être des amas ribosomaux.

Dans la zone III définie par MOSSE (1964), on observe les cellules bactériennes totalement transformées en bactéroïdes. On y constate la présence de membranes internes, à la fois dans les plans de coupe longitudinaux et transversaux (fig. 14). Très courtes d'abord (fig. 12), ces structures se développent parallèlement à la membrane cytoplasmique bactérienne avec laquelle elles ne semblent pas avoir de contact. Elles peuvent se dédoubler plusieurs fois (fig. 13 et 14). Elles restent toujours à la périphérie de la cellule et en formations parallèles.

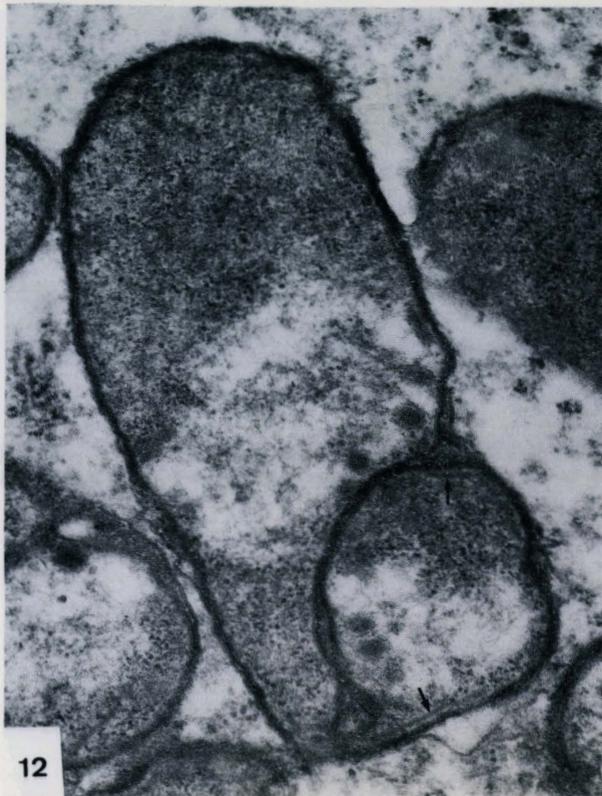
1.3. Discussion

Nos observations permettent de mettre en évidence que le processus de nodulation de la Luzerne par *R. meliloti* est commun à celui décrit pour les autres Légumineuses : on retrouve les différentes étapes de maturation du nodule décrites par MOSSE (1964). Par ailleurs, nous décrivons deux types de membranes surnuméraires dans les bactéroïdes observés :

- d'une part, des invaginations des structures extrêmes de la bactérie ;
- d'autre part, des membranes intracytoplasmiques parallèles à la membrane bactérienne.

Le premier type de structures n'est pas de même nature que le mésosome, puisque constitué à la fois de la paroi et de la membrane cellulaire. Il pourrait être le témoin, soit de divisions abortives, telles qu'on les rencontre chez les sphéroplastés d'*Escherichia coli* (GUILLAUME et coll., 1958) et provoquées par une inhibition de la synthèse de la paroi, soit d'un empêchement physique au développement de la cellule dont l'espace vital est limité étroitement par la membrane de séquestration d'origine végétale. Quelle que soit l'hypothèse envisagée, la paroi bactérienne est devenue plastique par un mécanisme inconnu.

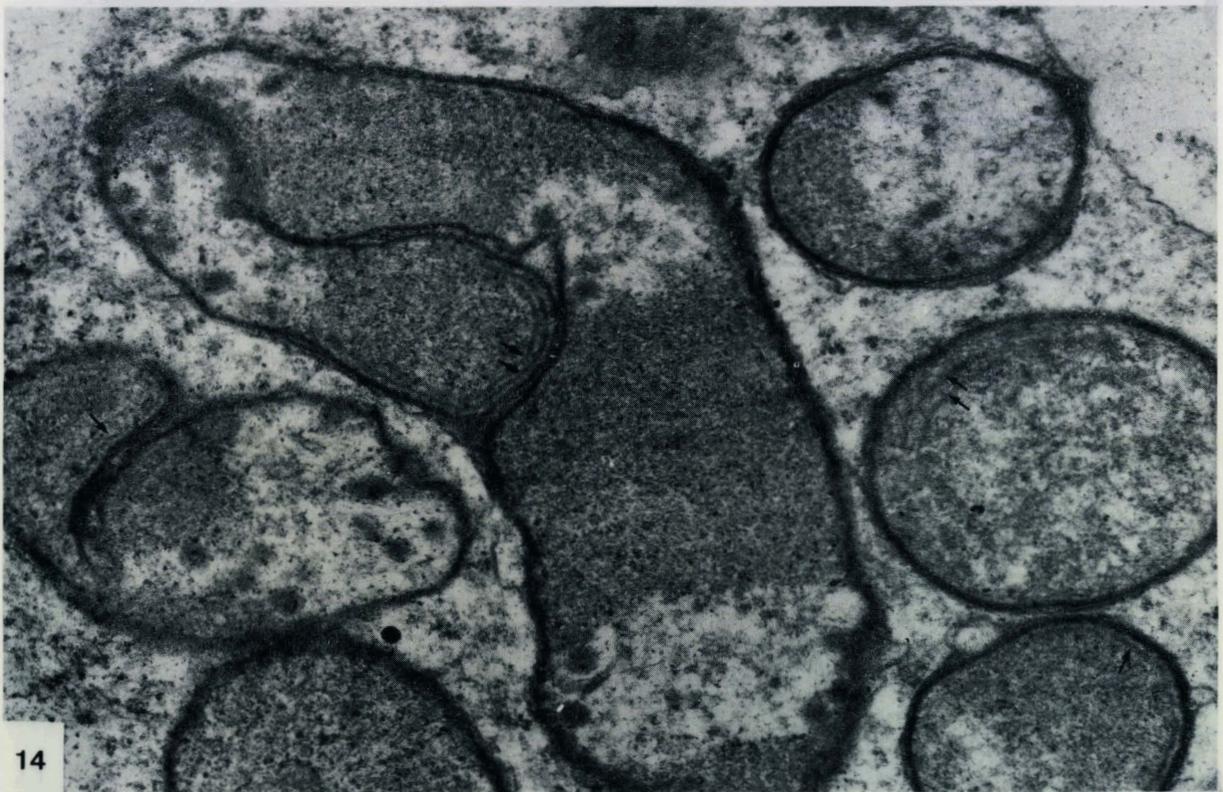
Nous avons obtenu au Laboratoire après mutagénèse à la N-méthyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine un mutant capable de développer *in vitro* une morphologie type bactéroïde dans des conditions de culture particulières : milieu à l'extrait de levure, enrichi en gluconate de potassium. Ce mutant a gardé ses propriétés symbiotiques, son contenu plasmidique ne semble pas modifié, ni la composition de ses structures pariétales (MROZ et coll., 1984a et 1984b). La plasticité de sa paroi est directement liée sans qu'on en connaisse le mécanisme à la composition du milieu sur lequel il se développe.



12



13



14

Planche II

- Fig. 12 — Zone nodulaire III dite zone « rouge ». Naissance de membranes internes (flèche) dans les bactéroïdes ($G \times 40\ 000$).
- Fig. 13 — Accentuation de la cytomembrane de séquestration (CS) par un artifice de coloration. Présence de membranes internes (flèche) se développant sur trois épaisseurs ($G \times 31\ 000$).
- Fig. 14 — Généralisation du développement des membranes internes surnuméraires (flèche) parallèlement aux structures externes des bactéroïdes ($G \times 40\ 000$).



Le second type de structures internes est présent dans la zone nodulaire III où s'accumule, entre la membrane de séquestration et la paroi, la leghémoglobine (TRUCHET, 1972). La présence dans cette région d'un système membranaire, différent de celui que nous décrivons pour *R. meliloti*, a été signalée par DART et MERCER (1963) dans les bactéroïdes des nodules de Trèfle (*Trifolium subterraneum*).

Pour la Luzerne, nous avons toujours rencontré un système de membranes linéaires se développant à la périphérie des bactéroïdes et situé dans le cytoplasme bactérien. Il est intéressant de noter que ce même type de formations a été observé chez d'autres micro-organismes unicellulaires. Il est signalé régulièrement chez les bactéries du méthane (DAVIES et WHITTENBURY, 1970 ; RIBBONS et coll., 1970 ; SMITH et RIBBONS, 1970), chez certaines bactéries photosynthétiques (TRÜPER, 1968 ; HUSSAIN QUADRI et HOARE, 1968) et chez les Algues bleues (WILDON et MERCER, 1963). Quoique ces espèces soient très différentes, elles possèdent un point commun : l'utilisation des gaz.

Or, notre système n'apparaît que dans la zone "rouge" du nodule et jamais dans les autres zones, ni dans les cellules en culture libre. On est alors en droit de penser qu'il représente peut-être le support d'une chaîne d'oxydations cellulaires particulière, adaptée à la fixation de l'azote atmosphérique.

1.4. Conclusion

Lors de l'infection de la plante, *Rhizobium* subit donc d'importantes modifications morphologiques dues d'une part à l'acquisition d'une certaine plasticité par la paroi et d'autre part à la mise en place de membranes surnuméraires lors de la maturation de la cellule bactérienne en bactéroïde.

Dans ces conditions, nous avons vu dans l'Introduction que *Rhizobium* subit aussi d'importantes modifications métaboliques dues :

- à une nouvelle alimentation carbonée fournie par la plante et alimentant son métabolisme énergétique et intermédiaire (Introduction : 3.3.2 et 3.3.3.) ;
- à une limitation de la pression partielle en oxygène par la leghémoglobine et obligeant ses chaînes d'oxydations cellulaires à fonctionner dans des conditions différentes (Introduction : 2.2.4.1) ;
- à la mise en place et au fonctionnement du complexe nitrogénasique modifiant sa nutrition azotée (Introduction : 2.2.1) et l'équilibre de ses besoins énergétiques (Introduction : 2.2.4.2).

Afin de pouvoir mieux comprendre l'importance de ces modifications lors de la symbiose, il est nécessaire de mieux connaître le métabolisme des cellules libres et en particulier leur nutrition carbonée, base du fonctionnement du métabolisme énergétique chez *Rhizobium*.

2. - LA VOIE DE L'ACIDE 2 CETO-GLUCONIQUE

2. - LA VOIE DE L'ACIDE 2 CETO-GLUCONIQUE

2.1. Mise en évidence d'une particularité métabolique chez *Rhizobium meliloti*

2.1.1. Croissance de la souche M5N1 de *Rhizobium meliloti*

Nous avons réalisé l'étude de l'utilisation de nombreux substrats énergétiques carbonés simples par des cellules placées en différentes conditions de croissance.

2.1.1.1. Sur milieu gélosé

En croissance sur milieu gélosé, *Rhizobium meliloti*, souche M5N1 isolée de nodules de luzerne au laboratoire, forme des colonies plus ou moins muqueuses en fonction de la nature de la source de carbone du milieu (tab. 6). Cet aspect est dû à l'excrétion d'exopolysaccharides par les cellules bactériennes (COURTOIS et coll., 1975).

Source de carbone amenant, en milieu solide, la formation de colonies			
Très peu muqueuses		Légèrement muqueuses	Très muqueuses
Amidon	Inositol	Galactose	Adonitol
Arabinose	Mannose	Lactose	Fructose
Cellobiose	Pyruvate	Maltose	Gluconate
Dulcitol	Raffinose	Saccharose	Mannitol
Glucose	Succinate		Ribose
Glutarate	Xylose		Sorbitol
Glycogène			

Tableau 6 - Aspects des colonies d'une souche de *Rhizobium meliloti* (M5N1) cultivée sur milieu RC solide additionné de différentes sources de carbone à raison de 10 g/l et incubé à 30°C durant 5 jours.

L'ensemble des substrats est classé en trois groupes en fonction de la production apparente de polysaccharides par les colonies. Il faut noter que le glucose que l'on retrouve comme constituant à 80 % de la structure primaire de ces biopolymères (COURTOIS et coll., 1975) n'en favorise pas leur accumulation.

2.1.1.2. Sur milieu liquide

On peut faire les mêmes observations à propos de la viscosité des milieux liquides liée à la production de polysaccharides. A titre d'exemple, nous rapportons dans le tableau 7 la croissance de notre souche en milieu RC liquide additionné de glucose, de galactose, de fructose ou de mannitol à raison de 10 g/l ; nous indiquons la valeur du pH lue en fin de croissance et la quantité de polysaccharides accumulée.

Temps de culture		Glucose	Galactose	Fructose	Mannitol
21 h 30 mn	DO	1,60	1,58	1,65	1,24
	DO	2,20	2,30	2,15	2,15
41 h 30 mn	DO	2,70	2,70	2,70	2,70
	DO				
165 h	Polysaccharides (µg/ml)	850	840	2 300	2 000
	pH	4,5	4,6	7,4	6,9

Tableau 7 - Culture de la souche M5N1 de R. meliloti sur milieu RC liquide additionné de substrats carbonés à raison de 10 g/l.

On constate que la densité des cellules est semblable quel que soit le substrat utilisé, par contre la quantité de polysaccharides accumulée varie ainsi que le pH. Lorsque le pH reste voisin de la neutralité, il s'accumule presque trois fois plus d'exopolysaccharides. Cette observation a été à la base d'une étude complète des conditions de synthèse des exopolysaccharides menée en collaboration avec B. COURTOIS et rapportée dans de nombreuses publications (COURTOIS et coll., 1975, 1979, 1982 a et b, 1983 ; HORNEZ et coll., 1976, 1982 ; THEODOROPOULOS, 1985).

2.1.2. Effets de la nature des substrats carbonés

2.1.2.1. Sur la modification du pH des milieux de culture

Cette modification du pH peut se faire de façon très variable à partir de substrats carbonés de structure très voisine (tab. 8).

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

Tableau 8 - Evolution du pH lors de la culture de Rhizobium meliloti (M5N1) sur milieu complet additionné de différentes sources de carbone à concentration de 1 %.

Ceci nous amène à classer les substances hydrocarbonées par rapport à la souche M5N1 en deux catégories :

- celles dont l'utilisation s'accompagne d'une forte baisse de pH et qui donnent en fin de manipulation des cultures denses et limpides ;
- celles dont l'utilisation s'accompagne d'un maintien du pH aux environs de la neutralité et qui donnent en fin de manipulation des cultures denses et de viscosité importante (tab. 8).

2.1.2.2. Sur le rendement moléculaire de croissance

Ces phénomènes ne modifient pas systématiquement le rendement moléculaire Y de croissance de la souche. (Rapport de la biomasse obtenue exprimée en g de matières sèches sur le nombre de moles de substrat énergétique consommé dans ces conditions) (tab. 9).

Substrat carboné	Poids sec de cellules en g/l	Substrat utilisé en mole/l	Rendement moléculaire obtenu = Y
Glucose	0,605	$1,44 \cdot 10^{-2}$	42
Fructose	0,638	$1,55 \cdot 10^{-2}$	41
Saccharose	0,230	$0,73 \cdot 10^{-2}$	31
Lactose	0,210	$0,694 \cdot 10^{-2}$	30
Galactose	0,372	$0,944 \cdot 10^{-2}$	39

Tableau 9 - Calcul du rendement moléculaire de croissance de Rhizobium meliloti (M5N1) à partir de différents substrats carbonés utilisés dans la préparation de milieu synthétique. Temps d'incubation : 40 h à 30°C.

On constate que la croissance de la souche est supérieure à partir des monosaccharides à celle obtenue à partir des dissacharides. Les rendements énergétiques du glucose, du fructose et du galactose sont très voisins et on peut penser qu'ils sont dégradés par la (ou les) même(s) voie(s) catabolique(s). Mais le galactose est utilisé à une vitesse moindre.

Cette identité, pour notre souche, des rendements moléculaires de croissance calculés à partir de l'utilisation du glucose ou du fructose nous a amené à étudier le phénomène d'acidification en absence de développement des cellules.

2.1.2.3. Sur la modification du pH des milieux de non prolifération

- Survie des cellules non proliférantes

Les cellules sont préparées par culture de la souche M5N1 sur milieu RC additionné de glucose à raison de 10 g/l, en agitation rotative, à 30°C durant 16 h. Ce temps d'incubation est choisi de façon à avoir dans ces conditions des cellules en fin de phase exponentielle de croissance. Centrifugées à 8 500 g durant 15 mn, elles sont lavées deux fois dans le TNP et remises en suspension dans ce même tampon de façon à obtenir une $DO_{620} = 10,0$. Conservées dans ces conditions à + 4°C, on peut contrôler régulièrement leur survie par numération à des temps variables (tab. 10).

Temps de stockage en heures	Nombre de germes viables par ml
0	98×10^8
7	98×10^8
29	97×10^8
53	1×10^{10}
100	11×10^9
200	11×10^9

Tableau 10 - Evolution de la viabilité des cellules de R. meliloti M5N1 conservées à $DO_{620} = 10,0$ dans le TNP à + 4°C.

(Les résultats des numérations sont des moyennes de trois manipulations).

Aucune lyse significative n'est observée durant plus d'une semaine de stockage. Avant leur utilisation, les cellules sont lavées dans le TNP et les suspensions sont diluées jusqu'à une concentration adéquate pour la manipulation.

Cette résistance particulière de R. meliloti comparée à la durée de survie limitée, dans ces conditions, de nombreux autres genres microbiens nous permet d'utiliser des lots de cellules vigoureusement identiques pour de nombreuses manipulations.

- Incubation en présence d'oses neutres

Nous avons suivi l'évolution du pH de suspensions cellulaires à $DO_{620} = 1,0$ sur le milieu de non prolifération soit en présence de glucose (10 g/l), soit de fructose dans la même concentration (tab. 11). Dans ces conditions, les cellules, incapables seules de réduire l'azote atmosphérique, respirent mais ne peuvent en aucun cas se diviser.

Temps d'incubation en heures	Glucose	Fructose
0	7,3	7,3
50	6,1	7,3
100	4,9	7,2
150	4,5	7,1
200	4,3	7,0

Tableau 11 - Evolution du pH lors de l'incubation de suspensions non proliférantes de R. meliloti M5N1 à 30°C en agitation rotative, à $DO_{620} = 1,0$ en présence de glucose ou de fructose à raison de 10 g/l.

On vérifie par ailleurs qu'il n'y a pas non plus lyse durant ces 200 h d'incubation :

- temps 0, sur glucose : $1,1 \times 10^9$ bactéries/ml ; sur fructose : $1,15 \times 10^9$ bactéries/ml ;
- temps 200 h, sur glucose : 1×10^9 bactéries/ml ; sur fructose : 1.10^9 bactéries/ml.

Que ce soit en suspension dense dans le TNP à + 4°C ou à concentration moyenne dans le MNP à + 30°C, la survie de *R. meliloti* est totale durant au moins 200 h.

En présence de fructose, le pH reste stable ; en présence de glucose il décroît régulièrement. Ce phénomène d'acidification est plus rapide en non prolifération qu'en culture : peut-être est-ce dû à la densité cellulaire au temps zéro plus importante dans le premier cas que dans l'autre.

Cette acidification n'est donc pas liée au développement microbien et à la multiplication cellulaire mais résulte de l'utilisation du glucose indépendamment de la source d'azote. Elle n'apparaît jamais en présence de fructose.

2.1.3. Extension à l'ensemble de l'espèce

Cette propriété métabolique particulière de notre souche M5N1 de *Rhizobium meliloti* a été comparée avec celle d'autres espèces de *Rhizobium* à croissance rapide (tab. 12) ou avec d'autres souches de la même espèce (tab. 13). Le modèle expérimental choisi est celui des bactéries non proliférantes en suspension dans des MNP additionnés de glucose ou de fructose.

Origine	Souche	Fructose		Glucose	
		pH	Polyosides µg/ml	pH	Polyosides µg/ml
<i>R. leguminosarum</i>					
UST (Lille I)	L2S	7,1	1 005	6,9	712
UST (Lille I)	L3S	7,2	961	7,1	263
UST (Lille I)	L4S	7,1	1 007	7,1	822
UST (Lille I)	L21S	7,2	726	7,2	472
<i>R. phaseoli</i>					
UST (Lille I)	P2S	7,15	368	7,1	459
UST (Lille I)	P7S	7,0	257	7,0	558
UST (Lille I)	P11S	7,0	460	7,0	1 012
UST (Lille I)	P12S	7,1	641	7,0	642
<i>R. trifolii</i>					
UST (Lille I)	T5S	7,0	467	6,9	721
UST (Lille I)	T7S	7,1	310	7,0	862
UST (Lille I)	T27S	7,0	720	7,0	365
UST (Lille I)	T35S	7,0	842	7,0	744

Incubation pendant 100 h à 30° C.

Tableau 12 - Acidification et production d'exopolyosides par 12 souches de *Rhizobium* à croissance rapide, placées en conditions de non prolifération, en présence de fructose ou de glucose.

Origine	Souche	Fructose		Glucose	
		pH	Polyosides µg/ml	pH	Polyosides µg/ml
J. Dénarié (Versailles)	2011 D	7,3	402	5,8	102
Hollande (Kampen)	A 145	7,1	410	6,0	219
Tunisie	Tu 20	7,1	310	5,8	84
F. Pichinoty, CIAT	44	7,3	262	5,9	50
CSIRO	Su 47	7,2	322	4,8	103
Hollande (Kampen)	A 161	7,0	249	5,6	116
France (Dijon)	Fm 1	7,3	276	3,6	83
UST (Lille I)	M5S	7,2	320	5,9	47
UST (Lille I)	M11S	7,0	310	3,1	44
UST (Lille I)	M13S	6,9	312	4,2	27
UST (Lille I)	M14S	7,0	225	5,8	37
F. Pichinoty, CIAT	21 (*)	5,1	155	5,1	101
RIO (Canada)	12	7,3	405	6,0	250
Belgique (Gembloux)	M1-5 (*)	5,2	175	5,2	50
F. Pichinoty, RCR	2001	6,9	204	5,1	90
F. Pichinoty, RCR	2003	7,0	102	4,7	20
F. Pichinoty, RCR	2004	7,2	172	6,0	30
UWA	Wu 498	6,9	126	4,8	60
UWA	Wu 499	7,2	266	5,8	122
Tunisie	Ar 16	7,0	850	5,5	320
RCR	2011 S ₂	6,9	780	5,7	350
RCR	2011 R	7,3	387	5,7	91
M. Obaton (Dijon)	Ve 26 (*)	5,0	180	5,0	50
UST (Lille I)	M3S	7,0	451	4,8	302
UST (Lille I)	M5N1	7,0	950	4,7	198
UST (Lille I)	M17S	7,1	498	4,5	153
UST (Lille I)	M20S	7,0	1 010	4,6	309

Incubation pendant 100 h à 30° C.

(*) Ces souches n'ont pas le profil d'acidification des souches types.

Tableau 13 - Acidification et production d'exopolyosides par 27 souches de R. meliloti placées en conditions de non prolifération en présence de glucose ou de fructose.

Les propriétés métaboliques observées sur la souche M5N1 de *Rhizobium meliloti* ne se retrouvent pas sur les autres espèces à croissance rapide mais pratiquement sur la totalité des souches de la même espèce. Cette propriété d'acidification en présence de glucose devient un critère utilisable pour la classification de toutes les souches représentantes du groupe d'inoculation de la luzerne : *Rhizobium meliloti*.

2.2. La voie acidifiante : identification et fonctionnement

2.2.1. Identification du ou des produits acides

Nous avons remarqué que le pH descend plus rapidement dans les systèmes cellulaires non proliférants comparés aux cultures sur milieu complet. La libération de produits acides y est donc plus rapide, vraisemblablement à cause de la densité importante de cellules dès le début d'incubation. Nous choisissons donc ce modèle expérimental pour fabriquer en quantité importante les acides issus de la dégradation du glucose.

2.2.1.1. Préparation et purification de la fraction acide

L'incubation à 30°C de **Rhizobium meliloti**, cultivé préalablement sur milieu RC plus glucose et remis en suspension à la concentration de 3.10^9 bactéries/ml dans un tampon de non prolifération additionné de 10 g/l de glucose, permet après 116 h d'agitation d'atteindre un pH d'une valeur de 3,9.

Les cellules bactériennes sont alors éliminées par centrifugation et le surnageant limpide contient alors en solution :

- les composants du tampon de non prolifération (KH_2PO_4 et $MgSO_4 \cdot 7H_2O$),
- le polysaccharide synthétisé aux dépens de la source de carbone en début d'incubation avant que le pH ne devienne trop bas,
- le glucose en excès,
- les produits de catabolisme dont la fraction acide.

La purification de la fraction acide a été réalisée par élimination du polysaccharide (relargage par l'éthanol en présence d'acétate de sodium) et des sels de phosphore et de magnésium (précipitation sous la forme de phosphates ammoniacaux magnésiens). Nous avons vérifié que ces traitements n'entraînaient pas de perte de produits acides (HORNEZ, 1976).

Nous obtenons finalement une solution purifiée ne contenant plus que le glucose en excès et les produits de catabolisme.

2.2.1.2. Identification de la fraction acide

L'emploi des techniques de séparation électrophorétique et chromatographique des composés de cette solution montre qu'elle ne contient qu'un seul produit acide dont le comportement comparé à de nombreux acides organiques du métabolisme intermédiaire est identique à celui des acides α -cétoniques et en particulier celui de l'acide 2 céto-gluconique (tab. 14 et 15).

Tampons de migration			
Substrats	. Pyridine . Acide acétique . Eau pH 3,9 - 15 h	. Borate de sodium . Chlorure de calcium . Eau pH 9,2 - 7,5 h	. Véronal de sodium . EDTA sodique . Eau pH 8,6 - 6 h
Pyruvique	1	-	-
2 céto-gluconique	0,66	0,82	1
5 céto-gluconique	0,60	1	0,97
Glucose	0,28	0,43	0,48
Fraction acide	0,66	0,82	1

Tableau 14 - Valeurs relatives des coefficients de migration calculés pour chaque système de séparation électrophorétique (400 volts, temps variable) en fonction du substrat le plus mobile dans le système.

Systèmes solvants					
Substrats	1 Butanol Acide acétique Eau 4/1/5 v/v	2 Butanol Acide formique Eau 7/3/12 v/v	3 Propanol Méthyl benzoate Acide formique Eau 7/3/2/5 v/v	4 Ethanol Ammoniaque Eau 80/5/15 v/v	
2 céto-gluconique	0,28	0,49	0,77	0,64	
5 céto-gluconique	1	1	1	0,5 (trainée)	
Glucose	0,70	0,34	-	1	
Fraction acide	0,28	0,49	0,78	0,64	

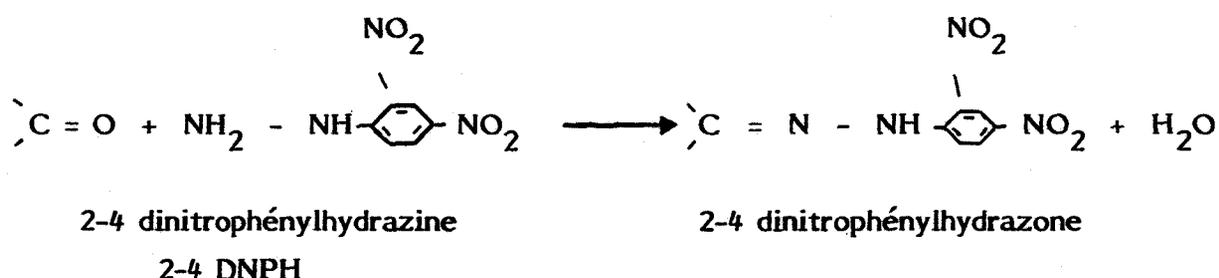


Tableau 15 - Valeurs relatives des coefficients de migration de différents substrats lors de leur chromatographie de partage, descendante, sur papier (1-2-3) ou de leur chromatographie d'adsorption, ascendante, sur couche mince (4). Les temps de migration sont respectivement de 15,5 h, 17 h, 15 h et 4,5 h.

La solution purifiée est alors traitée en électrophorèse préparative et la bande de papier correspondant à la fraction acide est éluée par l'eau distillée et concentrée par évaporation sous vide. A partir de cette fraction, nous avons pu réaliser :

- la formation de dérivés 2-4 dinitrophénylhydrazones.

Pour éviter l'oxydation éventuelle à chaud des α -hydroxycétones, nous avons utilisé la méthode de condensation à froid décrite pour l'identification des acides α -cétoniques dans les liquides biologiques.



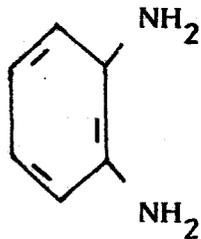
L'application de cette technique à de nombreux acides organiques α -cétoniques du métabolisme intermédiaire et la détermination de leur coefficient de migration en chromatographie de partage (solvant Butanol, Ethanol, Ammoniaque 0,5N, 7/1/2, v/v) nous ont permis d'identifier notre fraction à l'acide 2 céto-gluconique (tab. 16).

2-4 dinitrophénylhydrazones dérivées de	R _F .
Acide pyruvique	0,50
Acide α -céto-glutarique	0,11
Glucose	0,57
Acide 2 céto-gluconique	0,25
Fraction acide	0,26
2-4 DNPH (2 spots)	1 et 0,89

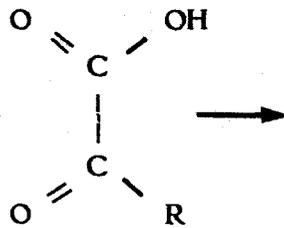
Tableau 16 - Valeur des coefficients de migration (RF) des dérivés 2-4 dinitrophénylhydrazones (2-4 dinitrophénylhydrazine = 1) en chromatographie de partage sur papier par un solvant Butanol/Ethanol/Ammoniaque 0,5N 7/1/2, v/v.

- la formation de dérivés quinoxalinols.

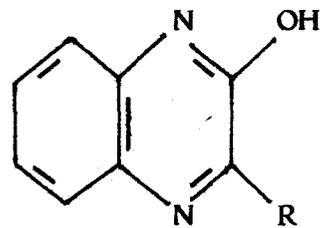
Les avantages de ces dérivés par rapport à ceux des 2-4 dinitrophénylhydrazones sont leur plus haute spécificité pour la fonction α -cétonique des acides carboxyliques et leur stabilité plus importante.



ortho-phénylène
diamine



acide α
cétonique
(Acide 2 céto-gluconique)



2 hydroxyquinoxaline
= quinoxalinol
(2 hydroxy, 3 tétrahydroxybutylquinoxaline)

Nous avons réalisé la condensation à la fois sur un échantillon d'acide 2 céto-gluconique commercial et sur notre fraction acide purifiée. La densité optique des solutions obtenues est lue à 330 nm et à 360 nm (tab. 17). En effet, selon LANNING et COHEN (1951), le rapport de la densité optique lue à 330nm et de celle lue à 360 nm est de $1,51 \pm 0,07$ pour les solutions contenant des acides 2 céto-gluconiques.

Densité optique	Dérivés quinoxalinols de	
	acide 2 céto-gluconique témoin	fraction acide purifiée
DO 330	0,425	0,557
DO 360	0,295	0,380
$\frac{DO\ 330}{DO\ 360}$	1,44	1,465

Tableau 17 - Densités optiques à 330 nm et à 360 nm des dérivés de condensation de l'orthophénylène diamine avec l'acide 2 céto-gluconique commercial (témoin) et avec la fraction acide purifiée.

Les rapports d'absorbance correspondent dans chacun des cas à la fourchette $1,51 \pm 0,07$ annoncée par LANNING et COHEN (1951). Notre fraction acide est donc un représentant des acides α -céto-hexoniques.

- l'étude en spectroscopie infra-rouge.

L'obtention des spectres infra-rouges est réalisée sur cellule IRTRAN (fig. 15).

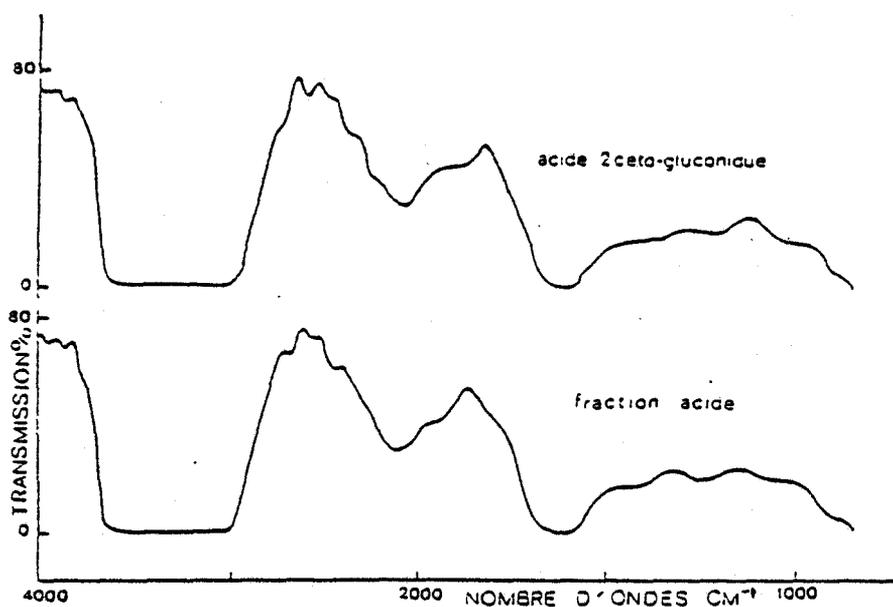


Figure 15 - Spectre infra-rouge d'une solution témoin d'acide 2 céto-gluconique et de la fraction acide purifiée s'accumulant lors de la culture de Rhizobium meliloti en présence de glucose.

La comparaison des spectres obtenus identifie sans équivoque l'acide qui s'accumule lors de l'incubation de cellules de *R. meliloti* en présence de glucose à l'acide 2 céto-gluconique.

2.2.2. Identification des enzymes de la voie du 2 céto-gluconique

A partir de l'hypothèse où l'oxydation du glucose en acide 2 céto-gluconique passe par l'intermédiaire de l'acide gluconique, nous avons recherché l'existence d'activités enzymatiques capables de catalyser la voie métabolique suivante :



avons abandonné la phénazine méthosulfate du fait de son instabilité à la lumière et lui avons préféré le dichlorophénolindophénol (DIP) dont la réduction est lue par la modification d'absorbance à 600 nm.

2.2.2.2. Localisation cellulaire des activités

Nous avons voulu savoir si les activités glucose déshydrogénase et gluconate déshydrogénase étaient cytoplasmiques ou membranaires. Pour cela, nous avons traité les cellules bactériennes par les ultra-sons comme il est décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes (7.1.2.1.). Le gel est récupéré après la seconde centrifugation à 85 000 g. Son observation au microscope électronique après fixation et inclusion permet d'observer qu'il est constitué exclusivement de membranes bactériennes non vésiculées (à cause de la présence de la paroi) avec absence totale de cellules entières.

Dans ces conditions, on constate d'une part qu'il n'y a pas d'activité dans la fraction cytoplasmique soluble, d'autre part qu'il existe une forte activité dans les préparations membranaires (activité spécifique de l'ordre de 50 fois supérieure à celles mesurées sur les broyats cellulaires à l'alumine).

Les produits formés par l'action d'extraits membranaires sur du glucose ^{14}C ($0,5 \mu\text{Ci}$) ont été séparés par électrophorèse sur papier (tampon pyridine/acide acétique/eau, 3/10/400, v/v, pH 3,9, 400 V, 8 h) et révélés par comptage en scintillation liquide de bandes découpées sur l'électrophorégramme (fig. 16). La comparaison des pics observés par cette méthode aux témoins révélés chimiquement permet l'identification des produits d'oxydation du glucose par les débris membranaires, à l'acide gluconique et à l'acide 2 céto-gluconique.

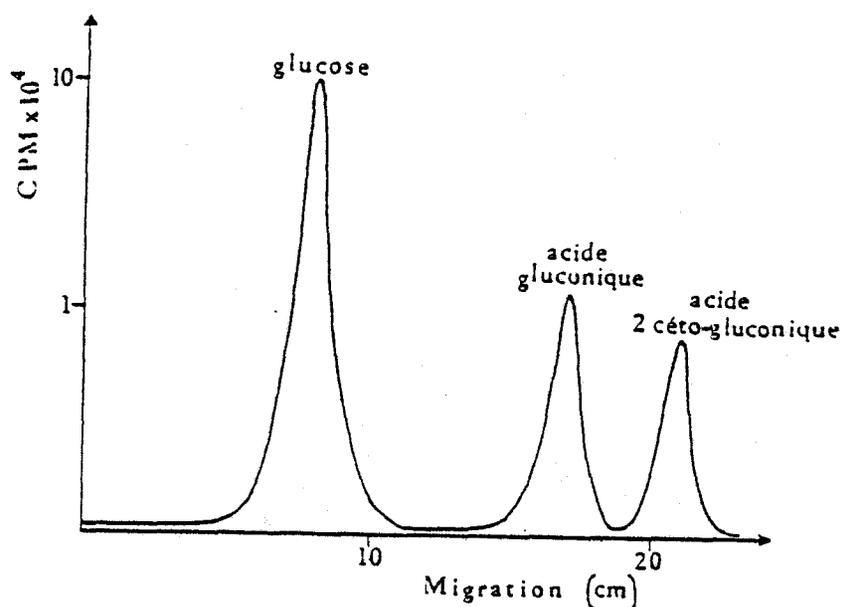


Figure 16 - Etude des produits de dégradation du glucose pour des extraits membranaires de Rhizobium meliloti.

Les activités déshydrogénases mises en évidence sur les extraits membranaires sont bien celles de la glucose déshydrogénase et de la gluconate déshydrogénase. Il n'est pas possible ici de les localiser sur la face interne ou la face externe de la membrane cytoplasmique.

2.2.3. Propriétés des enzymes participant à la voie du 2 céto-gluconique

Nous avons déterminé les paramètres physico-chimiques du fonctionnement des enzymes participants, leur spécificité et abordé les problèmes liés à la régulation de leur synthèse.

2.2.3.1. pHmax et constantes cinétiques

- Détermination du pH d'activité maximum

Initialement, nous avons mis en évidence les activités déshydrogénases par l'utilisation de NAD(P)^+ et ceci d'autant plus facilement que le pH était élevé. Ces observations sont contradictoires avec le fait que l'acide 2 céto-gluconique s'accumule aussi bien en culture qu'en non prolifération jusqu'à des pH très bas. En fait, les extraits membranaires contiennent une NADH déshydrogénase dont l'activité cesse à partir de pH 7,5. Nous avons ainsi été amené à explorer une large plage de pH par la recherche du pHmax de chacune des déshydrogénase (fig. 17).

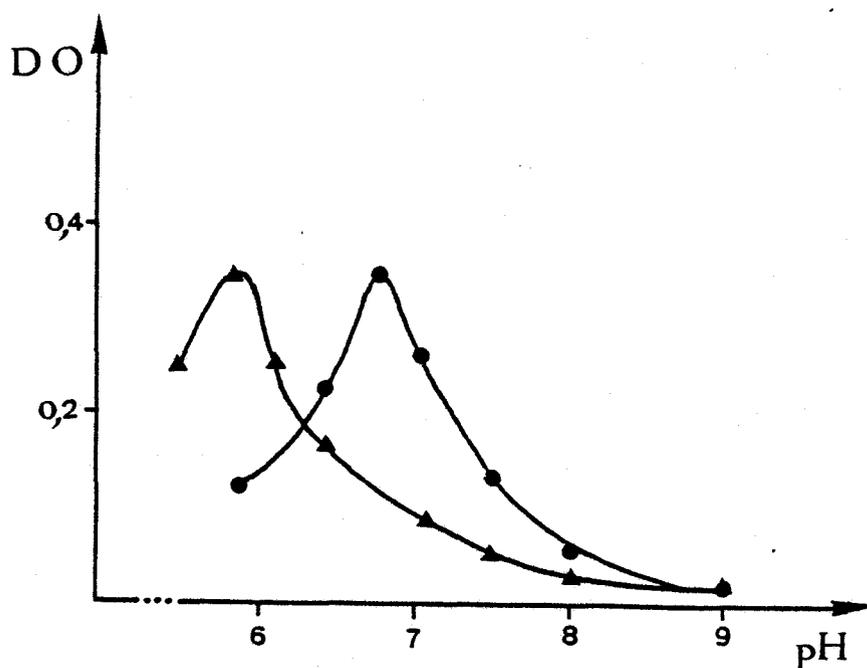


Figure 17 - Activité de la glucose déshydrogénase (●—●) et de la gluconate déshydrogénase (▲—▲) en fonction du pH (réduction du DIP lue à DO 600).

5	pH	5,9	Tampon Malate/NaOH
5,9	pH	7	Tampon Véronal/Acide acétique
7	pH	8,9	Tampon Glycine/NaOH

- Mesure des constantes cinétiques

Les vitesses initiales de transformation du glucose ou du gluconate dépendent de leur concentration selon une relation de Michaelis. Les enzymes sont donc saturables, nous en avons défini les constantes d'affinité (fig. 18).

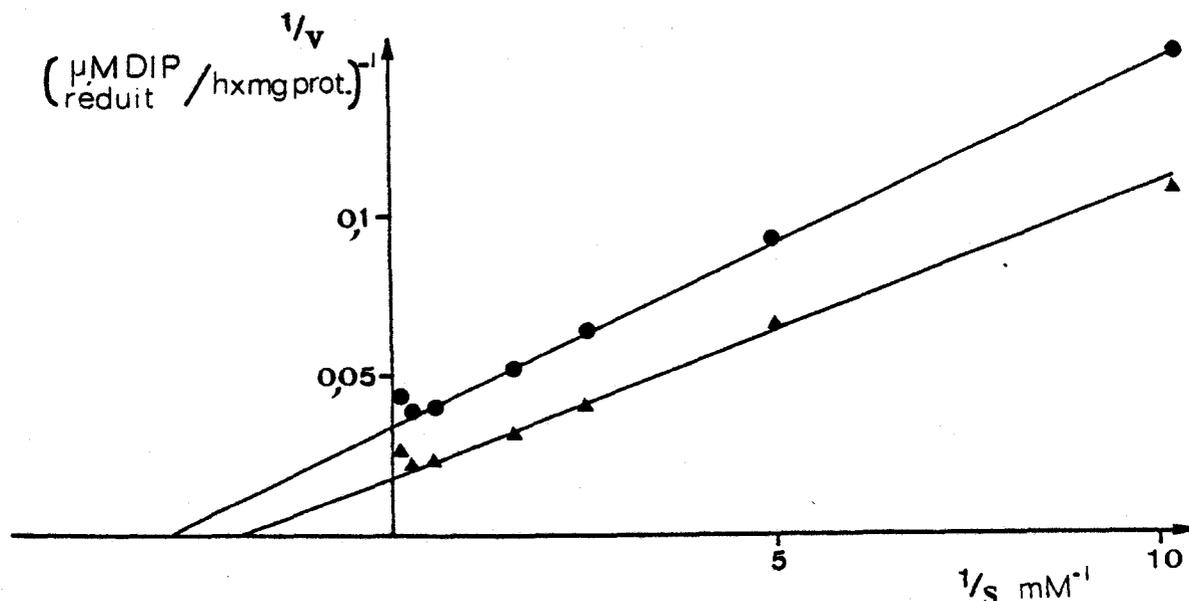


Figure 18 - Représentation selon LINEWEAVER-BURK de la variation des V_i de réduction de DIP en fonction de la concentration en glucose (●—●) ou en gluconate (▲—▲).

La lecture graphique de l'ensemble de chacun des résultats permet de calculer le K_m et la V_{max} pour chaque enzyme :

- glucose déshydrogénase : $K_m = 350 \mu\text{M}$; $V_{max} = 30 \mu\text{moles}$ de glucose transformés par h et par mg de protéine, soit 500 nmoles par min ;
- gluconate déshydrogénase : $K_m = 540 \mu\text{M}$; $V_{max} = 20 \mu\text{moles}$ de gluconate transformés par h et par mg de protéines, soit 333 nmoles par min.

- Bilan des caractéristiques physico-chimiques

Nous avons regroupé dans le tableau 18 les caractéristiques principales des deux déshydrogénases.

	Glucose déshydrogénase	Gluconate déshydrogénase
Nature du coenzyme	NAD ⁺ ou NADP ⁺ .	NADP ⁺ .
pH max.	6,6	5,8
Constante de dissociation apparente (Km)	350 µM	540 µM
Vitesse maximale d'activité	500 nmoles de substrat dégradé x mn ⁻¹ x mg protéines ⁻¹	333 nmoles de substrat dégradé x mn ⁻¹ x mg protéines ⁻¹ .
Activateurs ioniques	Mg, Mn, Zn 100 µM	Mg 1 mM Mn 100 µM

Tableau 18 - Propriétés physico-chimiques des enzymes de la voie du 2 céto-gluconique chez Rhizobium meliloti.

2.2.3.2. Spécificité

Nous avons montré précédemment que l'utilisation d'hexoses autre que le glucose dans les milieux d'incubation pouvait entraîner leur acidification. Nous avons voulu voir si ces substrats pouvaient être pris en charge par les mêmes enzymes cataboliques (tab. 19). On constate que l'activité de la glucose déshydrogénase s'exprime aussi sur le mannose ou le galactose. Nous avons ainsi étudié à titre d'exemple les interactions existant entre le glucose et le galactose et à titre de témoin entre le glucose et le fructose (fig. 19).

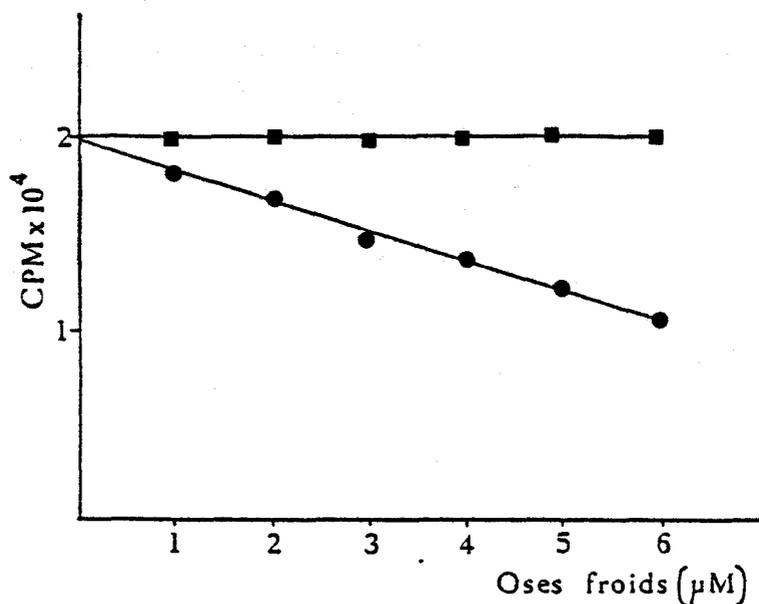


Figure 19 - Oxydation du glucose par des extraits membranaires de Rhizobium meliloti en présence de quantités variables d'oses froids (●—● galactose, ■—■ fructose).

Dans cette manipulation on utilise le glucose U^{14}C ($0,5 \mu\text{Ci}$) et son oxydation est appréciée par comptage en scintillation liquide des produits d'oxydation préalablement séparés par électrophorèse. On constate que le galactose ("ose acidifiant") modifie l'activité de la déshydrogénase vis-à-vis du glucose alors que le fructose ("ose non acidifiant") ne la modifie pas.

Nous avons cherché le type de cette interaction glucose-galactose en étudiant la variation du K_m et de la V_{max} de la glucose déshydrogénase en présence de quantités croissantes de galactose : il s'agit d'une inhibition compétitive ($K_i = 17,5 \text{ mM}$).

2.2.3.3. Régulation de leur synthèse

Nous avons recherché et dosé les activités déshydrogénases sur des extraits membranaires de cellules cultivées sur des substrats différents (tab. 19).

Substrats de culture	Activité de la glucose déshydrogénase mesurée sur		
	glucose	galactose	mannose
Glucose	833	800	733
Galactose	816	750	716
Mannose	750	766	783
Fructose	0	0	0
Mannitol	0	0	0
Sorbitol	0		0
Glycérol	750	716	733

Tableau 19 - Mesure de l'activité glucose déshydrogénase, évaluée sur glucose, galactose, mannose et exprimée en nmoles de DIP réduit/mn x mg protéines, sur des extraits membranaires de cellules cultivées préalablement sur des substrats carbonés différents.

On constate que la glucose déshydrogénase est soit induite par différents substrats carbonés "acidifiants", soit réprimée par le fructose, le mannitol ou le sorbitol.

Si nous n'avons pu, faute de mutants métaboliques, démontrer de façon certaine que la synthèse des enzymes était régie par un mécanisme d'induction, nous avons pu néanmoins démontrer que nous n'étions pas en présence d'un phénomène de répression. En effet, la culture de la souche en présence de glucose et de fructose montre l'utilisation conjointe des deux substrats, sans diauxie, et nous avons toujours pu mettre en évidence sur les débris membranaires obtenus à partir des cellules prélevées à différents moments de la croissance les deux activités glucose déshydrogénase et gluconate déshydrogénase.

2.3. La physiologie de la production d'acide 2 céto-gluconique

Nous avons remarqué que l'importance de l'acidification des milieux d'incubation, due exclusivement à partir du glucose à l'accumulation de l'acide 2 céto-gluconique, est variable en fonction de plusieurs paramètres.

2.3.1. En fonction du pH initial des milieux d'incubation

L'accumulation de l'acide 2 céto-gluconique dans les milieux tamponnés au départ aux environs de la neutralité a pour conséquence une acidification des milieux. On peut se demander si ce phénomène ne favorise pas la formation de l'acide 2 céto-gluconique aux dépens d'autres voies de catabolisme. Nous avons donc utilisé un système de non prolifération, ajusté aux pH 3,5 - 4 - 5 - 6 - 7 et additionné de glucose à raison de 10 g/l. On y suspend des cellules de *Rhizobium meliloti* jusqu'à absorbance de 1 à 620 nm. Le dosage de l'acide 2 céto-gluconique se fait par la méthode de BRISOU avec correction de l'interférence du glucose dosé dans chaque échantillon par la glucose-oxydase (fig. 20).

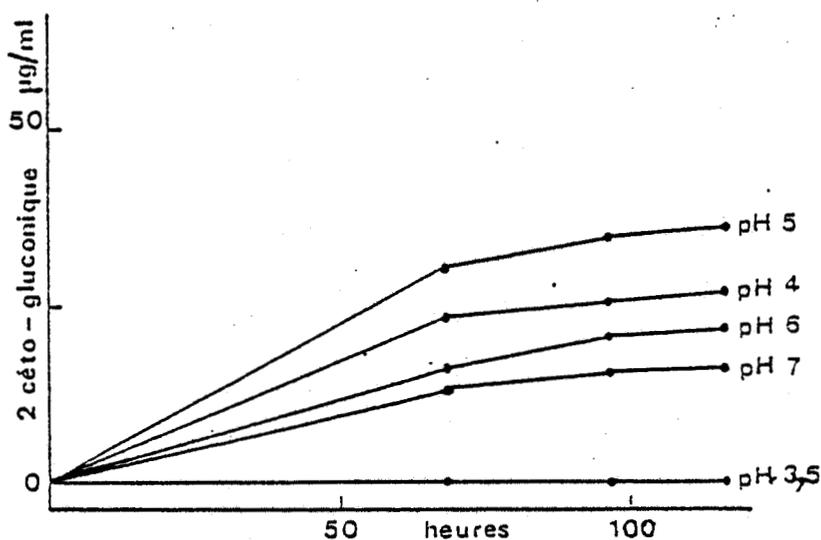


Figure 20 - Accumulation d'acide 2 céto-gluconique par *Rhizobium meliloti* en suspension dans des milieux de non prolifération additionnés de glucose à 1 % et dont le pH initial est variable.

On constate que jusqu'à pH 5 l'accumulation de l'acide 2 céto-gluconique s'intensifie. Ceci peut s'expliquer par les valeurs de pH d'activité maximale des glucose et gluconate déshydrogénases précédemment décrites. Au delà, l'activité cellulaire décroît jusqu'à s'annuler totalement à pH 3,5.

2.3.2. En fonction de la concentration initiale en glucose

2.3.2.1. Conditions de croissance

La concentration en glucides des milieux de culture pour *Rhizobium* est habituellement de 10 g/l. Si en fonction du temps, on observe d'une part, la

croissance de la souche sur milieu RHB₁ additionné de glucose (10 g/l) et d'autre part, la disparition de ce substrat du milieu (fig. 21), on s'aperçoit qu'il reste en fin de phase exponentielle de croissance 73 % du substrat énergétique initial.

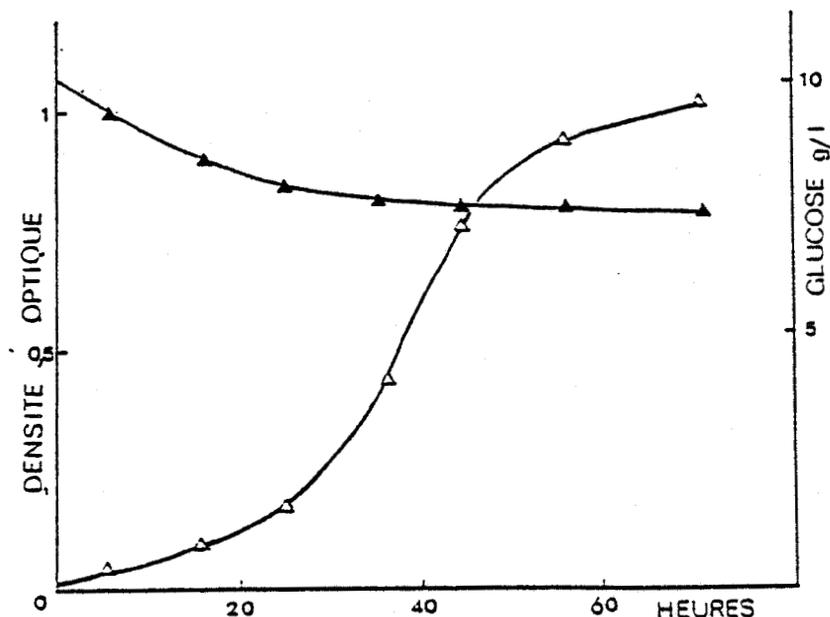


Figure 21 - Croissance de *R. meliloti* exprimée en densité optique mesurée à 620 nm sur milieu RHB₁ additionné de glucose à raison de 10 g/l (\triangle). Evolution de la concentration en glucose au cours du temps (\blacktriangle).

Nous avons alors suivi l'évolution de la croissance de la souche sur milieu RHB₁ additionné de différentes quantités de glucose comprises entre 0,5 et 10 g/l et la variation du pH de ces milieux lors de leur incubation à 30°C durant 91 h (tab. 20).

Temps en (h)	Glucose (g/l)													
	0,5		1		2		4		6		8		10	
	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,02	7,25	0,02	7,25	0,02	7,25	0,02	7,25	0,02	7,25	0,02	7,25	0,02	7,25
20	0,15	6,77	0,16	7	0,24	6,8	0,17	6,8	0,24	6,7	0,28	6,55	0,27	6,5
44	0,30	6,5	0,32	6,6	0,47	6,5	0,41	6,35	0,44	6,1	0,45	5,5	0,47	5,4
74	0,33	6,2	0,44	5,9	0,55	5,65	0,42	5,35	0,46	5,4	0,45	5,3	0,46	5,3
91	0,41	6,2	0,47	5,4	0,57	5,6	0,47	5,1	0,46	5,4	0,45	5,05	0,46	5,3

Tableau 20 - Contrôle de la croissance de *R. meliloti* en milieu RHB₁ par mesure de la densité optique à 620 nm des suspensions cellulaires et contrôle de l'évolution du pH en fonction de la concentration en glucose des milieux de culture (1 unité de DO = $1,2 \cdot 10^7$ bactéries/ml).

Quelle que soit la concentration en glucose, nous constatons :

- d'une part, qu'au delà de 2 g/l la croissance est pratiquement identique ;
- d'autre part, que le pH baisse dans tous les cas, qu'il diminue d'autant plus rapidement que la concentration en glucose est élevée pour atteindre généralement en fin d'incubation des valeurs comprises entre 5 et 5,5.

Dans ces conditions, l'étude du spectre infra-rouge de la fraction acide purifiée nous a permis de confirmer que l'acidification est bien due à l'accumulation d'acide 2 céto-gluconique.

2.3.2.2. Conditions de non prolifération

Nous avons étudié la disparition du glucose dans les milieux d'incubation contenant des concentrations d'oses de l'ordre de celles employées lors de la respiration en Warburg (312). Nous avons dosé en même temps l'acide 2 céto-gluconique dans les milieux réactionnels. Les résultats obtenus lors d'incubation à 30°C sous agitation moyenne sont rapportés dans la figure 22.

Pour les concentrations faibles de 0 à 166 µg/ml, le glucose disparaît totalement en 48 heures d'incubation. Par contre, pour les concentrations supérieures, il reste mal utilisé au-delà de ce même temps.

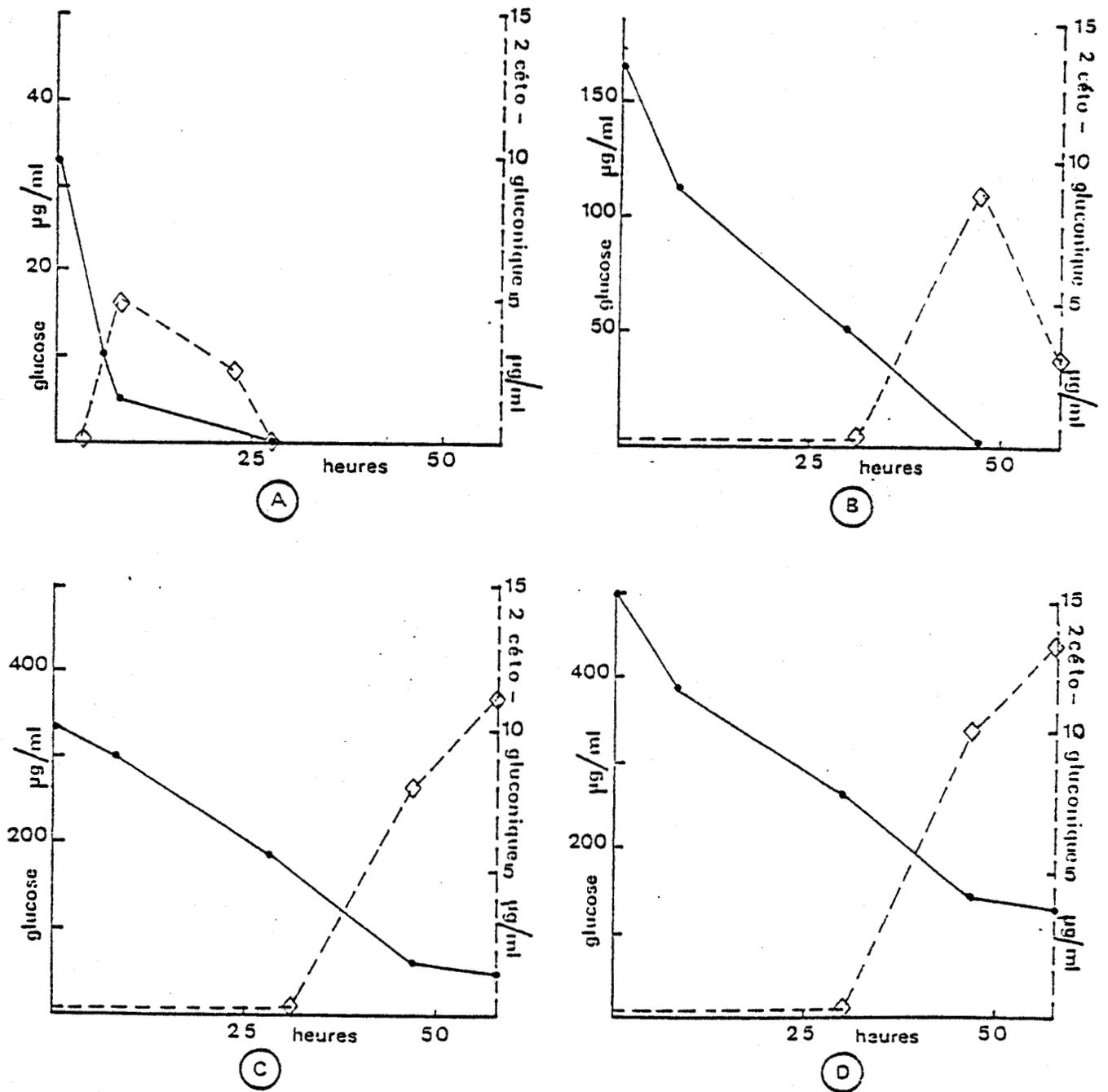
L'acide 2 céto-gluconique apparaît dans chacun des cas à des temps différents. Mais alors qu'il disparaît ensuite pour les faibles concentrations, il s'accumule dans les autres cas.

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

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

2.3.3. En fonction du transfert en oxygène dans les milieux d'incubation

Les microorganismes n'étant capables que de consommer l'oxygène dissous dans la phase aqueuse du milieu qui les environne, leur activité cellulaire va être directement fonction de la disponibilité de l'oxygène, donc de sa vitesse de renouvellement au fur et à mesure de sa consommation dans les milieux d'incubation. La mesure du KLa, coefficient de transfert en oxygène, d'un bioréacteur permet d'évaluer ses capacités de transférer l'oxygène gazeux à la masse liquide.



BU
LILLE

Figure 22 - Courbes de disparition du glucose (en trait plein, échelle variable) et d'apparition de l'acide 2 cétogluconique (en pointillé) lors de l'incubation de *Rhizobium meliloti* ($DO_{620} = 1,0$) en présence de différentes concentrations initiales de glucose.
A 33 µg/ml - B 166 µg/ml - C 333 µg/ml - D 500 µg/ml.

Nous avons montré qu'une suspension de **R. meliloti**, placée dans des conditions de non prolifération en milieu glucosé, accumule, comme en croissance, de l'acide 2 céto-gluconique. Nous avons choisi ce système pour étudier cette production dans des conditions d'oxygénation différentes des milieux d'incubation ($15 \text{ h}^{-1} \leq \text{KLa} \leq 60 \text{ h}^{-1}$).

Les résultats sont rapportés dans le tableau 21.

KLa	60	45	37,5	30	22	15
Acide 2 céto-gluconique	0	2	50	350	0	0

Tableau 21 - Quantités d'acide 2 céto-gluconique produit ($\mu\text{g/ml}$) en bioréacteur par une suspension de **R. meliloti** (10^9 bactéries/ml) lors d'une incubation de 45 h dans 14 l de milieu de non prolifération additionné de 10 g/l de glucose, en fonction de transfert en oxygène variable (KLa en h^{-1}).

On constate que :

- la production d'acide 2 céto-gluconique passe par un maximum pour un KLa de 30 h^{-1} ; il faut signaler que ce KLa est celui d'une fiole à toxines contenant 1 l de milieu et placée en agitation rotative à 105 tours/min. C'est dans un tel système que nous avons mis en évidence la formation d'acide 2 céto-gluconique à partir du glucose ;
- pour des valeurs de KLa $\leq 22 \text{ h}^{-1}$, il n'apparaît plus d'acide 2 céto-gluconique. Il faut cependant signaler que dans ces conditions le pH des suspensions décroît malgré tout : pH 4,5 après 45 h d'incubation. Il s'accumule donc d'autres acides pouvant résulter de la mise en place d'un métabolisme fermentatif ;
- pour des valeurs de KLa $> 45 \text{ h}^{-1}$, il n'apparaît pas d'acide 2 céto-gluconique.

Il faut donc, pour éviter tout risque d'acidification lors des cultures de **R. meliloti** sur des milieux contenant du glucose, atteindre dans le bioréacteur un coefficient de transfert en O_2 supérieur à 45 h^{-1} .

Nous montrons sur la figure 23, dans une expérience réalisée avec un KLa constant de 60 h^{-1} qu'il est possible d'obtenir des quantités relativement importantes de cellules microbiennes (20 g, poids humide) à partir d'un milieu glucosé sans modification notable du pH.

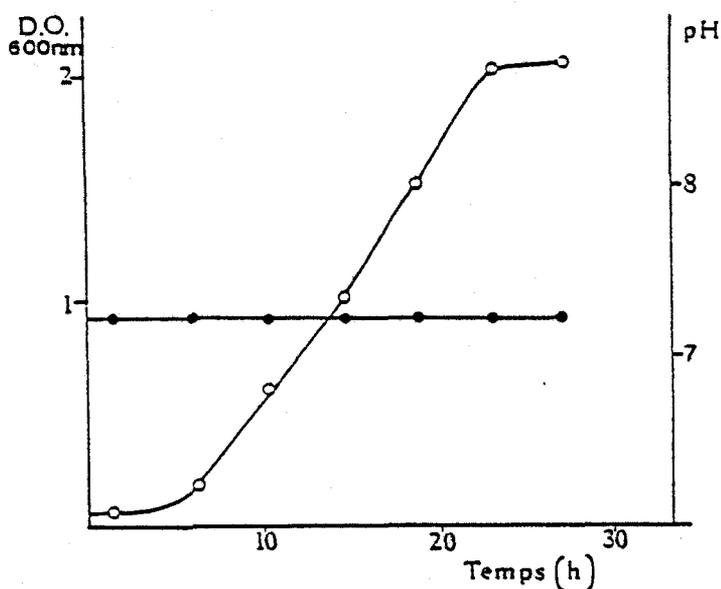


Figure 23 - Courbe de croissance (○—○) de *R. meliloti* et variation du pH du milieu en fonction du temps (●—●). $KLa = 60 \text{ h}^{-1}$.

2.4. Conclusion

L'utilisation de la souche M5N1 de *R. meliloti* nous a permis de définir deux types de substrats carbonés permettant la croissance de la bactérie :

- les uns peuvent être qualifiés "d'acidifiants" puisque le pH peut décroître jusqu'à une valeur de 4,4 lors du développement microbien. C'est le cas du glucose, du mannose, du galactose, ... Dans ces conditions, peu de polysaccharides sont synthétisés ;
- les autres permettent le maintien du pH aux environs de la neutralité. C'est le cas du fructose, du mannitol, du sorbitol, ... Dans ces conditions, il s'accumule près de trois fois plus de polysaccharides que précédemment.

Les conséquences de la dégradation d'un représentant de chacun de ces deux types, le glucose et le fructose, sont observées pour 27 souches de *R. meliloti* et pour 4 souches de chacun des autres groupes d'inoculation de *Rhizobium* à croissance rapide. Il s'avère que d'une façon générale, lors de la croissance bactérienne de *R. meliloti*, la tendance est à l'acidification sur glucose et au maintien du pH à des valeurs proches de celles du départ sur fructose. Ce phénomène est encore plus marqué pour des suspensions cellulaires incubées en condition de non prolifération en présence de glucose.

Ce comportement différentiel en fonction de la source de carbone du milieu de croissance, d'abord mis à jours sur la souche M5N1, est commun à toutes les souches représentantes du groupe d'inoculation de la Luzerne, *R. meliloti*.

L'acidification est due à l'accumulation d'un seul produit issu, dans nos conditions expérimentales, de la dégradation du glucose : l'acide 2 céto-gluconique. Il est le résultat de l'activité de deux déshydrogénases à spécificité large, exclusivement membranaire :

- la glucose déshydrogénase à NAD(P)^+ ,
- la gluconate déshydrogénase à NADP^+ .

Les pH d'activité maximale sont relativement bas, ce qui explique l'accumulation plus rapide de l'acide 2 céto-gluconique à pH 5 qu'à pH 7. Les K_m apparents de 0,35 mM et 0,54 mM dénotent une faible affinité de ces enzymes pour leur substrat. On constate, par ailleurs, en fiole, que plus il y a de glucose disponible pour la bactérie, plus l'acidification est rapide et l'accumulation d'acide 2 céto-gluconique importante.

Enfin, il apparaît que le fonctionnement de la voie du 2 céto-gluconique est lié à la disponibilité de l'oxygène dans les milieux d'incubation. La voie fonctionne dans une plage de pression partielle en oxygène faible juste avant la mise en marche d'un métabolisme fermentaire chez **R. meliloti**.

Par rapport à la croissance de **R. meliloti** sur d'autres glucides, le développement de la souche sur glucose n'est pas perturbé par la production d'acide 2 céto-gluconique qui reste une voie annexe d'utilisation du glucose. On observe, par exemple, les mêmes rendements moléculaires calculés d'après les croissances sur glucose ou sur fructose.

Etant donné que ces deux molécules sont les principaux représentants des oses disponibles dans la racine de la plante après hydrolyse dans les cellules végétales du saccharose issu de la photosynthèse (LAWRIE et WHEELER, 1975 ; ANTONIW et SPRENT, 1978 ; DAVIS et NORDIN, 1983), il devient fort intéressant d'en connaître le mode exact d'utilisation par la bactérie libre afin de mieux comprendre ce qui se passe chez le bactéroïde.

3. - LE CATABOLISME DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE

3. - CATABOLISME DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE

3.1. Etude physiologique de l'utilisation du glucose et du fructose par *Rhizobium meliloti*

3.1.1. Croissance comparée

Les courbes de croissance développées par *R. meliloti* à partir du glucose ou du fructose en milieu RC (24a) et en milieu RHB₁ (fig. 24b) sont rapportées ci-dessous.

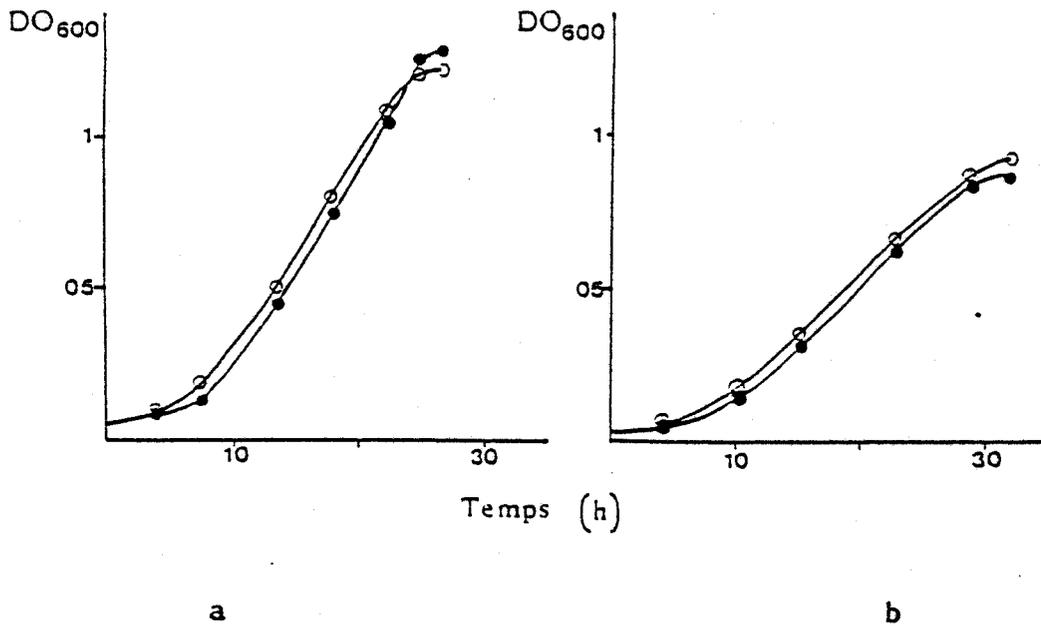


Figure 24 - Courbes de croissance de *Rhizobium meliloti* en milieu RC (a) ou en milieu RHB₁ (b) additionné de glucose (●-●) ou de fructose (○-○) à 1 %, culture agitée sur table rotative à 30°C.

On constate que dans chacun des cas, les courbes sont comparables. Les meilleurs rendements cellulaires sur milieu complet s'expliquent par l'apport d'une source d'azote protéique complexe (extrait de levure) fournissant en même temps certains facteurs de croissance. Ces résultats complètent la similitude des rendements moléculaires de croissance décrits précédemment (2.1.2.2.).

3.1.2. Respiration comparée

La mesure des échanges gazeux respiratoires est réalisée grâce à l'utilisation du respiromètre de Warburg, il s'agit donc de mesures manométriques.

3.1.2.1. Respiration endogène et épuisement des réserves cellulaires

R. meliloti possède d'importantes réserves carbonées cytoplasmiques, dont le poly- β -hydroxybutyrate (PHB) qui s'accumule durant tout le temps du développement cellulaire sur les milieux de croissance jusqu'à atteindre, dans les cellules des cultures âgées, 50 % de la matière sèche.

Dès la mise en non prolifération de ces cellules à 30°C, l'activation de leur respiration aux dépens de ces réserves se traduit par une consommation en oxygène importante, masquant en grande partie la quantité de gaz nécessaire à l'oxydation de substrats exogènes. Afin d'éviter toute erreur de mesure, les cellules sont débarrassées de leurs réserves énergétiques avant toute mesure de respirométrie. Nous avons recherché le temps d'épuisement nécessaire pour atteindre une respiration endogène minimale (fig. 25). Des échantillons sont régulièrement prélevés sur un lot de bactéries mises en suspension dans le TNP et incubées à 30°C en agitation rotative, leur respiration endogène est mesurée durant 160 mn.

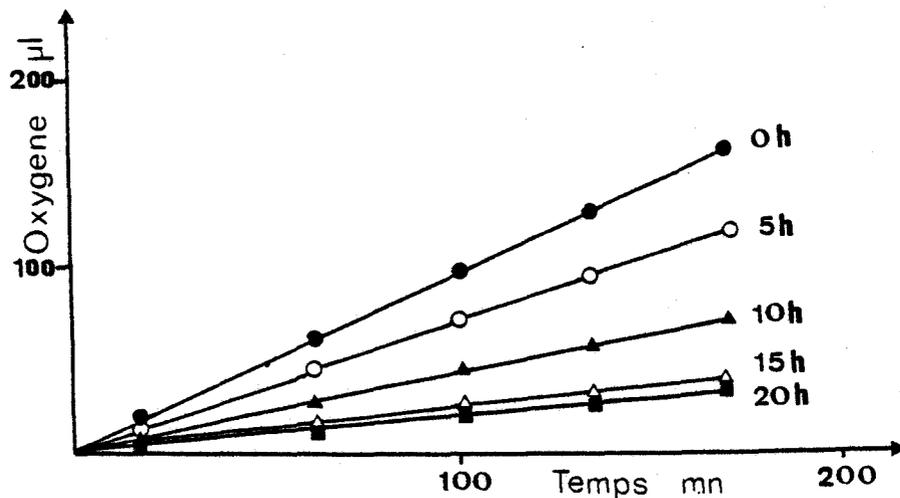


Figure 25 - Variation de la respiration endogène de *R. meliloti* en fonction du temps préalable d'épuisement des réserves cellulaires par agitation à 30°C dans le TNP.

On constate une diminution régulière de la respiration endogène jusqu'à 15 h d'incubation préalable en agitation dans le TNP, puis une stabilisation définissant la valeur minimale de cette respiration. Ces observations se vérifient sur tous les lots de cellules quel que soit leur mode de préparation (milieu de culture et source de carbone) mais la valeur minimale de la respiration endogène atteinte varie en fonction de cette préparation.

Toutes les cellules destinées à la réalisation de mesures respirométriques sont donc agitées dans le TNP à 30°C durant une nuit (15 h) avant d'être utilisées. Nous avons vérifié que durant ce traitement, le nombre de cellules viables reste constant.

3.1.2.2. Respiration cellulaire à partir de glucose ou de fructose

La consommation d'oxygène lors de la respiration des cellules en présence de 166 µg/ml de glucose ou de fructose est rapportée sur la figure 26.

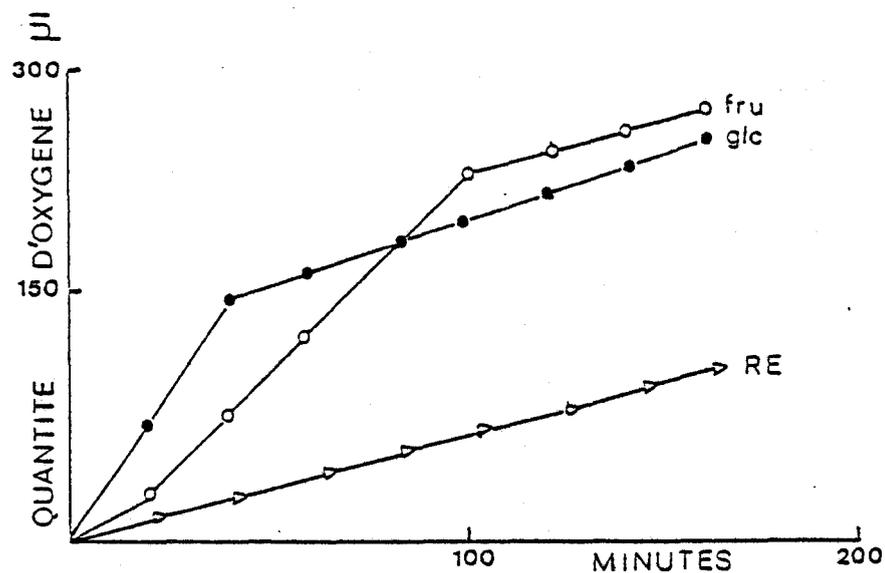


Figure 26 - Courbes de consommation d'oxygène d'une suspension cellulaire de R. meliloti (cultivé sur glucose) en présence de 166 µg/ml de glucose (Glc) ou de fructose (Fru). R.E. : respiration endogène.

On constate que l'oxydation du glucose est plus rapide (40 min) que celle du fructose (100 mn). L'utilisation de ce dernier commence avec quelque retard, il faut noter que les cellules utilisées ont été cultivées au préalable sur un milieu de culture contenant du glucose comme source d'énergie.

Dès que la consommation en oxygène rejoint celle de la respiration endogène, mesurée à partir d'un témoin sans substrat, l'agitation est arrêtée et on réalise un bilan carboné dont les résultats sont rapportés dans le tableau 22 (HORNEZ et coll., 1983a).

Bilan	Glucose		Fructose	
	µg	%	µg	%
Equivalent substrat dégagé en CO ₂	210	42	300	60
Fraction polyosidique	0,63	0,13	1,17	0,23
Fraction osidique	285	57	25,8	5,2
% recouvrement partiel	99,13		65,4	
Cellules bactériennes	24,9	5	174,3	35
% recouvrement total	105		100,4	

Résultats exprimés en µg équivalent substrat et en % équivalent substrat.

Tableau 22 - Bilan de la respiration de *R. meliloti* (DO = 7,5) en présence de 166 µg/ml de glucose ou de fructose, soit 500 µg au total.

En présence de glucose, la phase d'oxydation s'arrête après 40 mn d'incubation. On constate que le dioxyde de carbone produit correspond à la dégradation totale de 210 µg du substrat. La mesure de la radioactivité de la fraction osidique obtenue après filtration sur gel montre qu'elle renferme l'équivalent de 285 µg de substrat. Dans cette fraction, on détecte par dosage chimique 234 µg de glucose et 51 µg d'acide 2 céto-gluconique. Le taux de recouvrement partiel est proche de 100 % ; peu de matériel radiomarké s'accumule dans les cellules lors de cette expérimentation.

En présence de fructose, on remarque que la quantité de dioxyde de carbone dégagée est supérieure à celle mesurée en présence de glucose ; elle correspond à l'oxydation totale de l'équivalent de 300 µg de substrat carboné. La fraction osidique est peu radiomarkée. Le taux de recouvrement partiel n'est que de 65 %

environ. On constate que le complément à 100 se retrouve sur les membranes filtrantes, donc dans les cellules bactériennes. Ce complément est vraisemblablement dirigé vers des voies de métabolisme particulières, peut-être sous forme de précurseurs de biopolymères : polysaccharides ou PHB.

Peu d'exopolysaccharides sont libérés : les temps de contact sont très brefs et la quantité de source de carbone utilisée (166 $\mu\text{g/ml}$) est beaucoup plus faible que celle régulièrement employée pour l'étude de la synthèse de ces biopolymères (10 000 $\mu\text{g/ml}$).

Pour étudier l'influence de la concentration en monosaccharides sur le métabolisme cellulaire, nous avons renouvelé l'expérience en doublant les concentrations d'oses mis en présence de bactéries précultivées soit en présence de glucose soit en présence de fructose (fig. 27).

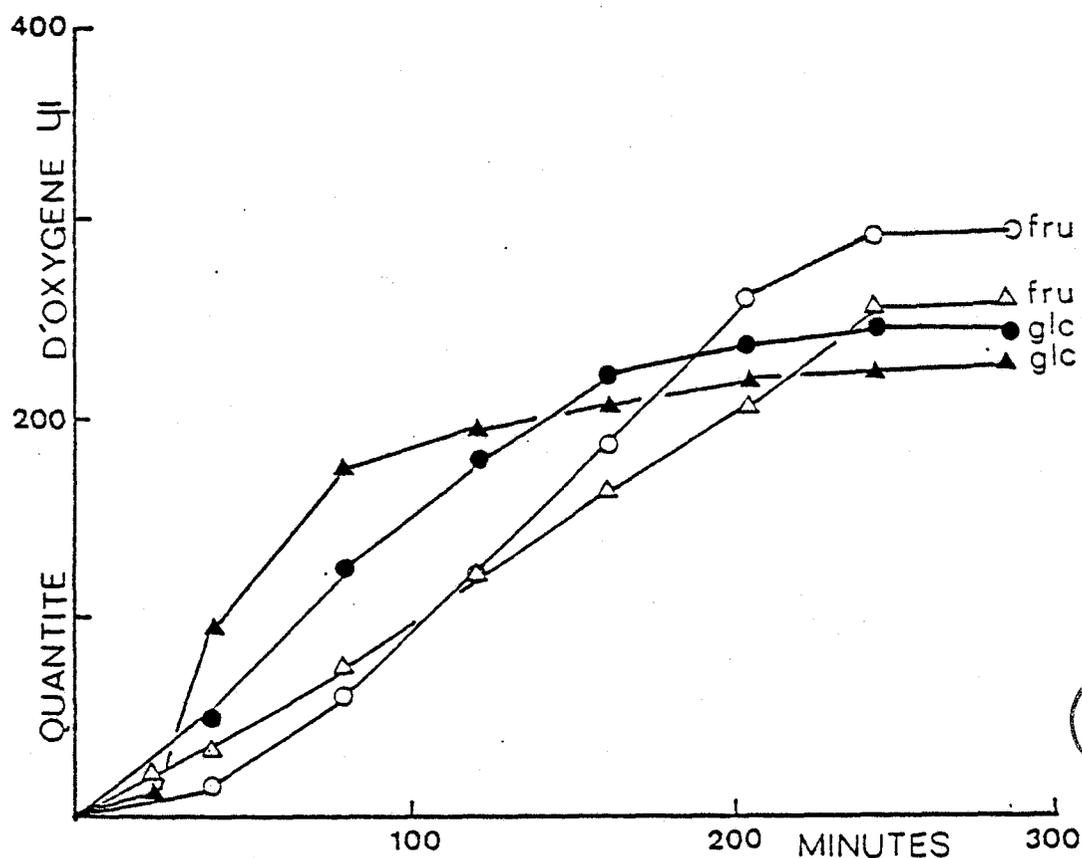


Figure 27 - Courbes de consommation d'oxygène d'une suspension cellulaire de *R. meliloti*, cultivé sur glucose (●-● et ○-○) et sur fructose (▲-▲ et △-△) en présence de 333 $\mu\text{g/ml}$ de glucose ou de fructose (Glc ou Fru), respiration endogène déduite.

Nous constatons que le léger retard à l'origine de l'oxydation d'un substrat s'annule lorsque les cellules utilisées se sont développées sur ce même substrat. Il faut remarquer de plus que durant les phases d'oxydation, les vitesses d'oxydation du fructose sont régulières, celles correspondant à l'oxydation du glucose diminuent au cours du temps. Cette baisse régulière de la consommation d'oxygène ne résulte pas de l'inhibition progressive d'un système enzymatique par acidification lente du milieu réactionnel car le pH reste neutre après 280 mn d'incubation.

3.1.2.3. Quotients respiratoires

On mesure dans chacun des cas précédents, au point d'inflexion des courbes, les quantités de dioxyde de carbone produit et les quantités d'oxygène consommé. Les valeurs obtenues sont corrigées par celles mesurées lors de la respiration endogène. Leur rapport permet de calculer les coefficients respiratoires expérimentaux : $Q_{RE} = \frac{Q_{CO_2}}{Q_{O_2}}$. Les expérimentations sont répétées trois fois et les résultats sont rapportés dans le tableau 23.

Substrat	Bactéries	Q_{RT}	Q_{RE} en présence de	
			166 µg/ml	333 µg/ml
Glucose	RmG	1	0,98	0,78
	RmF	1	-	0,81
Fructose	RmG	1	0,93	0,86
	RmF	1	-	0,88

Tableau 23 - Quotients respiratoires expérimentaux (Q_{RE}) mesurés sur des suspensions cellulaires de R. meliloti cultivé sur glucose (RmG) ou sur fructose (RmF) en présence de 166 ou 333 µg/ml d'ose. Q_{RT} = quotient respiratoire théorique.

On a pu montrer, par ailleurs, que pour des quantités de glucose ou de fructose de 41,5, de 83 et de 166 µg/ml, le Q_{RE} est voisin du quotient respiratoire théorique ($Q_{RT} = 1$). Au delà de ces concentrations, on constate que le Q_{RE} diminue et ceci est un peu plus marqué pour le glucose que pour le fructose.

3.1.2.4. Discussion et résultats complémentaires

Tout se passe comme s'il existait chez **R. meliloti** un système de régulation par le glucose ou comme si le système enzymatique mis à contribution se saturait peu à peu en un endroit donné de la chaîne métabolique. Or nous avons vu par ailleurs, d'une part que le pH des milieux d'incubation diminuait d'autant plus vite que leur concentration en glucose était élevée (2.3.2.1.) et, d'autre part, que si l'acide 2 céto-gluconique apparaissait dans tous les cas en présence de glucose, il s'accumulait à partir d'une certaine concentration en cet ose (2.3.2.2.). Dans ces conditions, l'acide 2 céto-gluconique pourrait être l'aboutissement d'une voie de déviation fonctionnant lorsque la ou les voies principales de dégradation du glucose sont surchargées. La déficience ou l'absence d'enzyme pour le dégrader en favoriserait son accumulation.

Il faut signaler que les mesures de respiration cellulaire à partir de 2 céto-gluconate de calcium ou de potassium ont montré que **R. meliloti** n'utilisait pas, au moins dans nos conditions expérimentales, ce substrat pour alimenter sa respiration. Or il disparaît dans les milieux de culture quand le glucose est en faible concentration (2.3.2.2.), il peut donc être dégradé.

Il en est de même pour les mesures de respiration sur gluconate de potassium, réalisées, pour rappel, sur un modèle bactérien non proliférant, alors que ce même composé est un excellent substrat carboné pour la croissance de **R. meliloti**.

3.2 . Assimilation de substrats radiomarqués, recherche et identification des intermédiaires

L'incorporation durant des temps brefs (de l'ordre de 10 mn) de substrats uniformément radiomarqués, par des cellules en suspension a permis après arrêt de la réaction et récupération de la masse bactérienne de préparer des extraits aqueux du contenu cytoplasmique.

L'analyse de ces extraits est réalisée par électrochromatographie suivie d'autoradiographie.

3.2.1. Détermination des coefficients de migration (R_x) des témoins

La substance migrant le plus, d'une part en électrophorèse et d'autre part en chromatographie, est prise comme référence, à savoir que dans nos systèmes de migration (tab. 24) :

- le R_{PEP} correspond au coefficient d'une substance par rapport au phospho-enol-pyruvate en électrophorèse, il est défini égal à 1 ;

- le R succinique est le coefficient d'une substance par rapport à l'acide succinique en chromatographie, il est défini également égal à 1.

Témoins	Rx Electrophorétique	Rx Chromatographique
PEP	1	0,22
Acide succinique	0,51	1
Acide glyoxylique	0,86	0,96
F-1, 6 diP*	0,80	0,02
6-P-G*	0,80	0,02
Rib-5-P*	0,68	0,075
2-céto-gluconate*	0,68	0,075
5-céto-gluconate	0,62	0,20
Pi	0,88	0,125
3-P-glycérique	0,87	0,024
G-1-P*	0,61	0,02
Gal-1-P*	0,61	0,02
F-6-P*	0,61	0,02
G-6-P*	0,61	0,02
Gluconate	0,54	0,09
Acide citrique	0,72	0,54
Acide malique	0,72	0,63
α -céto-glutarique	0,76	0,83
Glucose	0,29	0,048
Fructose	0,29	0,088
Ribose	0,29	0,23
Sédoheptulose	0,30	0,105
Alanine	0,35	0,123
Glutathion	0,457	0,102



Tableau 24 - Coefficients de migration relatifs des principaux représentants du métabolisme intermédiaire des hydrates de carbone, dans les systèmes de migration électrophorétique et chromatographique.

D'après ce tableau, nous remarquons que certains produits ne sont séparés ni par l'électrophorèse, ni par la chromatographie : ils sont notés d'une *.

3.2.2. Recherche d'intermédiaires

L'assimilation de glucose, fructose ou gluconate $U^{14}C$ est réalisée durant 10 mn et l'analyse des extraits aqueux a montré que quelle que soit la nature de l'hydrate de carbone ayant permis l'obtention des cellules (glucose, fructose ou gluconate de potassium), les autoradiographies obtenues après incorporation de glucose, de fructose ou de gluconate radiomarqué donnent sensiblement la même image (fig. 28). On observe :

- l'existence de substrats identiques au substrat de départ. Il semble donc dès lors que le transport de chacun d'entre eux se fasse sans modification de la molécule ;
- l'apparition de dérivés monophosphorylés difficiles à identifier car ils ne se séparent pas entre eux dans nos systèmes de migration ;
- l'apparition de certains acides carboxyliques du cycle de krebs : citrate, pyruvate et α céto-gluconate. L'incorporation du fructose fait de plus apparaître un spot correspondant aux coefficients de migration du malate ;
- l'apparition d'intermédiaires difficiles à identifier dans nos conditions mais qui possèdent des coefficients de migration identiques au 2 céto-gluconate ou au ribose 5 phosphate, au 5 céto-gluconate, au 6 phosphogluconate ou au fructose 1-6 diphosphate.

Par ailleurs, l'addition de ^{32}P dans les tampons utilisés lors de l'incorporation de glucose ou de fructose durant 2 mn n'a jamais pu permettre la mise en évidence de dérivés diphosphorylés.

3.3. Recherche d'activités enzymatiques particulières au métabolisme des hydrates de carbone

3.3.1. Principe

Nous avons cultivé *Rhizobium meliloti* sur milieu RHB₁ en présence de différents substrats carbonés : glucose ou fructose de façon à compléter notre étude sur l'utilisation de ces deux hydrates de carbone mais aussi sur succinate de sodium, acide organique se trouvant en quantité importante dans les nodules, et sur gluconate de sodium de façon à voir si certaines activités enzymatiques ne sont pas significativement augmentées en sa présence. Les cellules sont éclatées aux ultra-sons, la préparation est débarrassée des matières en suspension par centrifugation, le surnageant contient tous les constituants cytoplasmiques solubles et sert à l'étude des différentes activités enzymatiques.

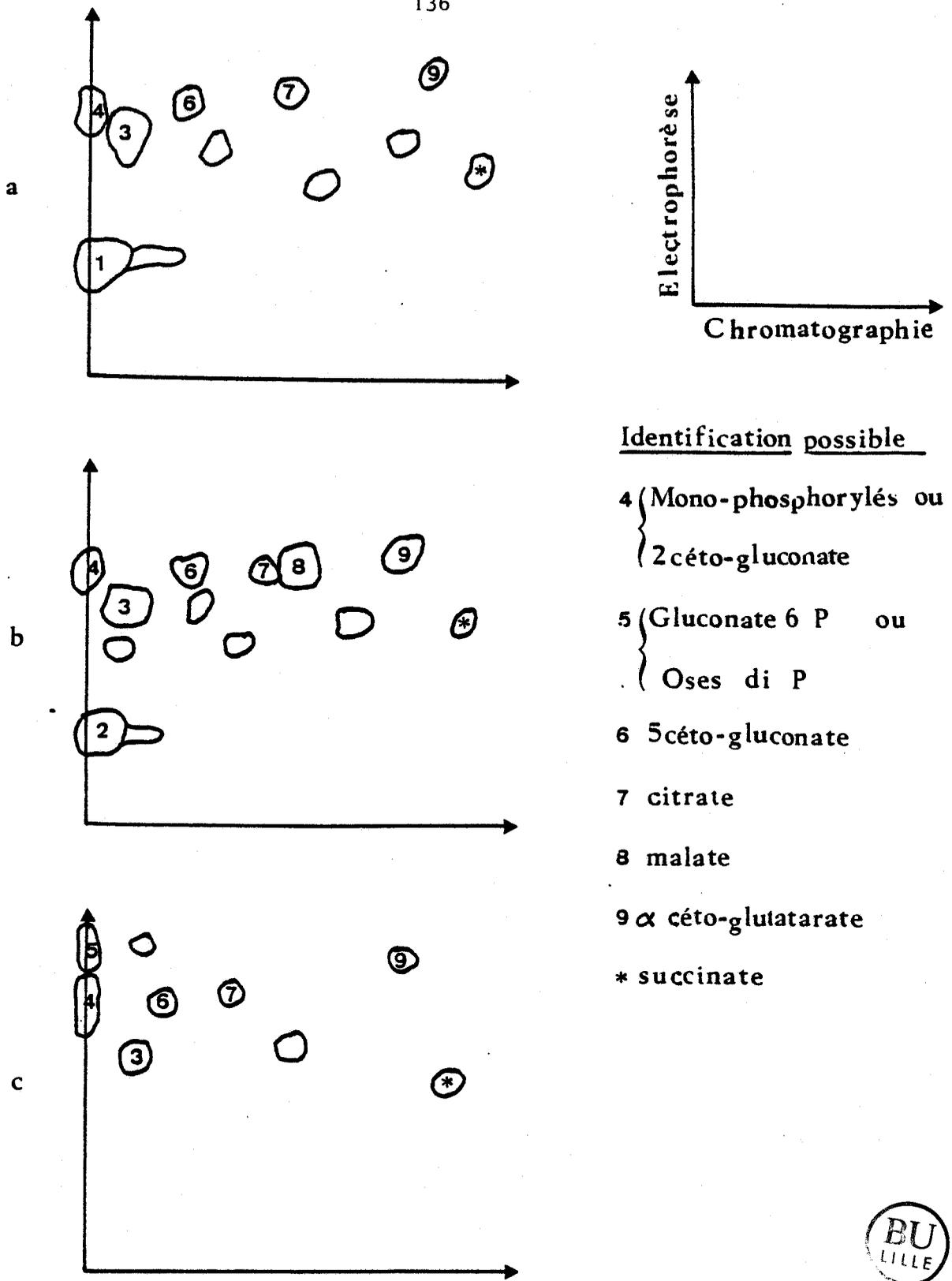


Figure 28 - Electrochromatogrammes, révélés par autoradiographie, du contenu cytoplasmique hydrosoluble de R. meliloti après 10 mn d'assimilation du glucose (a), du fructose (b) ou du gluconate (c).

1

2

3

3.3.2. Réalisation

On constate que l'on retrouve les activités des enzymes clés des trois voies principales de dégradation des hydrates de carbone (tab. 25) :

- voie de Embden-Meyerhof-Parnas ou voie de la glycolyse : phosphofructokinase et fructose 1-6 diphosphate aldolase (F 1-6 diPaldolase) ;
- voie de Dickens-Horecker ou voie des pentoses ou voie des hexoses monophosphates : 6 phosphogluconate déshydrogénase à NADP⁺ (6 PGdéshydrogénase à NADP⁺), transaldolase et transcétolase ;
- voie de Entner-Doudoroff ou voie du KDPG : 6 phosphogluconate déshydratase (6 PGdéshydratase) et 2 céto-3-déoxy-6-phosphogluconate aldolase (KDPG aldolase).

Par ailleurs, sur des extraits cytoplasmiques de cellules cultivées sur glucose, nous avons mis en évidence sans la doser une activité fructose isomérase pouvant catalyser l'isomérisation fructose-glucose.

L'acidification, lors d'incubation en présence de glucose et l'accumulation d'acide 2 céto-gluconique dans le milieu ne semblent pas être dues à une lacune enzymatique lors de la dégradation du glucose et pourraient expliquer par la baisse du pH les activités moindres observées dans ce cas comparativement à celles observées sur des extraits cellulaires préparés à partir du fructose.

A partir de succinate, les extraits cellulaires montrent des activités enzymatiques plus faibles mais jamais annulées, contrairement aux systèmes de transport décrits dans le chapitre suivant.

Enfin, il faut noter une activité 2 céto-gluconate réductase importante dans les extraits cellulaires préparés sur glucose, ce qui laisse supposer puisque dans les faibles concentrations en glucose l'acide 2 céto-gluconique disparaît (2.3.2.2.), une utilisation directe de cet acide dans certaines conditions de milieu.

Glucose et fructose devraient donc pouvoir être métabolisés tout au long des trois voies principales de dégradations. Cependant, l'isolement de mutant métabolique va permettre de préciser laquelle de ces voies est utilisée pour assurer la croissance de **R. meliloti**.

Enzymes	Activités mesurées après croissance en présence de :			
	Glc	Fru	Succ	Gluconate
Glucokinase	89	177	53	ne
G6P isomérase	700	1100	700	ne
Fructokinase	65	ne	ne	ne
Phosphofructokinase	120	ne	ne	ne
Hexose biphosphatase	39	ne	ne	ne
F 1-6 di-P-aldolase	69	124	34	16
Enolase	124	ne	ne	ne
Gluconokinase	50	50	ne	24
2 céto-gluconate réductase	252	ne	ne	ne
G6P déshydrogénase à NAD ⁺	47	83	14	ne
à NADP ⁺	138	209	25	ne
6PG déshydrogénase à NAD ⁺	0	0	0	0
à NADP ⁺	94	131	66	9
6PG déshydratase + KDPG aldolase	140	57,5	8,5	7
Transaldolase	6,5	ne	ne	ne
Transcétolase	19	ne	ne	ne

Tableau 25 - Mesures de différentes activités enzymatiques (exprimées en nano-moles de substrat transformé par mn et par mg de protéines solubles) sur des extraits cytoplasmiques de cellules de Rhizobium meliloti cultivées sur milieu RHB₁ additionné de glucose (Glc) ou de fructose (Fru) ou de succinate de sodium (Succ) ou de gluconate à raison de 10 g/l (ne = non effectué).



3.4. Voies cataboliques utilisées pour la croissance de *R. meliloti* à partir de glucose ou de fructose comme source de carbone

3.4.1. Isolement d'un mutant métabolique

3.4.1.1. Caractéristiques de croissance

Nous avons utilisé la N-méthyl-N'-nitro-nitrosoguanidine comme agent mutagène sur la souche sauvage M5N1. L'enrichissement en mutants Fru⁻ est réalisé sur milieu RHB₁ additionné de fructose et de pénicilline à 2 000 µ/ml. Par la technique des répliques de clones isolés d'un milieu TY sur un milieu RHB₁ plus fructose, nous avons pu repérer un mutant fructose négatif baptisé HD1 dont les caractéristiques de croissance sont rapportées dans le tableau 26 (EL GUEZZAR et coll., 1987 soumis).

Source de carbone	Temps de génération en heures	
	M5N1	HD1
Fructose	4	-
Mannitol	4,5	-
Sorbitol	4,5	-
Mannose	4,5	-
Xylose	5	-
Ribose	5	-
Glucose	4,5	4,5
Saccharose	2	8
L-arabinose	6	7
Glycérol	12	12
Succinate de sodium	3,5	3,5
Succinate + fructose	3,5-3	5,5
Succinate + glucose	4,5-4	4,5-4

Tableau 26 - Temps de génération calculés lors de la croissance des souches de *R. meliloti* parentale (M5N1) et mutante (HD1) sur milieu RHB₁ additionné de sources de carbone à raison de 2 g/l sauf pour les substrats en mélange 1 g/l chacun.

On constate que le mutant HD1, comme la souche parentale, pousse sur glucose, succinate, L-arabinose ou glycérol et plus lentement sur saccharose. Par contre, il est incapable de se développer sur fructose, mannitol, sorbitol, mannose, xylose ou ribose.

Le succinate, en concentration limitante, et additionné d'un hydrate de carbone, est à l'origine chez **R. meliloti** de l'apparition de croissance diauxique (3.4.2.2.). Les temps de génération notés dans le tableau sont respectivement celui de la première phase de développement sur l'acide organique, et celui de la seconde phase de développement sur l'hydrate de carbone. Le mutant HD1 se comporte comme M5N1 en présence du couple succinate plus glucose ; en présence de succinate plus fructose il ne développe qu'en une phase, le temps de génération calculé étant plus grand que celui de la souche sauvage, calculé lors de sa croissance sur succinate.

3.4.1.2. Appartenance du mutant au genre **Rhizobium** : infectivité et efficience

Nous avons vérifié l'identité de la souche mutante HD1 et son appartenance au genre **Rhizobium** par sa possibilité d'induire la nodulation de plantules aseptiques de Luzerne (**Medicago sativa**) inoculées. Nous avons de plus comparé l'efficience du mutant avec celle de la souche sauvage M5N1 par la mesure de la vitesse de réduction de l'acétylène dans certaines conditions (tab. 27).

Souches	Infectivit�� Nodulation	Efficience en nmoles de C ₂ H ₂ réduites par plante et par heure
M5N1	+	27
HD1	+	27

Tableau 27 - Propriétés symbiotiques des souches de R. meliloti M5N1 et HD1.

Comme pour la M5N1, la souche HD1 induit la formation de nodules 12 à 15 jours après l'inoculation des plantules. La mesure de l'efficience est réalisée après quatre semaines de développement : aucune différence significative n'est observée entre M5N1 et HD1. La mutation n'affecte pas le processus de nodulation et de fixation de l'azote.

Nous avons vérifié, par ailleurs, que les nodules contiennent bien la souche avec laquelle ils ont été infectés.

3.4.2. Recherche de la nature de la mutation

Dex extraits cytoplasmiques ont été préparés après sonication de cellules cultivées sur le milieu RHB₁ additonné de glucose à 10 g/l. La comparaison, dans les extraits de M5N1 et HD1, des activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme du fructose montre que le mutant est phosphoglucose-isomérase négative (PGI⁻) (tab. 28).

Enzyme	Activité spécifique en nmoles/mn x mg de protéines	
	M5N1	HD1
G6P déshydrogénase à NADP ⁺	120	72
Phosphoglucose isomérase	107	12
6PG déshydrogénase à NADP ⁺	66	25
6PG déshydratase + KDPG aldolase	160	160
Fructokinase	80	67
Hexose biphosphatase	36	40

Tableau 28 - Mesures de différentes activités enzymatiques sur des extraits cytoplasmiques de cellules de R. meliloti sauvage (M5N1) ou mutant (HD1).

Il faut préciser, par ailleurs, que la phosphofructokinase et la fructose biphosphate aldolase, enzymes clés de la glycolyse, existent mais à faible activité, à la fois chez M5N1 et HD1. La voie de Embden-Meyerhof-Parnas existe certainement mais avec un rendement trop faible pour assurer la croissance de la bactérie. La voie empruntée à cette fin est la voie d'Entner-Doudoroff, ce qui explique qu'en présence de fructose, le mutant HD1 PGI⁻ ne pousse pas.

3.4.3. - Contrôle de la nature de la mutation

La souche mutante étant incapable de rejoindre le glucose-6-phosphate pour alimenter la voie d'Entner-Doudoroff doit en principe, dans ces conditions, accumuler le fructose-6-phosphate dans son cytoplasme.

Pour le vérifier, nous avons mis en culture la souche sauvage et la souche mutante sur milieu RHB₁ additionné soit de glycérol, soit de L-arabinose, soit de succinate de sodium à 10 g/l. En début de phase exponentielle, on ajoute le fructose à raison de 10 g/l également, plus le fructose U¹⁴C, 1 µCi pour 100 µmole d'ose froid. La culture est poursuivie durant 20 h.

On constate un retard de la croissance du mutant dès l'addition de fructose, comme à chaque fois que l'on ajoute lors du développement d'un mutant métabolique un substrat qu'il est incapable de dégrader.

En fin de manipulation, des prélèvements de 10 ml sont traités par un volume équivalent d'eau bouillante et maintenus à 100°C durant 10 mn. Les débris cellulaires sont séparés par centrifugation et le surnageant est concentré jusqu'à 0,1 ml par évaporation sous vide.

Cet extrait est chromatographié 2 h, à température ambiante, sur couche mince de gel de silice par un solvant contenant éthanol/butanol/acide acétique/eau/pyridine (100:10:3:30:10). Les témoins sont révélés à l'orcinol sulfurique et les bandes correspondantes aux échantillons sont découpées et comptées en scintillation liquide. On constate que l'on retrouve pour le mutant de grandes quantités de fructose et de fructose-6-phosphate (tab. 29).

Souche	Source de carbone	nmoles/mg de protéines	
		Fru	F-6-P
M5N1	Glycérol	67	68
	L-arabinose	37	150
	Succinate	90	118
HD1	Glycérol	4613	1178
	L-arabinose	335	1035
	Succinate	1174	985

Tableau 29 - Accumulation de fructose (Fru) et de fructose-6-phosphate (F-6-P) par R. meliloti M5N1 et HD1 lors de leur croissance en présence de différentes sources de carbone et de fructose.

La souche HD1 accumule des quantités très importantes de F-6-P comparativement à la souche M5N1 mais accumule aussi de très grandes quantités de fructose malgré une activité fructokinase mesurée *in vitro* comparable à celle de la souche sauvage.

Pour expliquer cette double accumulation, nous avons mesuré *in vitro* sur des extraits cytoplasmiques de la souche HD1 l'activité de la fructokinase en présence de quantités croissantes de fructose-6-phosphate (fig. 29) et de fructose 1 mM. L'incubation est réalisée à 30°C durant 25 mn, la réaction est arrêtée par l'addition d'ATCA à 50 %. Le précipité est éliminé par centrifugation et le fructose est dosé dans le surnageant. L'activité de la fructokinase est évaluée en fonction de la quantité de fructose non transformé. Le 100 % d'activité est défini par le témoin non additionné de F-6-P.

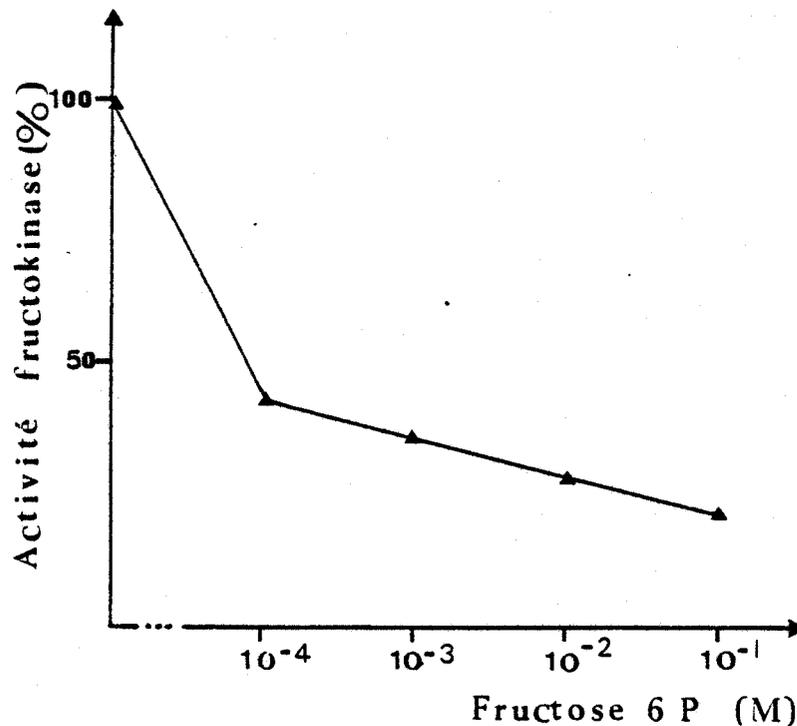


Figure 29 - Inhibition de l'activité de la fructokinase par le fructose-6-P, mesurée sur des extraits cytoplasmiques de la souche HD1 de R. meliloti cultivée sur RHB₁ additionné de glucose à 1 %.

La fructokinase est donc inhibée par le produit de sa réaction, ce qui explique l'accumulation dans le cytoplasme des cellules HD1 incubées en présence de fructose, à la fois de fructose et de fructose-6-phosphate.

Il faut signaler, de plus, que la vitesse initiale d'incorporation du fructose est chez le mutant 2,5 supérieure à celle mesurée chez la souche sauvage.

3.5. Conclusion

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que les rendements moléculaires calculés lors de la croissance de *R. meliloti* en présence de glucose ou de fructose étaient sensiblement identiques, ce qui montrait que les rendements énergétiques de la dégradation de chacun des substrats étaient équivalents. Nous montrons, cette fois, que les vitesses d'utilisation sont comparables, l'allure des courbes de croissance est la même dans chacun des cas.

Durant son développement, *R. meliloti* accumule beaucoup de PHB sous la forme de granules peu nombreux mais importants en taille, pouvant envahir le cytoplasme bactérien et représenter jusqu'à 50 % de la matière sèche cellulaire (WONG et EVANS, 1971). Dans des conditions de température adéquate, ce polymère alimente la respiration endogène des cellules, allant jusqu'à masquer l'utilisation de source carbonée exogène. Il faut donc l'éliminer avant toute mesure respirométrique par épuisement progressif des cellules en agitation et en conditions non proliférantes.

Les mesures respirométriques, réalisées en présence de glucose ou de fructose, montrent que :

- pour chacun des oses, en faible concentration relative, le quotient respiratoire expérimental, calculé sur des temps brefs, est identique au quotient respiratoire théorique. Les molécules sont totalement oxydées en eau et en dioxyde de carbone. Le cycle des acides tricarboxyliques est fonctionnel comme pour l'ensemble des espèces de *Rhizobium* ;
- lorsque les concentrations en oses augmentent, les quotients respiratoires diminuent : le phénomène est beaucoup plus marqué pour le glucose que pour le fructose. En présence de glucose, on retrouve à nouveau de l'acide 2 céto-gluconique dans le milieu ; en présence de fructose des éléments restent à l'intérieur des cellules, peut-être précurseurs de biopolymères, polysaccharides ou PHB (HORNEZ et coll., 1983) ;
- dans nos conditions expérimentales, le 2 céto-gluconate de calcium ou de potassium et le gluconate de sodium sont très peu utilisés pour la respiration. Pourtant ces deux substrats doivent pouvoir, dans certaines conditions, pénétrer dans la cellule et être métabolisés. En effet, nous avons mis en évidence une activité 2 céto-gluconate réductase importante dans le cytoplasme de bactéries ayant été cultivé sur glucose. Cette enzyme doit permettre le passage de l'acide 2 céto-gluconique à l'acide gluconique qui, après phosphorylation, est dégradé par les voies d'Entner-Doudoroff ou de Dickens-Horecker. Quant au gluconate, utilisé comme source de carbone dans les milieux de culture de *R. meliloti*,

il permet non seulement un excellent développement cellulaire mais aussi une forte production d'exopolysaccharides (THEODOROPOULOS, 1985b). Utilisé dans des conditions de non prolifération, on constate qu'au contraire et à la différence du glucose ou du fructose qu'il ne permet pas la synthèse d'exopolysaccharides. Sa vitesse de perméation, également mesurée en conditions de non prolifération (Matériel et Méthodes, 7.2.), est très faible.

Lors des études de respirométrie, nos conditions expérimentales ne sont donc pas adaptées à la mesure de l'oxydation de ces deux derniers substrats.

L'isolement d'un mutant de **R. meliloti** phosphoglucose isomérase négative et l'étude de ses caractéristiques de croissance montrent que c'est la voie d'Entner-Doudoroff qui est utilisée pour la dégradation des hexoses à des fins de multiplication cellulaire. La recherche et l'identification d'intermédiaires métaboliques après des temps brefs d'incorporation n'a d'ailleurs jamais permis d'identifier des composés diphosphorylés alors que les monophosphorylés apparaissent dans tous les cas.

Le mutant **R. meliloti** PGI⁻ est incapable de se développer sur milieu minimum RHB₁ additionné de :

- mannitol ou sorbitol : ces deux polyols sont, chez **R. meliloti**, réduits en fructose par une polyol déshydrogénase commune, NAD⁺ dépendante et inductible par l'un ou l'autre des substrats (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970) ;
- mannose : ce substrat est, chez **R. meliloti**, transporté par une perméase dans le cytoplasme de la bactérie, phosphorylé par une mannose-kinase spécifique et isomérisé en fructose-6-phosphate (ARIAS et coll., 1982) ;
- xylose ou ribose : ces pentoses rejoignent par la voie de Dickens-Horecker le fructose-6-phosphate.

Par contre, le mutant PGI⁻ peut assurer sa croissance en milieu minimum additionné de :

- succinate de sodium : cet acide organique est un excellent substrat carboné pour toutes les souches de **Rhizobium** à croissance rapide (GRAHAM, 1964). Il est dégradé par le cycle de Krebs (GARDIOL et coll., 1982) ;
- glycérol : cet alcool est phosphorylé sur le carbone 3 et deshydrogéné pour donner la glycéraldéhyde-3-phosphate. Cette molécule est métabolisée par la fin de la chaîne de la glycolyse, fonctionnelle chez **R. meliloti**. Le pyruvate formé est dégradé par le cycle de Krebs (ARIAS et MARTINEZ-DRETS, 1976) ;
- L-arabinose : ce pentose suit une voie métabolique tout à fait particulière chez **Rhizobium** par rapport aux autres pentoses. Chez les souches à croissance rapide, il rejoint le cycle de Krebs au niveau de l'α céto-glutarate (DUNCAN et

FRAENKEL, 1979) en passant par le L-arabonate, le 2 céto-3-désoxy-L-arabonate et l' α céto-glutarate semi-aldéhyde.

Les caractéristiques de croissance de notre mutant sont en accord avec les observations réalisées par ailleurs par d'autres auteurs.

Nous pouvons donc proposer pour *R. meliloti* un schéma des voies cataboliques des hydrates de carbone (fig. 30).

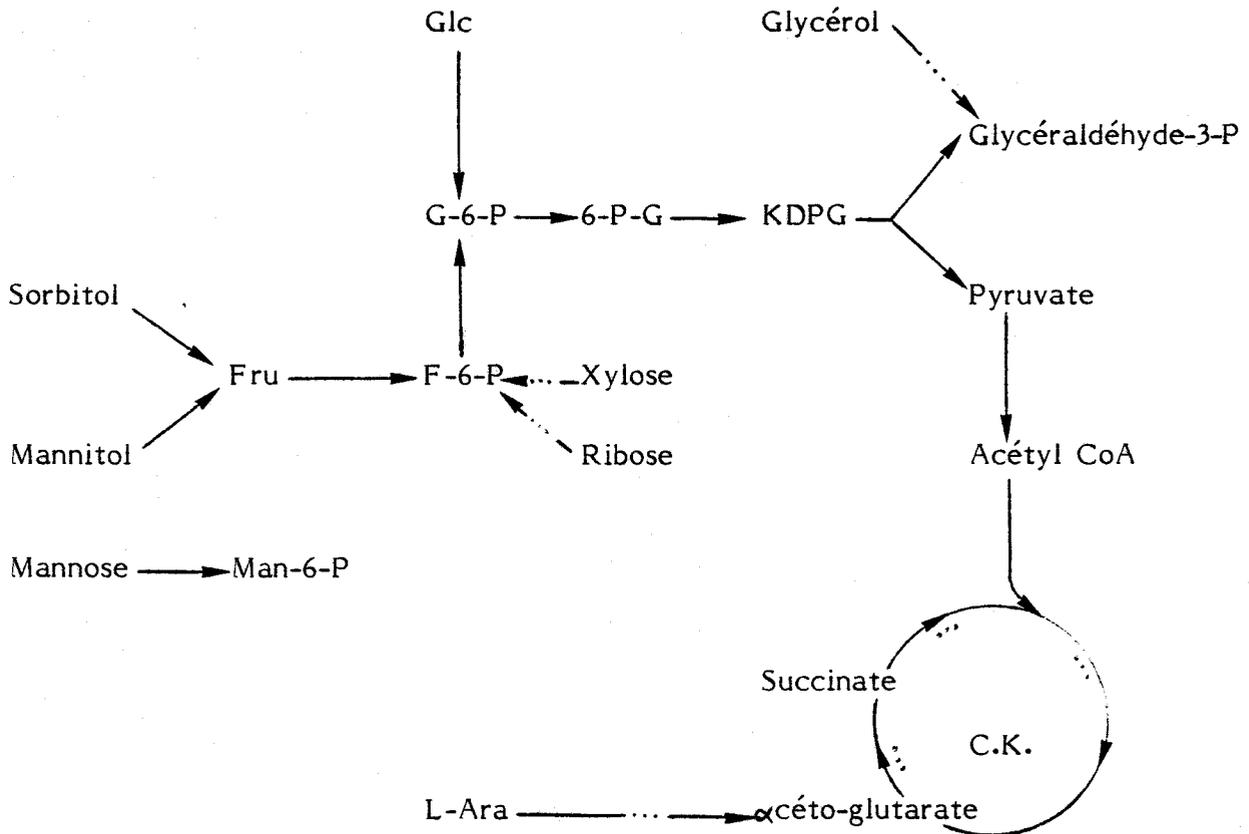


Figure 30 - Voies cataboliques de composés carbonés empruntés par *R. meliloti* au niveau cytoplasmique

Glucose et fructose passent donc par les mêmes voies de dégradations et avec la même efficacité. Il n'en reste pas moins que, dans certaines conditions, le glucose est à l'origine de l'accumulation d'acide 2 céto-gluconique. On peut alors se demander si les systèmes de transport mis en oeuvre pour véhiculer chacun de ces substrats ont les mêmes caractéristiques.

4. - LE TRANSPORT DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE

4. - LE TRANSPORT DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE

Peu d'études de perméation ont déjà été réalisées chez **Rhizobium meliloti**. Nous avons donc d'abord recherché l'existence de transport actif, c'est-à-dire capable d'accumuler le substrat en concentration cellulaire supérieure à la concentration extérieure. Puis nous en avons étudié leur mécanisme et leur régulation.

De façon classique, l'étude des mécanismes de transport chez les bactéries est effectuée :

- soit en utilisant des cellules intactes et des analogues structuraux de substrats, non métabolisables, de façon à pouvoir mesurer facilement leur accumulation dans le cytoplasme ;
- soit en utilisant des vésicules membranaires et les substrats vrais. La technique de KABACK (1973), définie avec succès pour **Escherichia coli**, est basée sur la formation de sphéroplastes à partir de bactéries traitées par le lysozyme, suivi de leur éclatement en milieu hypotonique. Dans ces conditions, le contenu cellulaire est libéré et les membranes cytoplasmiques, débarrassées de la paroi, se vésiculisent donnant des formes sphériques fermées qui sont ensuite séparées des autres constituants par centrifugations successives.

L'application de cette technique et son étude critique ne nous ont jamais permis d'obtenir des préparations de vésicules membranaires de **Rhizobium** suffisamment homogènes, pouvant être utilisées dans le cadre de l'étude des mécanismes de transport. Il semble que le PHB que l'on ne peut éliminer facilement complètement soit fort gênant pour la vésiculation des membranes fracturées et leur récupération.

4.1. Utilisation d'analogues structuraux du glucose

L'incorporation d'un substrat est appréciée par le comptage en scintillation liquide de son traceur radiomarqué accumulé par des cellules en conditions de non prolifération. La réalisation de prélèvements réguliers nous permet d'étudier la cinétique du phénomène.

4.1.1. Cinétiques d'incorporation de 1α -méthyl-glucose et du 2-déoxy-glucose

Nous avons utilisé des analogues structuraux du glucose : α -méthyl-glucose (α MeG) et 2 déoxy-glucose (2DG) (fig. 31) en présence de cellules de **R. meliloti** précultivées sur milieu RHB₁ additionné de glucose à 10 g/l.

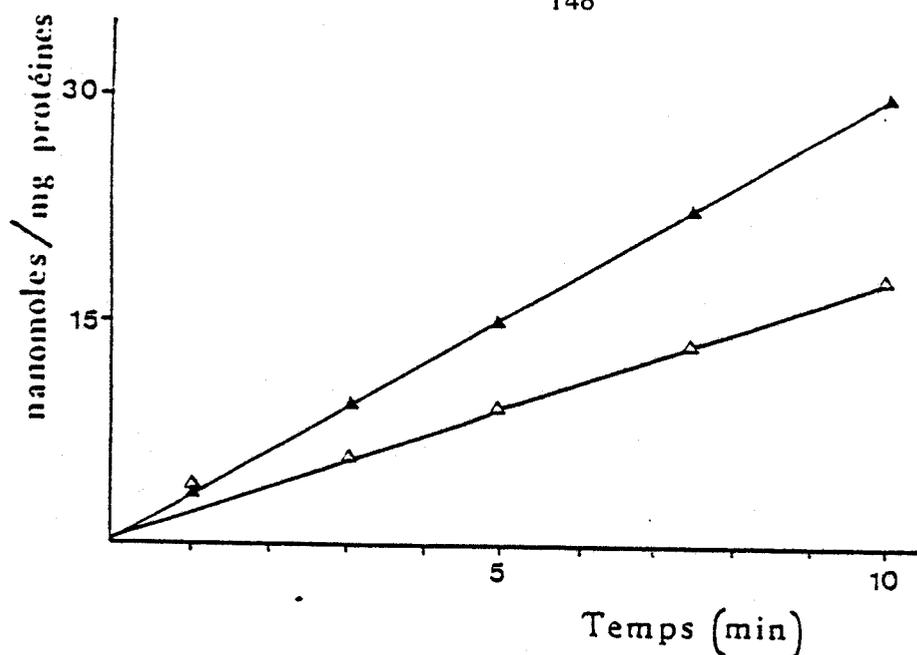


Figure 31 - Cinétiques d'incorporation de l' α -méthyl-glucose (\triangle) et du 2-déoxy-glucose (\blacktriangle) 10^{-4} M pour Rhizobium meliloti (DO = 1,00).

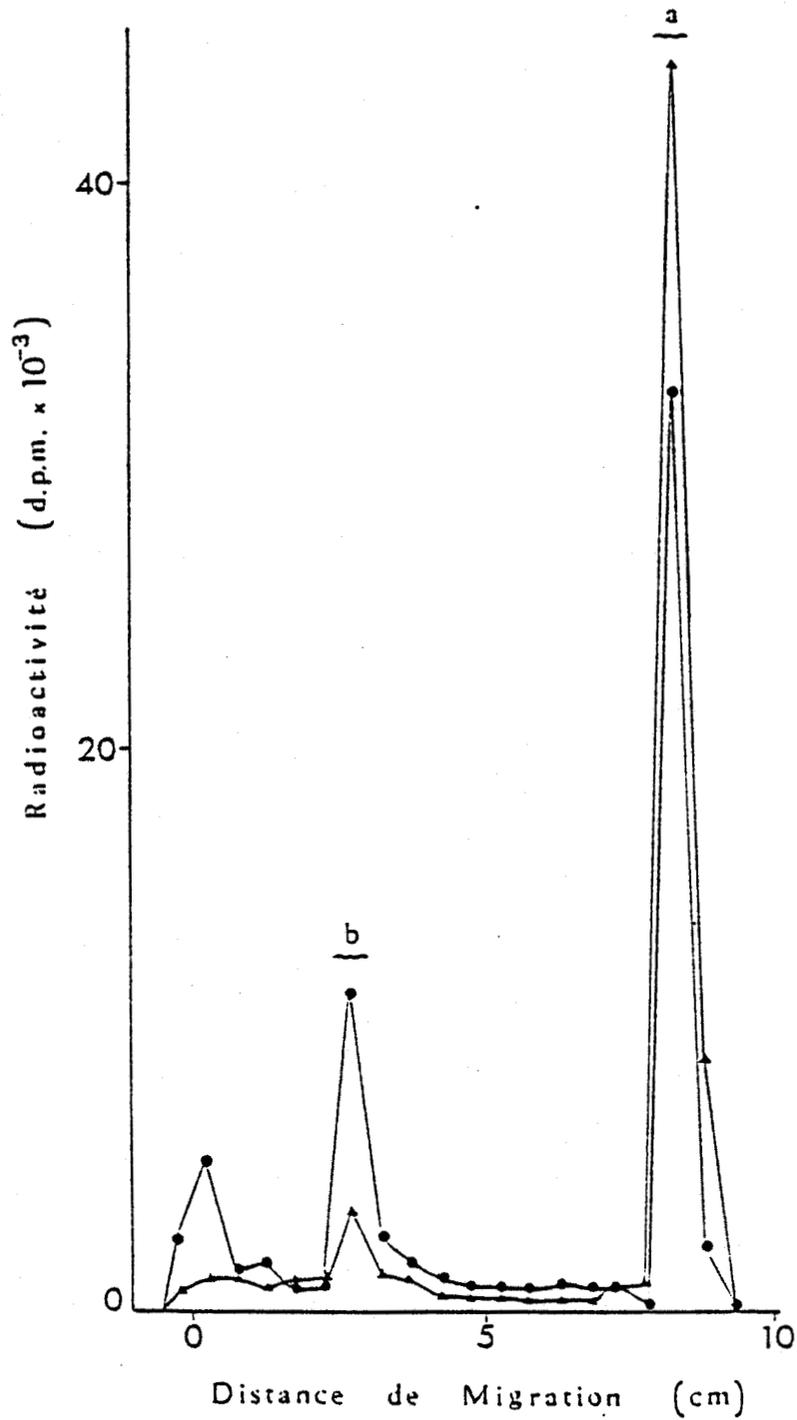
Les deux analogues sont immédiatement incorporés, les vitesses initiales d'accumulation sont de 4 nmoles/mg protéines x mn pour l' α MeG et de 5 nmoles/mg de protéines x mn pour le 2DG.

4.1.2. Nature des produits d'accumulation

Chez de nombreux genres microbiens, certains glucides sont phosphorylés durant leur transport. Nous avons voulu voir s'il en était de même pour **Rhizobium** et avons pris pour modèle l'incorporation de l' α -méthyl-glucose.

Nous avons d'abord réalisé une accumulation de l' α MeG à la concentration finale de 10 μ M (3 μ Ci) par des cellules de **R. meliloti** (DO = 1) durant 5 et 60 mn. Les produits radiomarqués ont été alors extraits et chromatographiés sur couche mince. Les profils de migration sont représentés par la figure 32.

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



BU
LILLE

Figure 32 - Chromatographie sur couche mince des produits radiomarqués extraits après une accumulation de l' α MeG durant 5 mn (▲▲) et 60 mn (●●).

(a) correspond à la distance de migration de l' α MeG,

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

Le profil de migration, après 60 mn 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 %).

D'après ces résultats, on peut dire que :

- soit l' α MeG est métabolisé par *R. meliloti*. Il est accumulé sous une forme inchangée et n'est donc pas phosphorylé durant le transport ;
- soit l' α MeG passe par un PTS et est déphosphorylé après son apparition dans le cytoplasme bactérien.

4.1.3. Expériences de déplacement (chassage)

Nous avons voulu voir si ces analogues étaient partiellement métabolisés dès leur apparition dans le cytoplasme. Sur des lots de cellules bactériennes ayant accumulé chacun d'entre-eux radiomarqué durant des temps variables, nous en avons suivi la sortie lors de l'incubation de ces mêmes lots dans un excès de substrat (fig. 33).

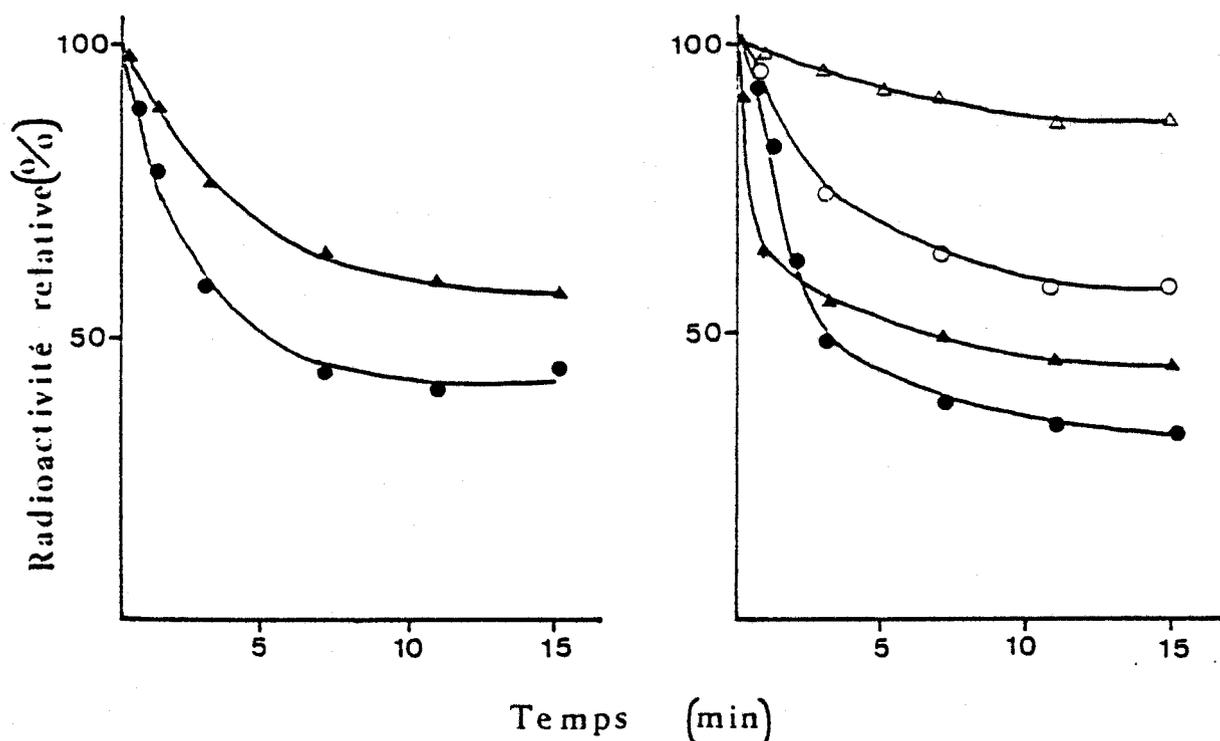


Figure 33 - Cinétiques de sortie du 2DG (a) et de l' α MeG (b) lors de l'incubation dans un excès de substrat (1 mM), de cellules ayant préalablement accumulé chacun d'entre eux (10^{-4} M) durant des temps variables (●—● 5 mn, ▲—▲ 30 mn, ○—○ 40 mn et △—△ 60 mn).

On constate que la sortie des substrats est d'autant moins importante que l'incubation préalable a été longue : les deux analogues structuraux du glucose sont métabolisés par *Rhizobium meliloti*, à des vitesses différentes, et ne peuvent donc plus être déplacés par un excès de substrat. En effet, après 5 mn d'accumulation, 42 % du 2 déoxy-glucose sont assimilés contre 32 % de l' α -méthyl-glucose.

Ceci étant, et ayant pu montrer par ailleurs que l'affinité des analogues pour le système de transport est très différente de celle constatée avec le substrat vrai (4.2.5.), nous avons préféré nous rapprocher des conditions physiologiques naturelles et utiliser directement ou le glucose ou le fructose pour ces études de perméation, et ce durant des temps brefs.

4.2. Mise en évidence du transport actif du glucose et du fructose

4.2.1. Cinétiques d'accumulations du glucose et du fructose

Les cinétiques d'accumulations de ces hydrates de carbone sont réalisées sur des cellules bactériennes cultivées au préalable soit en fermenteur à pH réglé en présence de glucose, soit en fiole agitée en présence de fructose et toujours sur milieu RHB₁ (fig. 34).

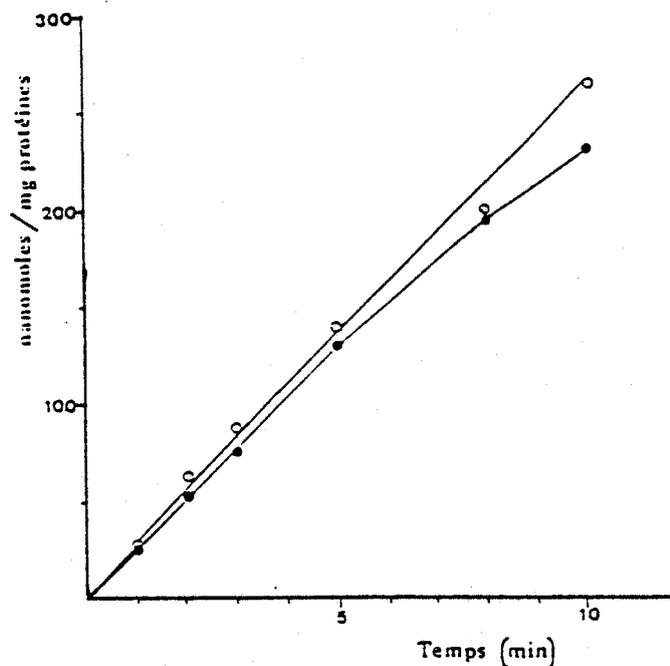


Figure 34 - Cinétiques d'accumulation du glucose (●-●) 10^{-4} M et du fructose (○-○) 10^{-4} M par une suspension de *Rhizobium meliloti* à DO = 1,0, cultivé préalablement sur les substrats respectifs.

On constate que les vitesses initiales d'accumulation de chacun des deux oses sont pratiquement identiques (25 nmoles/mg protéines x mn), soit pratiquement cinq fois supérieures aux vitesses d'accumulation des analogues. Il faut noter, par ailleurs, que *R. meliloti* cultivé en fiole agitée sur RHB₁ additionné de glucose, accumule celui-ci à une vitesse 4 fois moindre à celle mesurée sur des cellules en provenance de fermenteur à pH régulé.

4.2.2. Nature protéique des systèmes de transport

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

Les cellules, précultivées en présence de l'un ou l'autre des substrats, sont alors pré-incubées à 30°C durant des temps différents, avec du chloramphénicol à la concentration finale de 200 µg/ml. Cette concentration est amplement suffisante puisque le chloramphénicol à 50 µg/ml inhibe la synthèse protéique chez *R. meliloti* (COURTOIS, comm. pers.).

Les cellules ainsi pré-incubées sont additionnées de glucose ou de fructose radiomarqué. On effectue alors une cinétique d'accumulation pendant 10 mn. 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 du 100 % d'accumulation).

La figure 35 montre le pourcentage de l'accumulation de chacun des oses, déterminé après 5 mn d'accumulation, en fonction du temps de la préincubation des cellules avec le chloramphénicol, dans le TNP.

Incapables de réaliser leur synthèse protéique, la capacité des cellules à accumuler ces oses diminue avec le temps de contact avec l'inhibiteur. L'inhibition totale est obtenue avec une préincubation d'environ 6 h.

Ces résultats suggèrent que glucose et fructose sont incorporés par un système protéique ayant un "turn-over" d'environ 6 h.

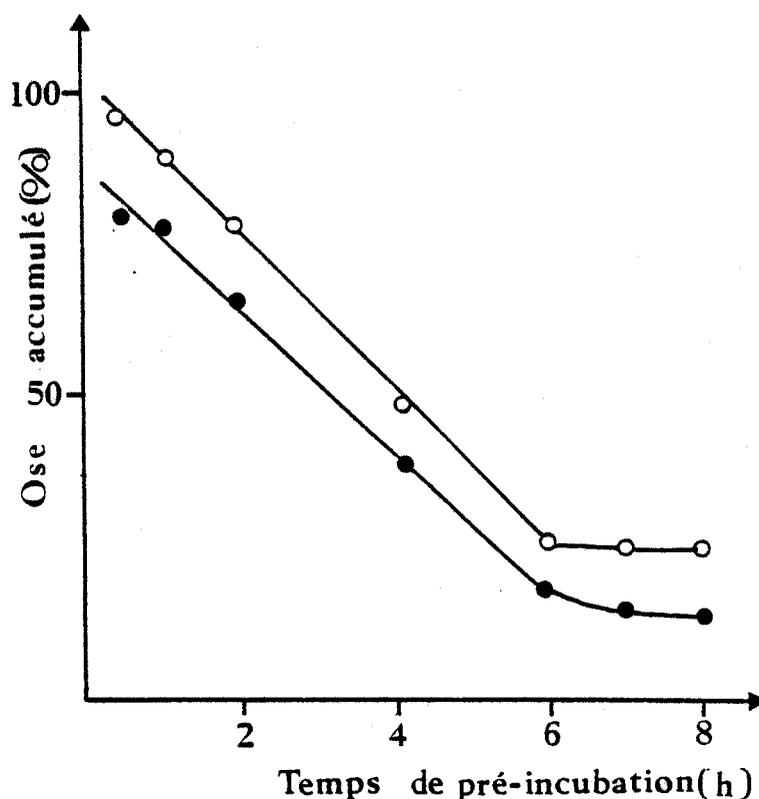


Figure 35 - Effet du chloramphénicol sur l'accumulation du glucose et du fructose chez *R. meliloti*.

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

4.2.3. Mesures des constantes cinétiques

Ces études ont été entreprises en collaboration avec THEODOROPOULOS. Il s'agit de mesurer, à différentes concentrations, les vitesses initiales de l'accumulation du glucose ou du fructose.

L'utilisation des cellules entières nous a très rapidement confronté à des problèmes techniques. En effet, le substrat accumulé est par la suite métabolisé et les valeurs des vitesses d'accumulation relatives mesurées sont probablement inférieures à la normale.

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

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

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 oses utilisées.

A cet effet, nous avons étudié l'accumulation des oses à des concentrations allant de 0,5 à 10 μM par des suspensions cellulaires de densité variable ($\text{DO} = 1$; $\text{DO} = 0,5$ et $\text{DO} = 0,3$). On a constaté que les vitesses d'accumulation sont linéaires durant au moins 1 mn avec une suspension cellulaire de $\text{DO} = 0,3$.

Les vitesses initiales d'accumulation (V_i) sont obtenues en mesurant la radioactivité intracellulaire après avoir incubé la suspension cellulaire ($\text{DO} = 0,3$) avec des D-(U- ^{14}C) oses aux concentrations entre 0,5 et 10 μM durant 10, 20, 40 et 60 secondes.

Les vitesses initiales d'accumulation du glucose et du fructose dépendent de la concentration externe des substrats selon une relation de pseudo-MICHAELIS, les processus sont saturables (fig. 36 et 37). Nous avons également étudié l'effet de chacun d'entre eux sur les vitesses d'accumulation de l'autre (fig. 36 et 37).

De ces résultats, on peut déduire :

- pour la perméase du glucose, une valeur de K_m apparent de 0,7 μM et une V_{max} de 38 nmoles/mg de protéines x mn. La valeur de K_i mesurée avec le fructose est de 1,2 mM ;
- pour la perméase du fructose, une valeur de K_m apparent de 0,2 μM et une V_{max} de 5 nmoles/mg de protéines x mn. La valeur de K_i mesurée avec le glucose est de 2,8 mM.

D'autre part, on constate que chacun de ces substrats est un inhibiteur compétitif de l'accumulation de l'autre. Les fortes valeurs de K_i calculées peuvent laisser supposer que glucose et fructose empruntent des systèmes perméasiques différents.

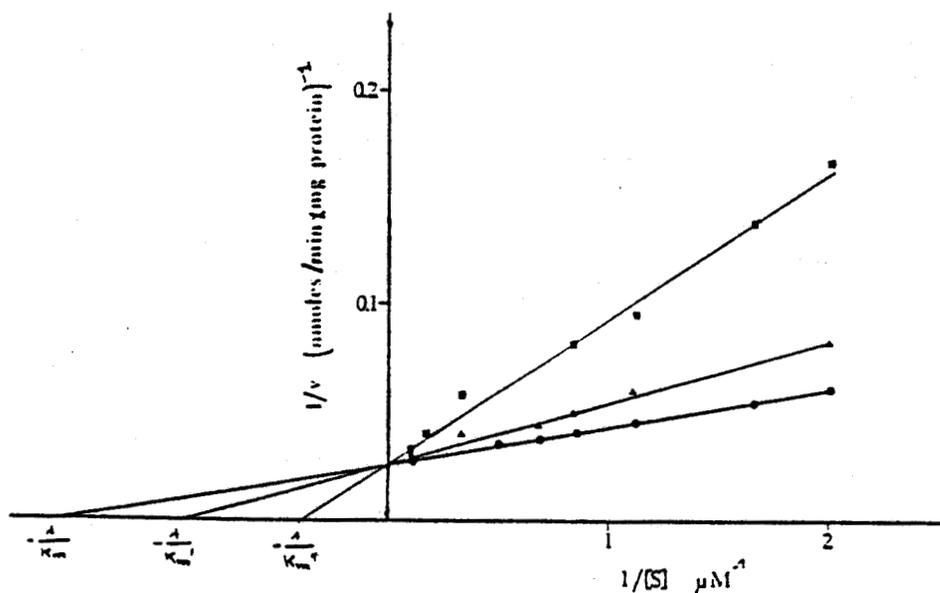


Figure 36 - Représentation selon Lineweaver-Burk de la variation des V_i d'accumulation en fonction de la concentration en glucose, sans fructose (●-●), en présence de fructose 2 mM (▲-▲), en présence de fructose 4 mM (■-■).

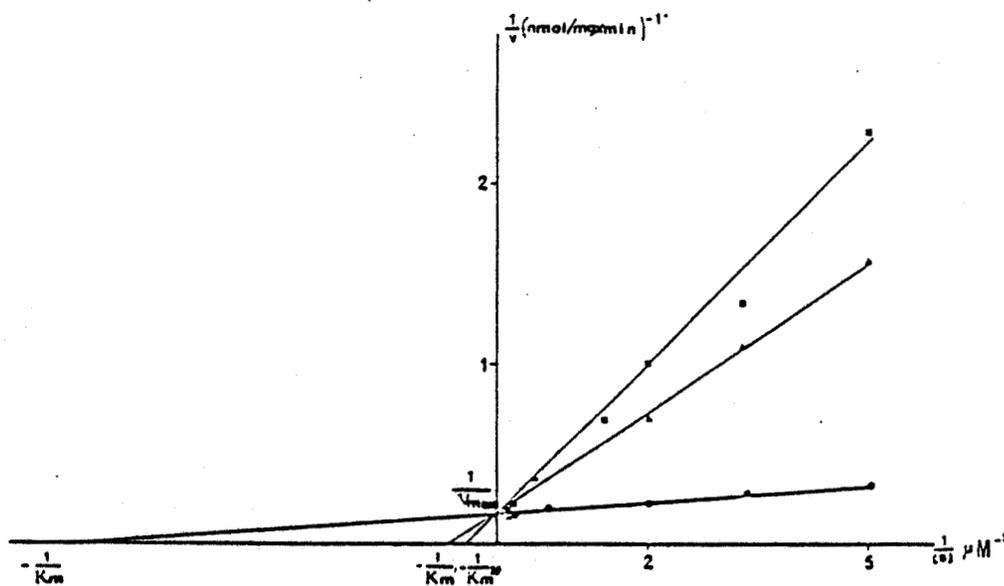


Figure 37 - Représentation selon Lineweaver-Burk de la variation des V_i d'accumulation en fonction de la concentration en fructose, sans glucose (●-●), en présence de glucose 20 mM (▲-▲) en présence de glucose 30 mM (■-■).

4.2.4. Action des inhibiteurs métaboliques

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

Nous avons utilisé les inhibiteurs classiquement employés lors des études de perméation :

- des découplants énergétiques : dinitrophénol (DNP) carbonyl-cyanide-m-chlorophényl-hydrazone (CCCP), azide de sodium (NaN_3) ;
- un inhibiteur de la chaîne des oxydations cellulaires : le cyanure de potassium (KCN) ;
- un inhibiteur du fonctionnement de la glycolyse : le fluorure de sodium (NaF) ;
- un inhibiteur compétitif des phosphates : l'arséniate de sodium (Ars) ;
- un agent complexant les fonctions thiols : la N-éthyl maléimide (NEM) ;
- un agent complexant les ions métalliques : l'éthylène diamine tétraacétique, sel de potassium (EDTA_K).

Ces inhibiteurs sont ajoutés 30 s avant l'addition de substrat. Leur effet à différentes concentrations est rapporté sur les figures 38 et 39a, 39b, 39c et 39d. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition ou en accumulation relative déterminée après 5 mn d'incorporation et par rapport à des cinétiques témoins sans inhibiteur.

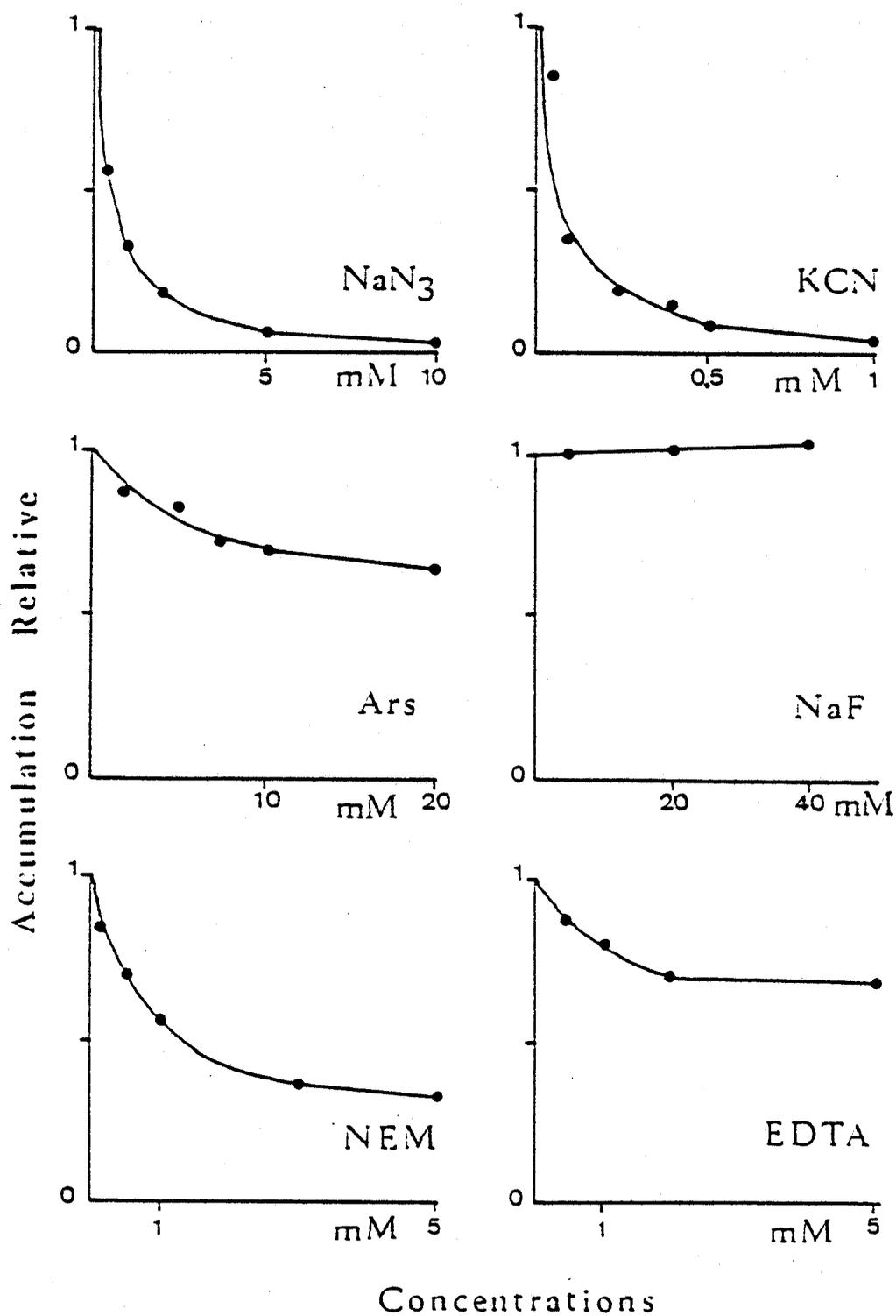
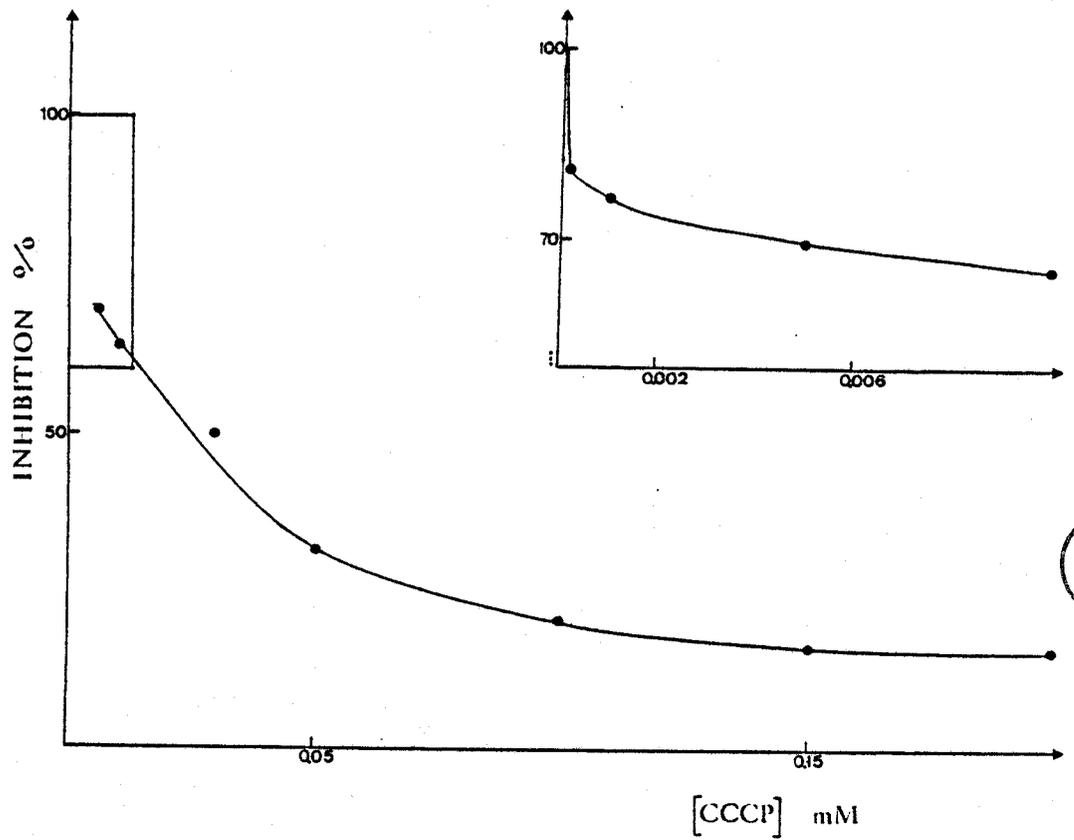
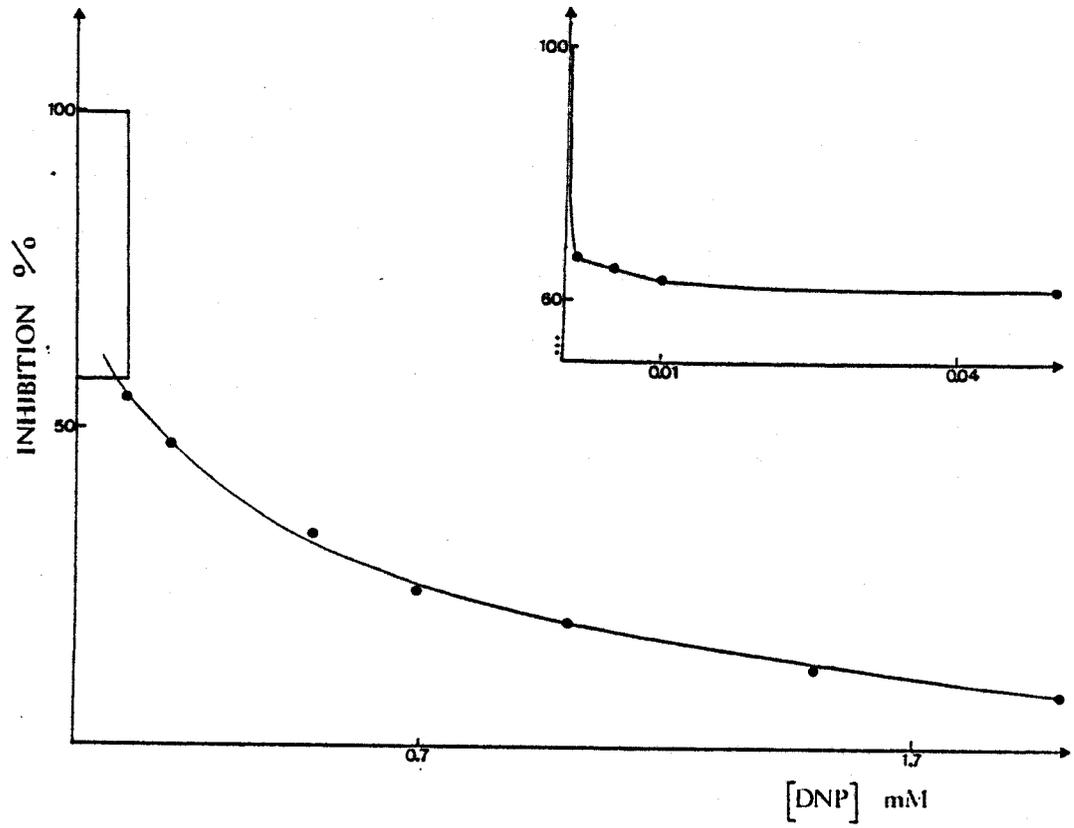


Figure 38 - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la glucose perméase de R. meliloti.



BU
LILLE

Figure 39a - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la fructose perméase de R. meliloti.

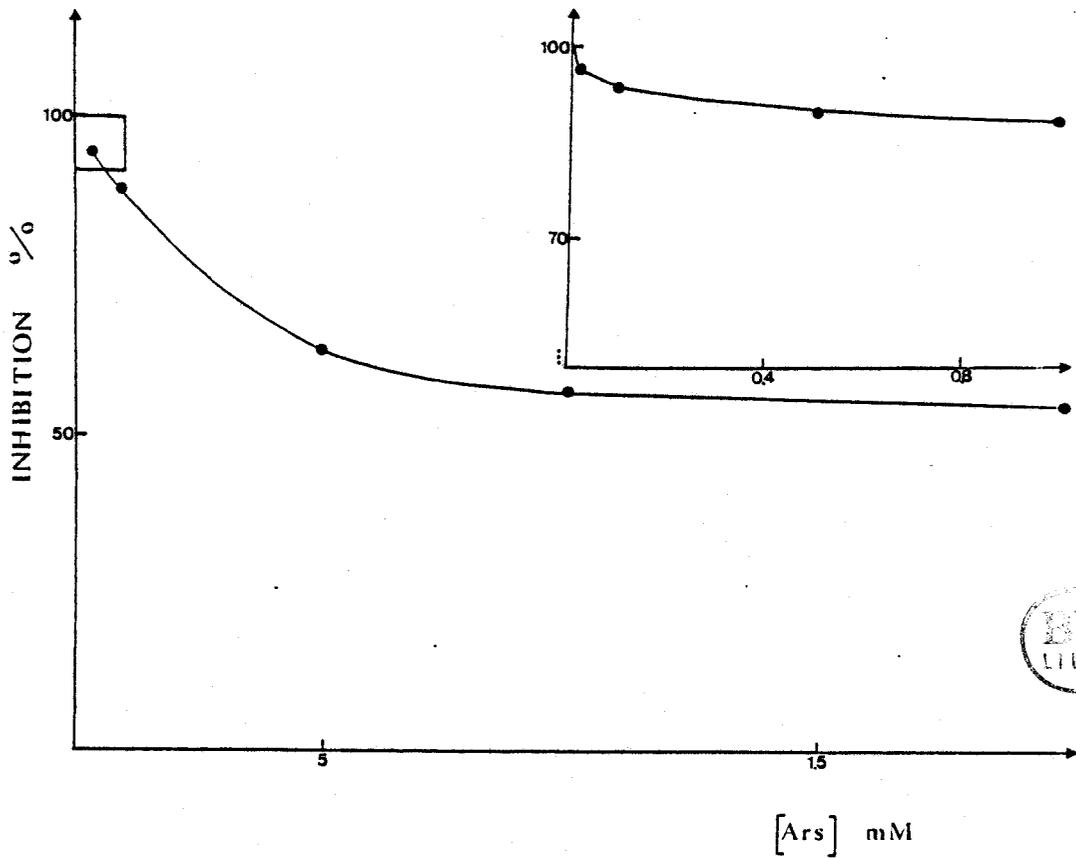
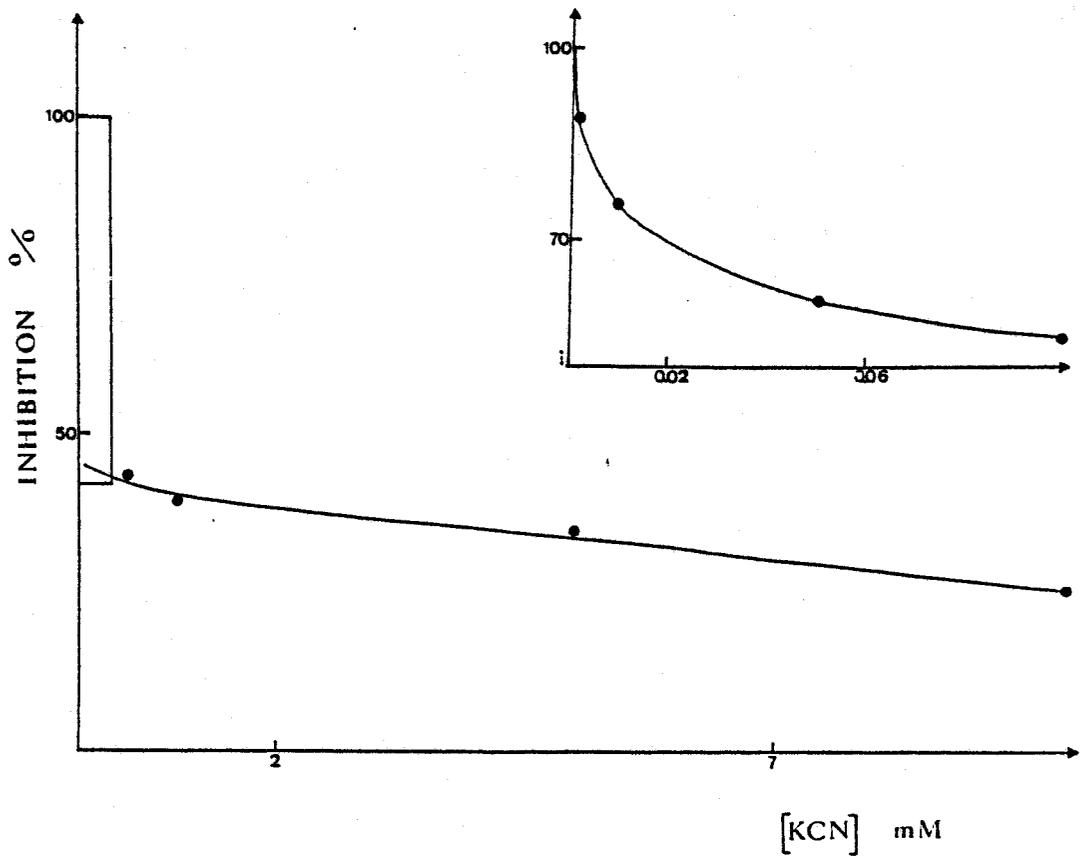


Figure 39b - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la fructose perméase de R. meliloti.

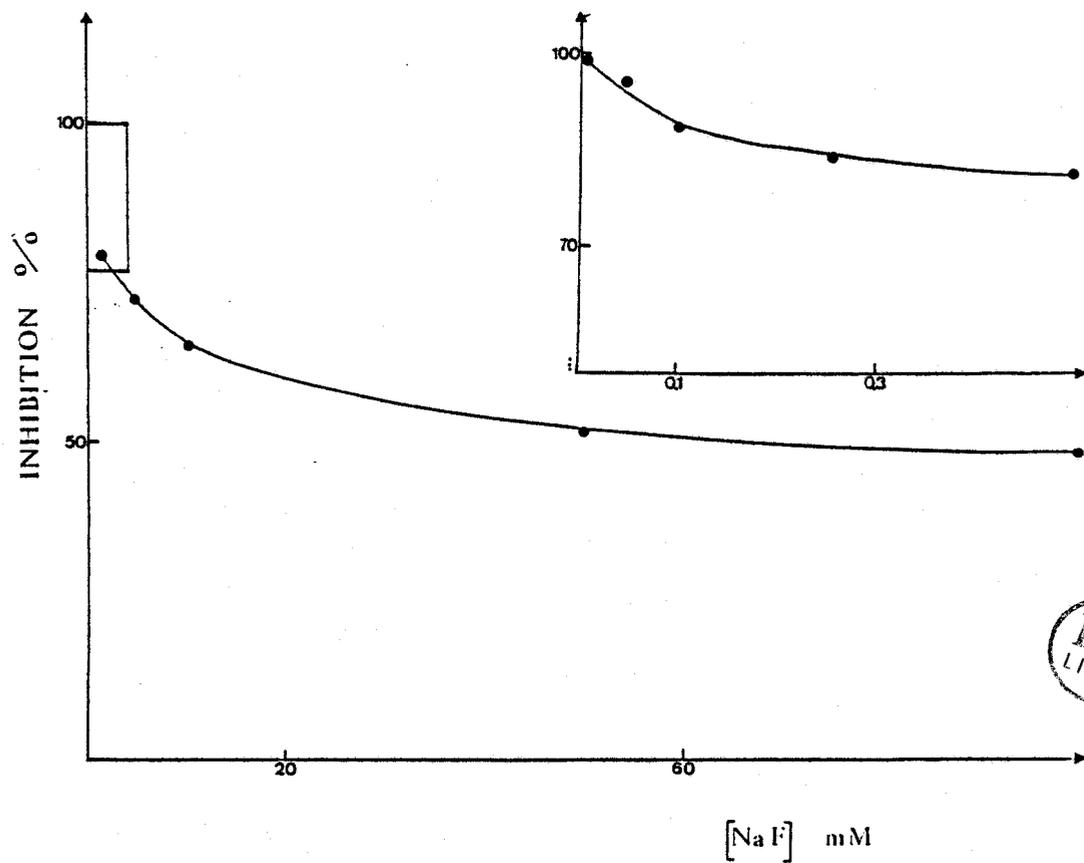
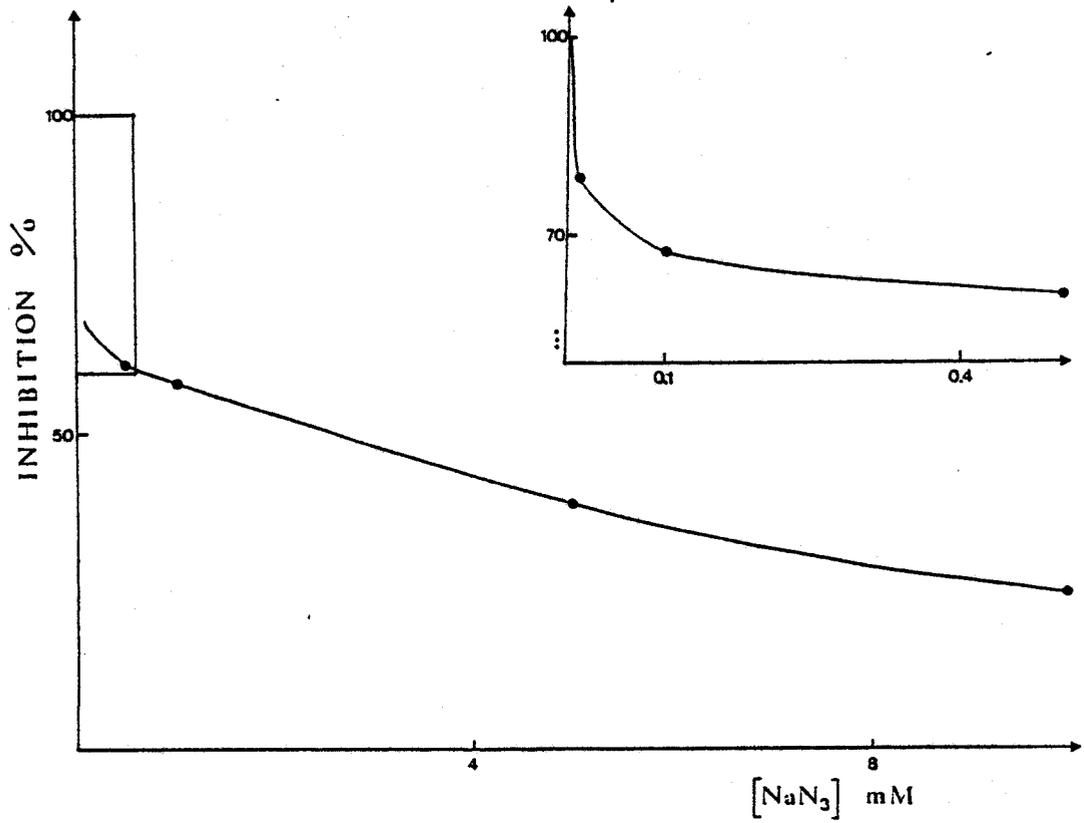


Figure 39c - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la fructose perméase de *R. meliloti*.

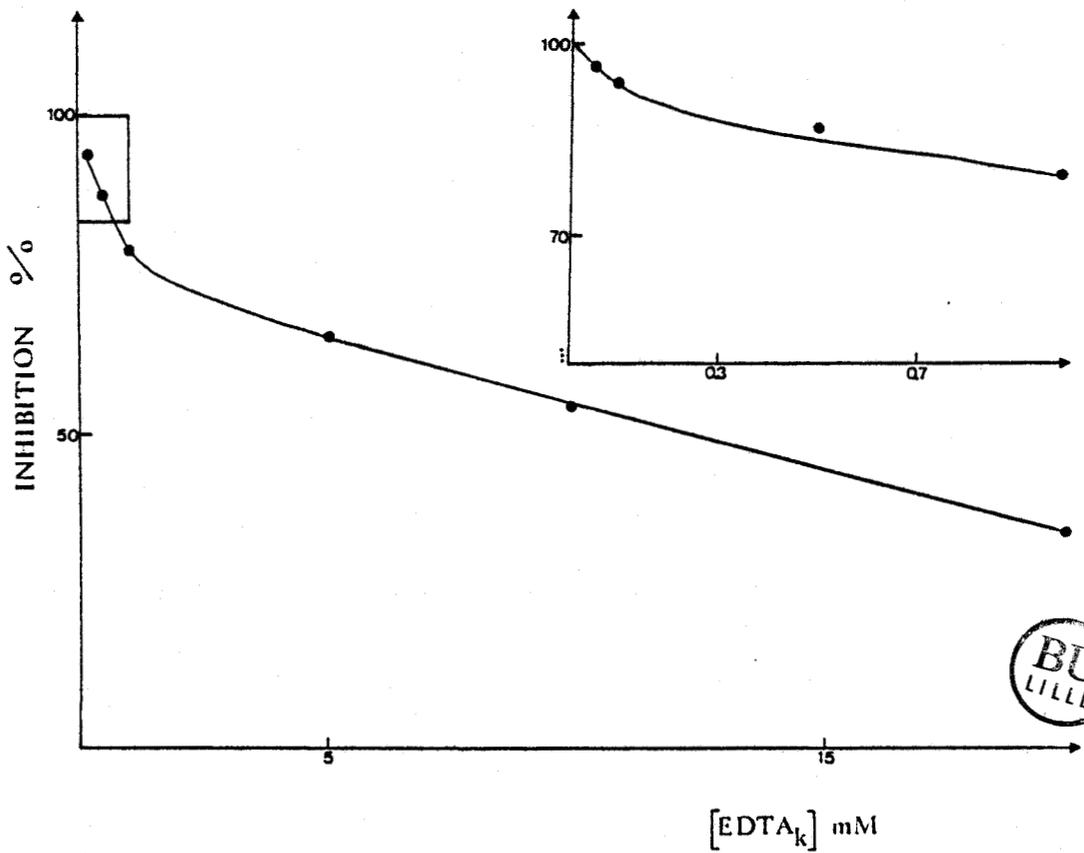
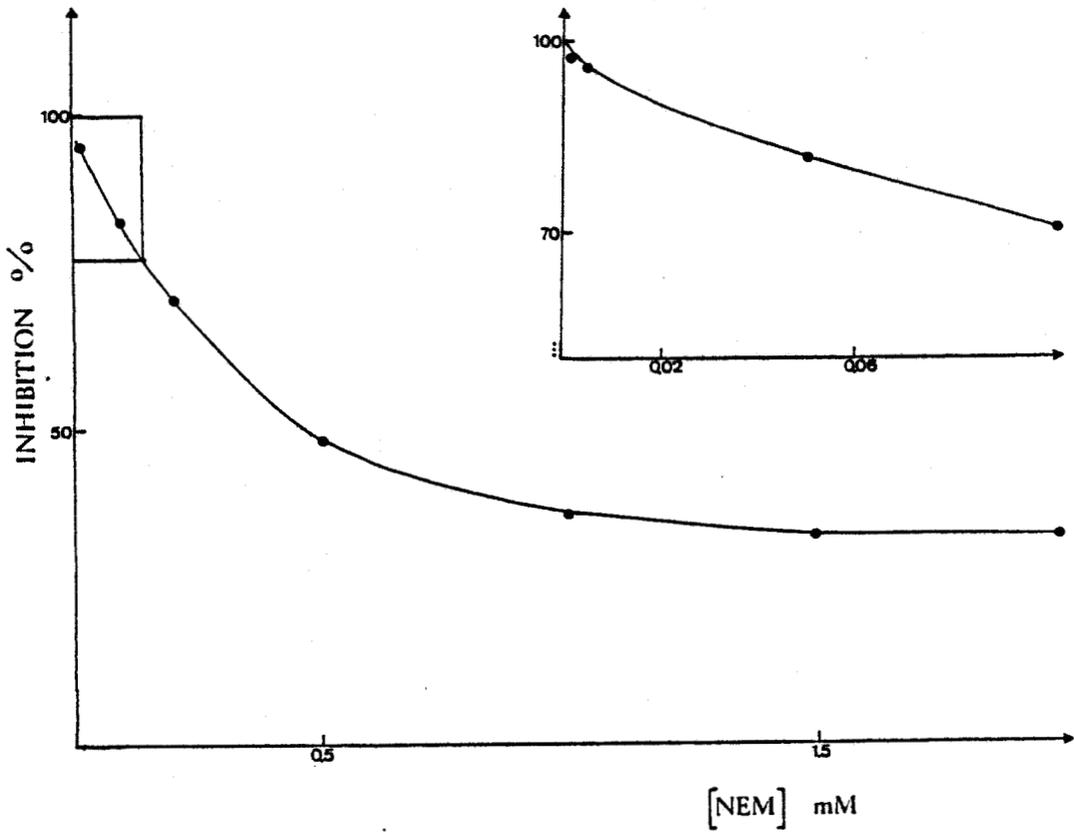


Figure 39d - Effets de différents inhibiteurs à concentrations variables sur l'activité de la fructose perméase de R. meliloti.

L'activité maximale des inhibiteurs métaboliques, exprimée en pourcentage de l'activité résiduelle des perméases, est résumée dans le tableau 30.

Inhibiteurs métaboliques	Transport du glucose		Transport du fructose	
	[C] d'inhibition optimale (mM)	% d'activité résiduelle correspondant	[C] d'inhibition optimale (mM)	% d'activité résiduelle correspondant
DNP	1,5	6,4	2	7,9
CCCP	0,1	3,9	0,15	16,5
NaN ₃	10	3,8	10	24,6
NaF	20	102	50	51,9
KCN	1	4,5	10	25,5
Ars	20	64	20	54,6
EDTA _k	2	70	20	34,14
NEM	5	33	1,5	33,0

Tableau 30 - Action de différents inhibiteurs métaboliques sur le transport du glucose et du fructose.

On constate à propos du fonctionnement des systèmes de transport :

- une inhibition forte
 - . par des découplants énergétiques et le cyanure : ceci traduit leur dépendance vis-à-vis de l'énergisation de la membrane ;
 - . par le NEM : ceci montre l'existence de la fonction thiol dans le site actif.
- une inhibition non significative par l'arséniate ;
- une inhibition nulle ou partielle
 - . par le fluorure : le transport du glucose n'est pas affecté, mais celui du fructose l'est à 50 %, les perméases ne semblent pas PEP dépendantes ;
 - . par l'EDTA : le transport du fructose est plus perturbé que le transport du glucose par la disparition des ions métalliques libres.

4.2.5. Spécificité : action des substrats carbonés simples

Nous avons mesuré l'incidence sur la vitesse d'accumulation du glucose ou du fructose (0,1 mM), de l'addition de quelques substrats carbonés simples, à concentration 200 fois plus élevée (20 mM) et pouvant entrer en compétition avec eux. Les résultats sont comparés à un témoin sans additif définissant le 100 % d'activité.

La lecture de l'incorporation du substrat après 5 mn nous permet d'établir pour chaque produit ajouté le pourcentage d'activité résiduelle (tab. 31).

Substrats carbonés	Pourcentage d'activité résiduelle Transport du fructose	Pourcentage d'activité résiduelle Transport du glucose
Fructose	9,5	59,5
Mannose	21,7	60,9
1-0 Méthyl glucose	52,8	46,8
Arabinose	55,0	92,0
Xylose	58,0	24,0
Glucose	64,0	3,0
Sorbitol	70,5	100,0
3-0 Méthyl glucose	73,0	31,0
Lactose	74,8	97,0
Galactose	76,2	61,0
Ac. gluconique	79,0	82,7
Mannitol	85,5	100,0
Succinate	-	71,2
2 Déoxy-glucose	-	63,2



Tableau 31 - Action des substrats carbonés simples sur la perméation du fructose et du glucose : les substrats entrant en compétition sont ajoutés 30 s avant chacun des deux glucides.

On constate que les effets d'addition de substrats carbonés simples sont quelquefois très variables pour chacune des deux perméases : par exemple le mannose ou l'arabinose ou le xylose. Ceci est en faveur de l'existence de systèmes de transport différents pour le glucose et le fructose chez *R. meliloti*.

En ce qui concerne la perméase au glucose, 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 (DI MARCO et ROMANO, 1985) ont même utilisé ce composé comme analogue du glucose.

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

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

- différent selon l'analogue considéré, l'inhibition la plus importante est causée par le 3-0-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.

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 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.

En ce qui concerne la perméase au fructose, l'inhibition la plus importante est observée avec le mannose ; elle est comparable à celle du xylose pour le glucose. Le mannose doit avoir une bonne affinité pour la perméase au fructose, il serait intéressant d'en mesurer le K_i .

L'arabinose, le xylose, le 1-0-méthyl-glucose ont une affinité moindre mais non négligeable, ils diminuent l'activité de la perméase au fructose de 40 à 50 %.

Les autres substrats testés ont une faible affinité mais tous diminuent un peu la vitesse de transport du fructose.

4.3. Régulation de ces systèmes

4.3.1. Inductibilité

Rhizobium meliloti a été cultivé à partir de différentes sources de carbone et nous avons mesuré, sur les cellules obtenues, l'accumulation du glucose et du fructose après 5 mn d'incorporation. Les résultats sont donnés en pourcentage d'activité relative, le 100 % étant défini par la quantité de substrat accumulé pour un lot de bactéries préparées sur ce même substrat (tab. 32).

Sources de carbone	Transport	
	du glucose (%) par <i>R.m.</i> cultivé sur glucose	du fructose (%) par <i>R.m.</i> cultivé sur fructose
Glucose	100	38,14
Fructose	49,24	100
Lactose	59,84	60
Sorbitol	32,82	77,7
Succinate	8,08	13,3

Tableau 32 - Variations de l'activité perméasique des cellules de *Rhizobium meliloti* (*R.m.*) cultivées en présence de divers substrats carbonés.

Les résultats obtenus nous indiquent que :

- le système est :
 - . soit induit pour 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 des systèmes glucose et fructose perméase.

4.3.2. Répression

Lorsque deux sources de carbone sont présentes simultanément dans un milieu de culture, on peut obtenir soit une seule phase exponentielle de croissance si les deux substrats sont utilisés simultanément, soit deux phases exponentielles séparées par une phase d'attente plus ou moins importante si les deux substrats sont utilisés successivement : c'est le phénomène de diauxie (traditionnellement représenté par l'effet du glucose sur l'utilisation du lactose chez *E. coli*).

Ce phénomène est observé dans tous les cas où les enzymes impliqués dans l'utilisation du deuxième substrat sont inductibles ou constitutifs (comm. pers. de A. DANCHIN) et soumis en présence du premier substrat en concentration limitante à la répression catabolique.

4.3.2.1. Mise en évidence de diauxies lors de culture en biophotomètre

Afin d'apprécier le rôle éventuel de répresseur du succinate sur les systèmes de transport du glucose et du fructose, nous avons essayé de mettre en évidence en biophotomètre des courbes de croissance diauxiques de *R. meliloti* sur des milieux contenant le succinate en concentration limitante additionné de l'un ou de l'autre des hydrates de carbone.

Les essais effectués sont rapportés sur les figures 40 et 41.

On constate qu'à la concentration de 1 g/l, le succinate est un facteur limitant à la croissance de *R. meliloti* dans nos conditions expérimentales (fig. 40). A cette concentration et additionné de glucose ou de fructose à 1 g/l également, il apparaît des courbes de croissance se développant en deux phases exponentielles successives (fig. 41a et 41b). Il faut noter que la phase d'attente apparaît à un niveau de densité cellulaire pratiquement équivalent pour chacun des deux hydrates de carbone et légèrement supérieur à celui observé avec le succinate seul à même concentration. Ceci montre qu'une petite quantité d'hydrates de carbone doit être utilisée simultanément avec le succinate.

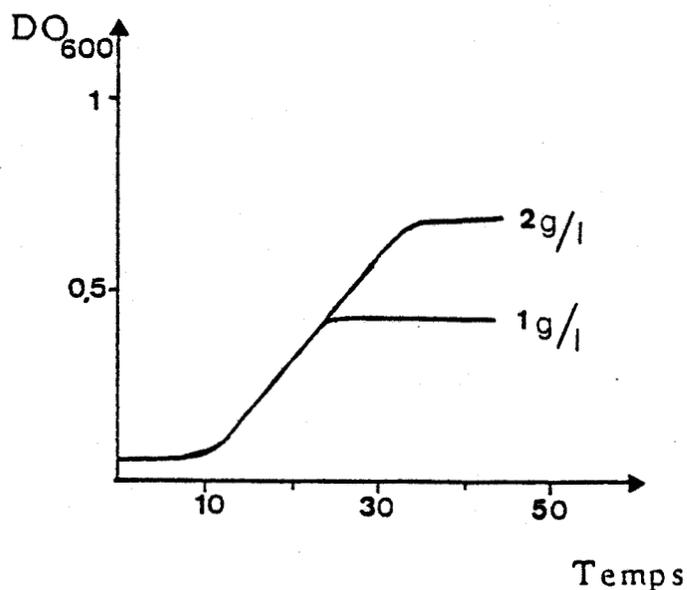


Figure 40 - Croissance de *R. meliloti* sur milieu RHB₁ additionné de succinate de sodium à 1 g/l ou à 2 g/l.

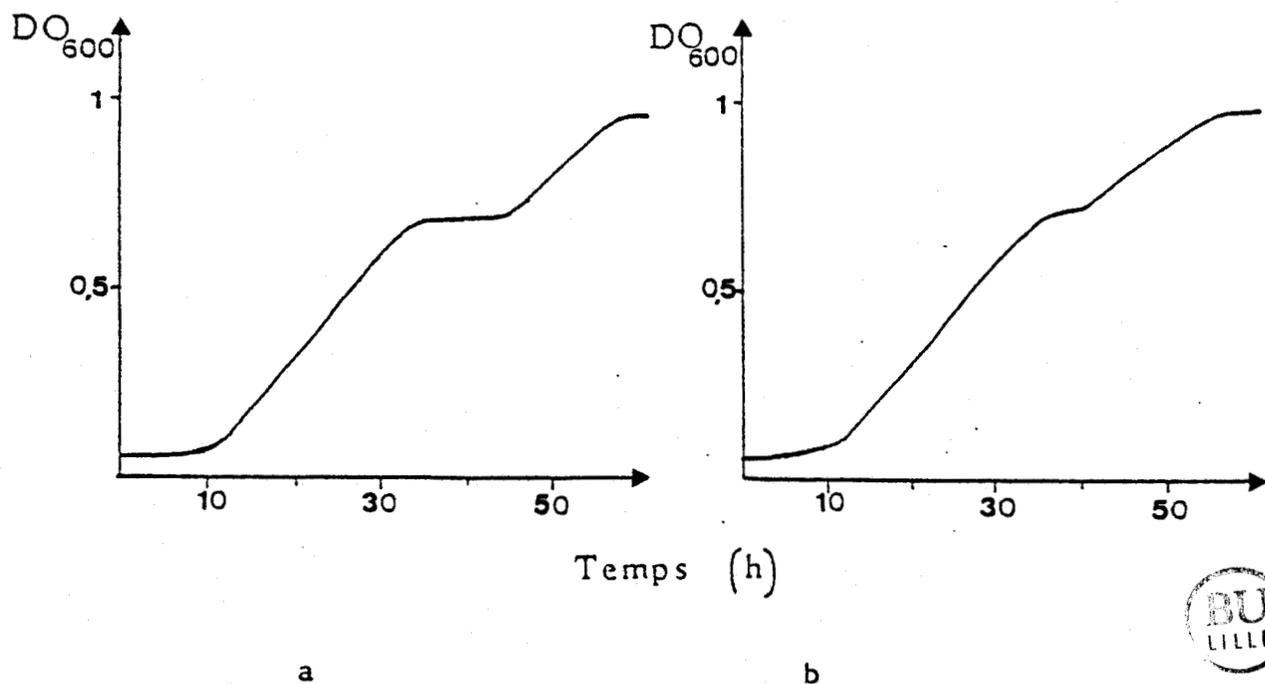


Figure 41 - Croissance de *R. meliloti* sur milieu RHB₁ contenant du succinate de sodium à 1 g/l additionné de glucose à 1 g/l (a) ou de fructose à 1 g/l (b) (Biophotomètre).

4.3.2.2. Mesure de la répression des systèmes de transport du glucose et du fructose par le succinate

La mesure de la variation de l'activité perméasique nécessite la récupération des cellules en quantité suffisante et à des moments précis de la croissance diauxique. Elle ne peut pas être appliquée sur les petits volumes (10 ml au maximum) des cultures en biophotomètre. Dans ces conditions, nous avons choisi de cultiver notre souche en fermenteur et d'en suivre le développement par la mesure de l'oxygène dissous (HORNEZ et coll., 1987).

- Recherche d'un KLa adéquat pour le suivi de la croissance en continu.

Le suivi de la croissance par la mesure en continu par sonde polarographique de l'oxygène dissous nécessite que le KLa :

- reste constant durant la croissance,
- soit inférieur aux besoins des cellules pour leur développement mais soit suffisamment élevé afin d'éviter que l'oxygène ne devienne facteur limitant.

Ces conditions sont réalisées par un KLa de 35 h^{-1} obtenu avec une aération constante de 3 l/mn et une agitation de 180 tours/mn (fig. 42).

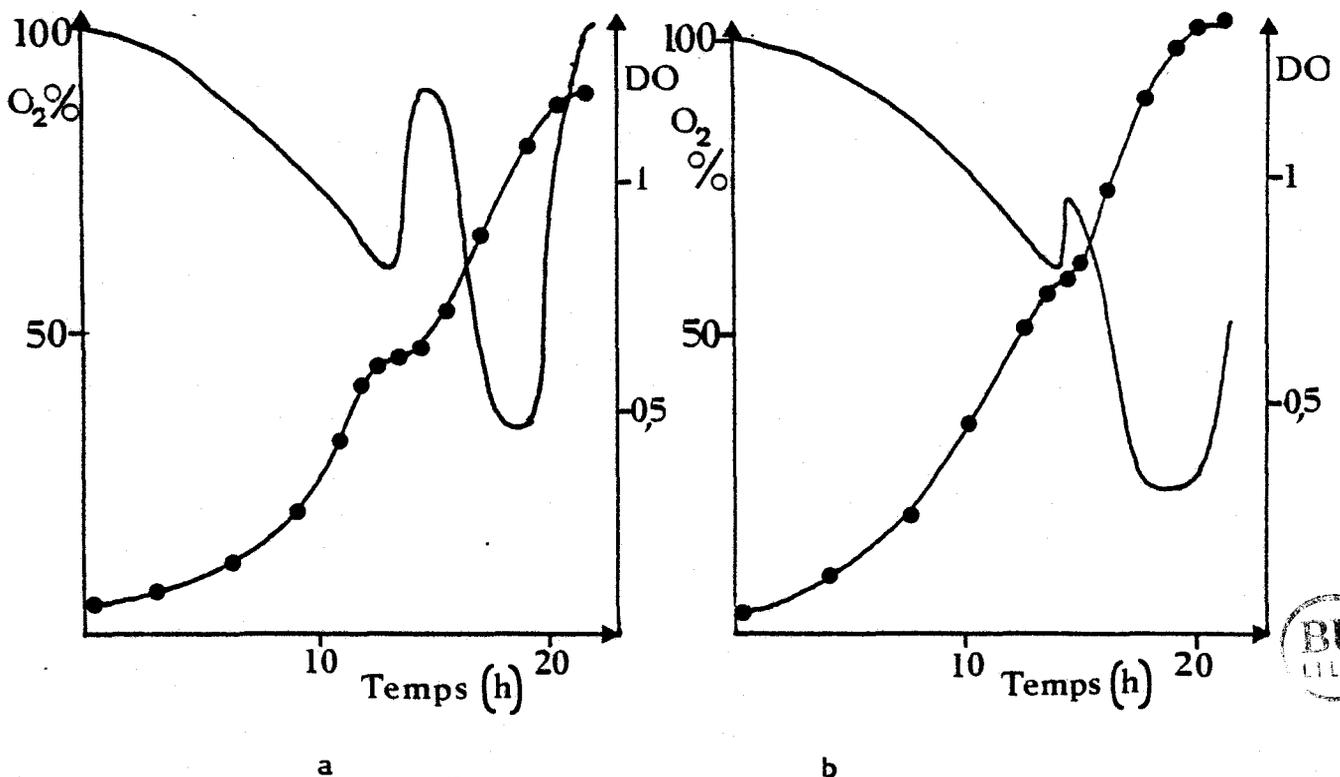


Figure 42 - Suivi de la croissance de *R. meliloti* sur RHB₁ additionné de succinate à 1 g/l plus glucose à 1 g/l (a) ou fructose à 1 g/l (b) et contrôle par mesure de la densité optique à 620 nm (Bioréacteur). (●—●)

On observe que, dans ces conditions, la mesure de l'oxygène dissous reflète parfaitement la croissance microbienne. Cette technique nous permet sans multiplier les prélèvements et donc les risques de contamination de situer exactement les moments intéressants pour contrôler les activités perméases.

- Mesure de la répression du système de transport du glucose.

La souche a été cultivée sur milieu RHB₁ en présence de glucose et de succinate, en concentration limitante (1 g/l). Outre la croissance suivie en continu par la mesure de l'oxygène dissous, que nous n'avons pas représentée pour ne pas surcharger la figure 43, nous avons mesuré la disparition du glucose ainsi que l'activité perméasique de cet ose sur des échantillons régulièrement prélevés (fig. 43).

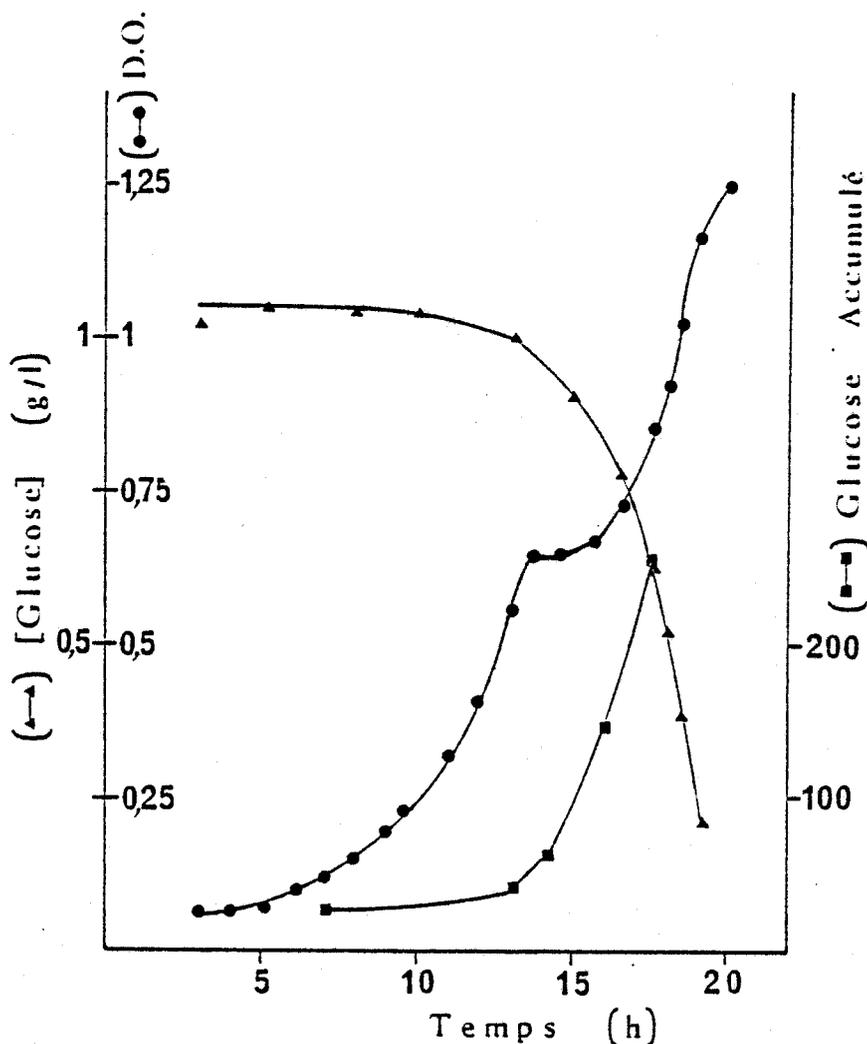


Figure 43 - Culture de R. meliloti sur milieu RHB₁ additionné de succinate en concentration limitante et de glucose (●-● croissance de la souche, ▲-▲ variation de la concentration du glucose, ■-■ activité de la perméase au glucose).

Durant la première phase de croissance, on remarque que la concentration en glucose dans le milieu varie très peu. L'activité perméasique est 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 plus probablement par d'autres systèmes de transport d'hydrates de carbone insensibles à l'action inhibitrice du succinate.

A l'opposé, la seconde phase de croissance est caractérisée par une diminution croissante de la concentration en glucose dans le milieu en même temps qu'une augmentation considérable de l'activité perméasique.

- Mesure de la répression du système de transport du fructose.

La même expérience réalisée sur le couple fructose-succinate est présentée sur la figure 44.

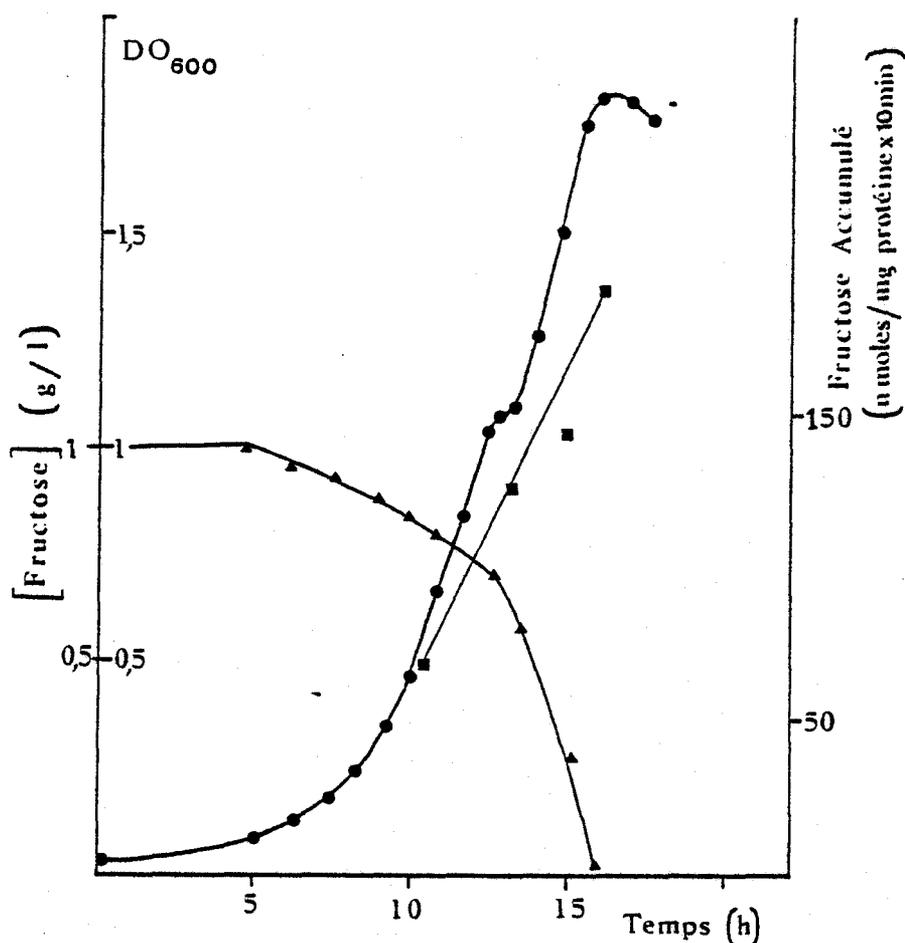


Figure 44 - Culture de *R. meliloti* sur milieu RHB₁ additionné de succinate en concentration limitante et de fructose (●-● croissance de la souche, ▲-▲ variation de la concentration du fructose, ■-■ activité de la perméase au fructose).

On observe aussi, dans ce cas, une courbe de croissance diauxique mais avec une phase de latence intermédiaire plus courte. Le fructose est légèrement utilisé dès la première phase de croissance et l'activité perméase n'est pas nulle. Lors de la seconde phase de croissance, l'activité perméasique est nettement supérieure, le fructose est consommé rapidement.

4.3.2.3. Disparition du phénomène de diauxie par addition d'AMP cyclique

L'AMP_c est l'un des médiateurs secondaires servant de relais aux contrôles généraux de l'activité des gènes et de leurs produits. Chez les bactéries, la première indication de son rôle est décrite par MAKMAN et SUTHERLAND en 1965. On peut considérer aujourd'hui que l'un des effets de l'AMP_c est de permettre par un contrôle positif l'expression d'opérons responsables du catabolisme et ceci par l'intermédiaire de son récepteur CAP : le complexe CAP-AMP_c serait un activateur de la transcription des opérons cataboliques.

La croissance bactérienne a donc été à nouveau suivie en biophotomètre sur milieu RHB₁ additionné de succinate (1 g/l), de glucose ou de fructose (1 g/l) et de l'AMP cyclique à la concentration finale de 10 mM (fig. 45).

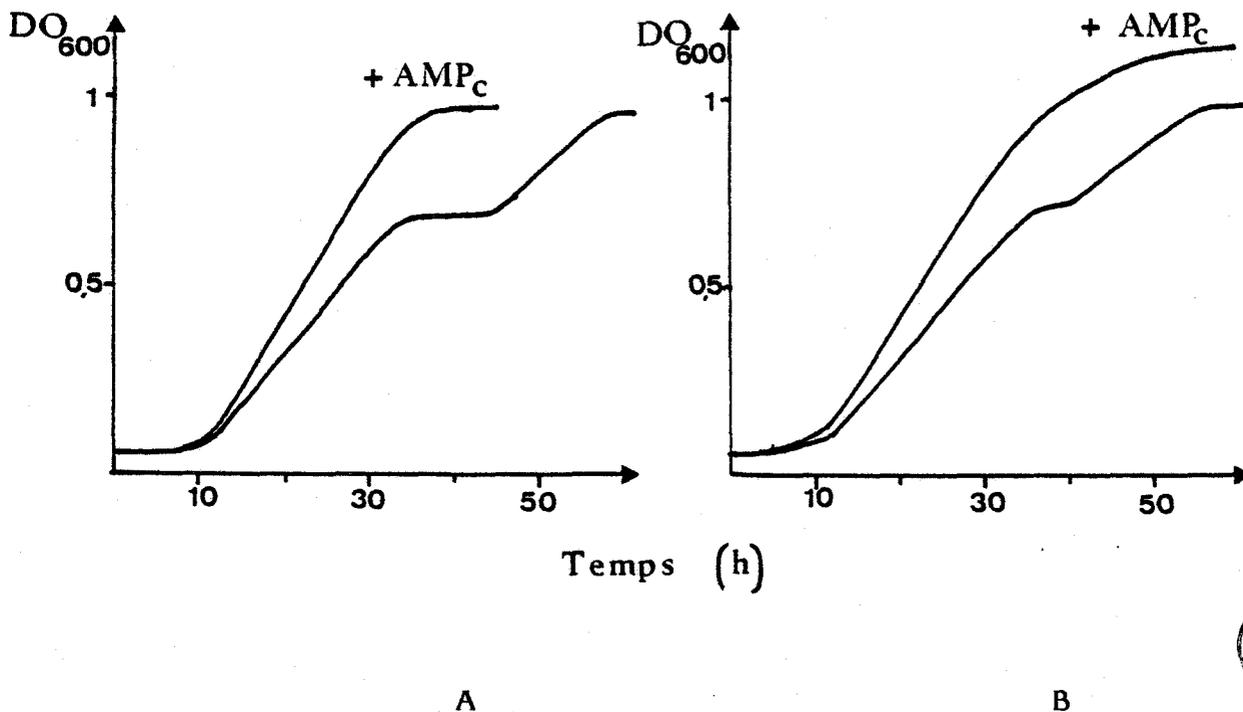


Figure 45 - Croissance suivie au biophotomètre de R. meliloti sur milieu RHB₁ additionné de succinate (1 g/l) et de glucose (A) ou de fructose (B).

Dans ces conditions, on observe dans chacun des cas la disparition de la diauxie par l'AMP_c. On constate de plus que les temps de génération sont plus courts.

Nous avons ainsi mis en évidence la répression catabolique AMP cyclique dépendante, par le succinate, des enzymes constitutifs glucose perméase et fructose perméase chez **R. meliloti**.

4.4. Conclusion

Nous avons montré que l'emploi d'analogues structuraux du glucose n'est pas adapté à l'étude de son mécanisme de transport, et ceci dans la mesure où ces produits pénètrent à une vitesse beaucoup plus faible que le substrat vrai et qu'ils sont métabolisés. L'étude du pool accumulé à partir d' α -méthyl-glucose montre qu'il s'accumule dans le cytoplasme essentiellement de l' α -méthyl-glucose et son dérivé 6 phosphorylé. Les expériences de déplacement démontrent que le substrat est utilisé : l' α -méthyl-glucose observé est le substrat non transformé durant son transport, son dérivé 6 phosphorylé est un intermédiaire de sa voie de dégradation. Il apparaît, de plus, un produit non identifié restant à l'origine dans notre système de séparation.

La présence d'un produit à l'origine a également été observée chez **R. leguminosarum** (GLENN et coll., 1984a). 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 mn. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ce pic serait composé de la radioactivité liée à des protéines.

Les systèmes de transport du glucose et du fructose sont chez **R. meliloti** des transports actifs dont le fonctionnement est lié à l'énergisation directe de la membrane plasmique par le transport de protons et d'électrons de la chaîne respiratoire (effet des découplants énergétiques et de l'ion cyanure) ; l'ATP intracellulaire n'intervient que très peu (effet de l'arséniate). Chez les bactéries, le système respiratoire et la phosphorylation oxydative siègent dans la membrane plasmique qui est également le support de tous les systèmes de transport. La pile à protons pourrait avoir d'autres usages que la synthèse de l'ATP et en particulier avoir un rôle pivot direct dans le fonctionnement des mécanismes de transport.

Même si l'effet du fluorure de sodium est plus marqué pour la perméase au fructose, le transport des hydrates de carbone ne semble pas PEP-dépendant, en accord avec les résultats des autres auteurs sur d'autres espèces de **Rhizobium** (cf. Introduction, 4.2.2.1.).

Chacune des perméases possède des groupements -SH qui doivent rester libres pour le bon fonctionnement du transport (effet du NEM). Celui-ci dépend également de la présence d'ions métalliques, d'autant plus pour le transport du fructose que du glucose (effet de l'EDTA_K).

Le glucose et le fructose possèdent leur propre système de transport, certainement constitutif, et dont les constantes cinétiques sont très proches. Il n'est dès lors pas possible d'expliquer l'accumulation de l'acide 2 céto-gluconique dans les milieux d'incubation additionnés de glucose, par un défaut de fonctionnement de sa perméase permettant l'accumulation du substrat au voisinage des déshydrogénases membranaires.

Les perméases du glucose et du fructose subissent la répression catabolique AMP_C dépendante par le succinate de sodium. C'est la première fois que ce phénomène est décrit chez **Rhizobium**. Le malate et le fumarate, autres acides dicarboxyliques du cycle de Krebs, montrent, dans des expériences qui ne sont pas décrites ici, une utilisation simultanée de leur mélange avec le glucose et le fructose.

La répression des systèmes de transport des hexoses par des intermédiaires du cycle de Krebs a déjà été signalée chez **Rhizobium** (cf. Introduction, 4.2.2.3.) mais n'est jamais levée par l'AMP_C lorsqu'il est employé. Jusqu'alors les auteurs n'ont pas parlé de répression catabolique chez **Rhizobium**. Il faut dire que son mécanisme est encore mal connu : la relation de cause à effet entre la répression catabolique et le niveau intracellulaire de l'AMP_C est mise en question de plus en plus souvent et il serait certainement plus opportun de considérer que la modulation des effets de l'AMP_C est la conséquence plutôt que la cause de la répression catabolique (ULLMANN et DANCHIN, 1986).

C O N C L U S I O N

Rhizobium développe sur les Légumineuses une symbiose active se traduisant par la nutrition azotée du couple bactérie- plante aux dépens de l'azote atmosphérique. De nombreux travaux sont réalisés concernant les aspects génétiques et biochimiques de la fixation de cet azote par réduction. Le métabolisme hydrocarboné n'a été abordé en détail que beaucoup plus tardivement et l'analyse bibliographique montre que **R. meliloti**, du groupe d'inoculation de la luzerne, est resté peu travaillé et peu connu, surtout en ce qui concerne le métabolisme énergétique.

Nous avons pu, au cours de nos travaux, montrer que :

- **R. meliloti** infecte les plantules aseptiques de luzerne en induisant la formation de nodules sur les racines. Leur observation au microscope électronique fait apparaître les profondes transformations morphologiques de la bactérie lors de sa maturation en bactéroïde : la cellule bactérienne, séquestrée dans une membrane d'origine végétale, se déforme et il apparaît, dans son cytoplasme, des formations membranaires surnuméraires se développant parallèlement aux structures pariétales du microorganisme.

- **R. meliloti** possède une particularité métabolique le distinguant de l'ensemble des souches des autres groupes d'inoculation à croissance rapide et donc utilisable pour sa classification : dans les conditions classiques du laboratoire, son incubation en présence de fructose fournit des milieux très visqueux, riches en polysaccharides, sans modification de pH. Par contre, en présence de glucose, l'acidification des milieux est importante.

Cette acidification n'est due qu'à l'accumulation d'un seul produit acide dont l'étude du comportement électrophorétique et chromatographique, la nature des dérivés 2-4 dinitrophényl-hydrazones et quinoxalinols ainsi que le spectre infra-rouge l'identifient à l'acide 2 céto-gluconique.

- La voie du 2 céto-gluconique est catalysée par des enzymes membranaires inductibles : la glucose déshydrogénase et la gluconate déshydrogénase. Ces enzymes ont des constantes de dissociation élevées (K_m apparent = 0,35 et 0,54 mM respectivement) et fonctionnent efficacement dès lors que les concentrations en glucose sont importantes. L'acide 2 céto-gluconique apparaît dans tous les cas d'incubation en présence de glucose mais disparaît par la suite si la concentration en glucose est limitante. Il peut donc être au besoin utilisé par la cellule. L'activité 2 céto-gluconate réductase cytoplasmique mesurée laisse penser qu'il peut entrer tel quel dans la cellule pour y être métabolisé par la voie de dégradation de l'acide gluconique.

Le fonctionnement de cette voie varie aussi en fonction des conditions de transfert en oxygène durant le développement des cellules bactériennes. L'oxygène, comme pour la nitrogénase, semble être un élément régulateur et on peut penser que la voie du 2 céto-gluconique fonctionne lors de la symbiose, condition dans laquelle la leghémoglobine limite les pressions partielles en gaz.

- On retrouve dans le cytoplasme de *R. meliloti* les activités, plus ou moins importantes, de la totalité des enzymes caractéristiques des voies de dégradations classiques des hydrates de carbone : Embden-Meyerhof-Parnas, Dickens-Horecker et Entner-Doudoroff et ceci que les cellules bactériennes soient cultivées en présence de glucose ou de fructose. Mais l'isolement d'un mutant phosphoglucose isomérase négative et l'étude de ses caractéristiques ont montré que seule la voie d'Entner-Doudoroff permet d'assurer la croissance de *R. meliloti*. Le glucose s'écoule en grande partie par cette voie, le fructose doit remonter la glycolyse jusqu'au glucose-6-phosphate d'où il est métabolisé comme le glucose.

Les autres voies doivent très certainement fournir des précurseurs alimentant les voies anaboliques : par exemple la synthèse des bases puriques ou pyrimidiques à partir d'intermédiaires de la voie des pentoses.

L'analyse des quotients respiratoires, dans de bonnes conditions de respiration, indique que le cycle des acides tricarboxyliques est fonctionnel.

- Les études respirométriques en présence de fructose ou de glucose montrent, en cas de surcharge de ce dernier, un défaut de son oxydation complète. Ceci n'est pas lié à la saturation d'un mécanisme de transport permettant, par exemple, de laisser s'accumuler le glucose dans l'espace périplasmique jusqu'à une concentration telle que la glucose déshydrogénase et la gluconate déshydrogénase en transforment une partie en acide 2 céto-gluconique. En effet, la comparaison des perméases du glucose et du fructose nous montre que chacun de ces oses est véhiculé dans le cytoplasme des cellules par un système propre, constitutif, dont les constantes de dissociation sont de l'ordre du μM (K_m apparent 0,7 et 0,2 μM respectivement) et les vitesses de fonctionnement proches (V_{max} 38 et 5 nanomoles de substrat transporté par mg protéines et par mn respectivement).

Ces enzymes véhiculent chacun des substrats sans les transformer, leur fonctionnement est lié à l'énergisation directe de la membrane cytoplasmique par le transport des protons et des électrons de la chaîne respiratoire.

Ces systèmes subissent la répression catabolique par le succinate. On sait, par ailleurs, que cet acide dicarboxylique est fourni en quantité importante par les Légumineuses dans les nodules infectés (cf. Introduction : 5). Les bactéroïdes peuvent l'accumuler activement comme les cellules bactériennes libres (cf.

Introduction : 3.2.2. et 4.2.3.). Par contre, ces bactéroïdes ont perdu, par rapport aux cellules libres, la capacité de transporter activement les hexoses (cf. Introduction : 3.2.1.). Dans ces conditions, on peut penser que l'acide 2 céto-gluconique, qui peut être formé sans pénétration préalable du glucose dans le cytoplasme, représente une possibilité pour la cellule bactérienne en symbiose de consommer, malgré la disparition de certaines de ses perméases, le glucose fourni par la plante.

Il faut noter, par ailleurs, que le succinate ne réprime pas les enzymes impliqués dans le catabolisme des glucides. Nous sommes en présence d'un système de régulation tout à fait original.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de construire pour **Rhizobium meliloti** le schéma métabolique suivant (fig. 46).

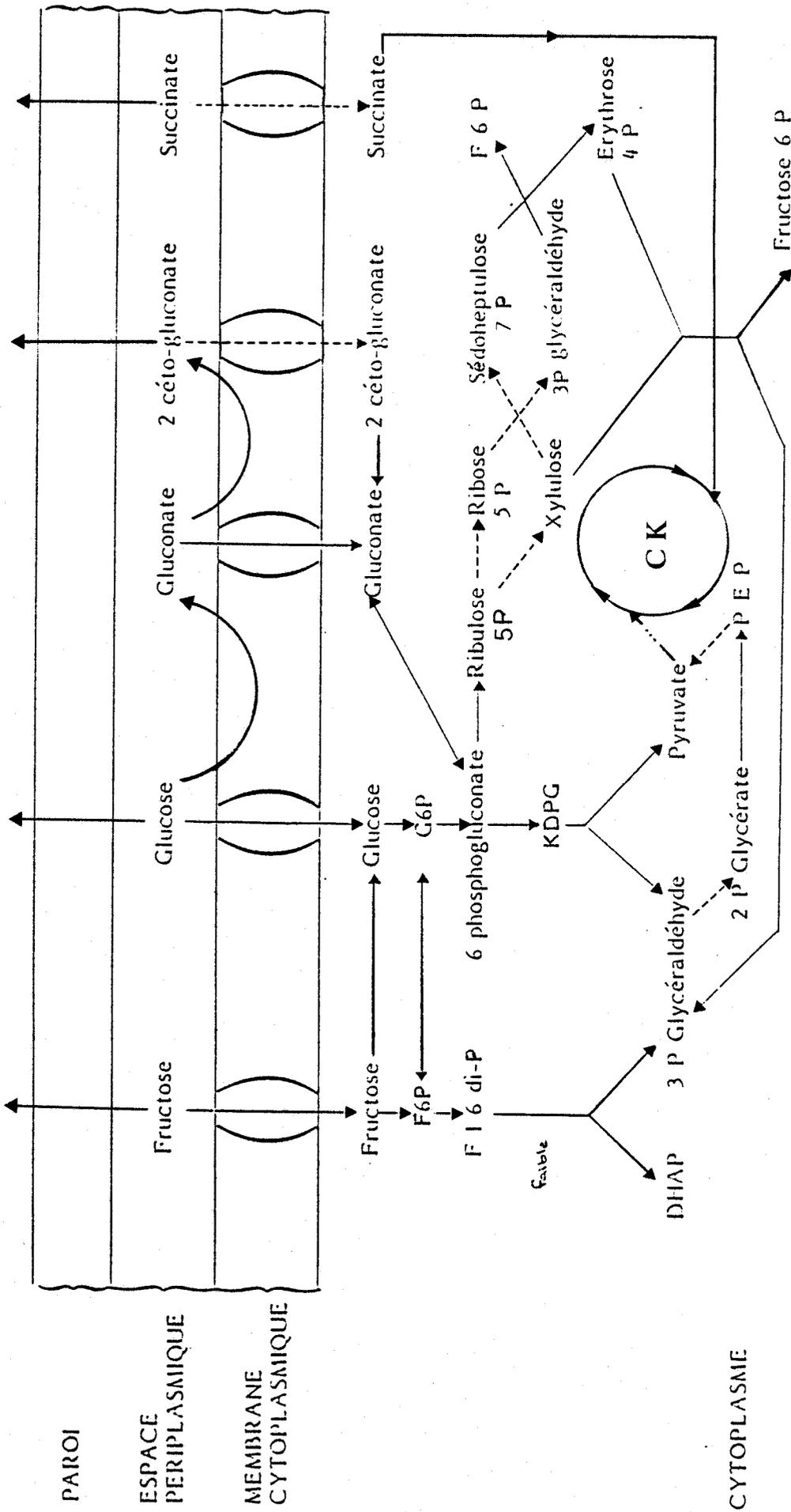


Figure 46 - Voies métaboliques empruntées par *Rhizobium meliloti* en présence de différents hydrates de carbone.

(—) : activités enzymatiques étudiées ;

(- - -) : activités enzymatiques non étudiées.



R E S U M E

Le Mémoire décrit l'utilisation du glucose et du fructose chez **Rhizobium meliloti** : dégradation, transport et régulations.

Après une description rapide du genre **Rhizobium** et de ses propriétés symbiotiques, une synthèse bibliographique est présentée, concernant l'utilisation des glucides et dérivés ainsi que celle des acides organiques à la fois chez les bactéries libres et chez les bactéroïdes, issus de la maturation de la cellule bactérienne en symbiose avec les Légumineuses.

Réalisée en microscopie électronique, une étude préliminaire de l'association **Rhizobium meliloti** - luzerne montre que lors de l'infection de la plante, la bactérie subit d'importantes modifications morphologiques. Elles se traduisent d'une part par des déformations dues à l'acquisition d'une certaine plasticité de la paroi et d'autre part à la mise en place de membranes surnuméraires accompagnant la transformation de la cellule en bactéroïde.

Tous les résultats présentés, par ailleurs, concernent des manipulations sur **Rhizobium** en culture libre.

L'observation de la croissance de la souche M5N1 de **R. meliloti** en présence de différents substrats carbonés permet de les classer en deux types :

- les uns, acidifiants, dont le glucose, le mannose, le galactose.
- les autres permettant le maintien du pH proche de la neutralité dont le fructose, le mannitol, le sorbitol.

L'étude du comportement des espèces de **Rhizobium** à croissance rapide, en présence d'un représentant de chacun de ces deux types de substrat (glucose et fructose), a permis de définir l'acidification en présence de glucose dans les milieux d'incubation comme un caractère spécifique du groupe d'inoculation de la luzerne.

Cette acidification est due exclusivement, dans nos conditions, à l'accumulation d'acide 2 céto-gluconique identifié :

- par ses caractéristiques de migration en électrophorèse et en chromatographie dans différents systèmes solvants ou tampons,
- par l'identification de ses dérivés 2-4 dinitrophénylhydrazones et quinoxalinols,
- par son spectre infra-rouge.

Les enzymes participant à cette voie du 2 céto-gluconique sont deux déshydrogénases membranaires inductibles : la glucose déshydrogénase à NAD^+ ou NADP^+ (pHmax : 6,6) et la gluconate déshydrogénase à NADP^+ (pHmax : 5,8). Leur affinité est faible pour leur substrat (respectivement K_m apparent = 0,35 mM, V_{max} = 500 nanomoles de glucose dégradé par mn et par mg de protéines ; K_m apparent = 0,54 mM, V_{max} = 0,33 nanomoles de gluconate dégradé par mn et par mg de protéines). Leur spécificité est large : la glucose déshydrogénase fonctionne sur le

galactose, le mannose, le glycérol ; le galactose en est un inhibiteur compétitif. Leur efficacité est d'autant plus grande que la concentration en glucose des milieux d'incubation est élevée, elle est également favorisée par les faibles pressions partielles en oxygène.

L'étude du développement de *R. meliloti* en présence de glucose ou de fructose montre que les cinétiques de croissance sont comparables à la fois sur milieu complet et sur milieu synthétique. Par ailleurs, les rendements moléculaires calculés sont identiques : on peut donc dire que *R. meliloti*, pour se multiplier, utilise chacun de ces deux substrats avec la même efficacité.

Les mesures respirométriques, effectuées sur des suspensions cellulaires préalablement épuisées de leurs réserves énergétiques, montrent que, en faible concentration, glucose et fructose sont oxydés totalement en dioxyde de carbone et en eau. Par contre, lorsque la concentration augmente, le quotient respiratoire diminue régulièrement. Le phénomène est d'autant plus marqué pour le glucose que pour le fructose. L'acide 2 céto-gluconique apparaît dans les milieux d'incubations contenant du glucose mais jamais dans ceux contenant du fructose. Par contre, dans ce dernier cas, il apparaît dans les cellules des éléments résultant d'un métabolisme biosynthétique.

L'activité de la totalité des enzymes clés des voies classiques de dégradation des glucides (Emden-Meyerhof-Parnas, Dickens-Horecker, Entner-Doudoroff) a pu être mise en évidence et ceci à des degrés différents. La recherche des intermédiaires métaboliques après des temps brefs d'assimilation des glucides a essentiellement abouti à l'identification dans le cytoplasme cellulaire des substrats eux-mêmes, de dérivés monophosphorylés et d'acides carboxyliques du cycle de Krebs mais n'a jamais permis la mise en évidence de dérivés diphosphorylés.

L'isolement d'un mutant métabolique phosphoglucose isomérase négative et son incapacité à se développer en présence de fructose indique que le glucose et le fructose sont dégradés lors de la croissance microbienne par la voie d'Entner-Doudoroff. Il faut noter, dans ce cas, l'accumulation de fructose-6-phosphate mais aussi celle de fructose en quantité importante. Il est démontré que ceci est dû à l'inhibition de la fructokinase par le produit de sa réaction. De plus, l'observation de la croissance du mutant en présence d'arabinose et non en présence de xylose ou de ribose indique en accord avec d'autres auteurs que l'arabinose est dégradé par une voie différente de la voie classique des pentoses de Dickens-Horecker.

Les mécanismes de transport des glucides sont étudiés par la mesure de l'effet des découplants énergétiques (DNP, CCCP, azide), du cyanure, du fluorure et de l'arséniate. Ce sont des systèmes de transport actif dont le fonctionnement est lié à l'énergisation directe de la membrane plasmique par le transport de protons et

d'électrons de la chaîne respiratoire dont elle est le support. L'utilisation d'analogues structuraux tel que l' α -méthyl-glucose ou le 2 désoxyglucose n'est pas avantageuse par rapport aux substrats vrais étant donné qu'ils sont métabolisés par **R. meliloti**.

Le glucose et le fructose sont donc véhiculés au travers de la membrane plasmique sans être transformés. La mesure de l'effet de l'addition de substrats carbonés simples sur leur accumulation montre que chacun d'entre eux possède son propre système de transport, spécifique. Ces perméases sont constitutives et elles possèdent des groupements thiols dans le site actif (effet du NEM). Leur fonctionnement dépend également de la présence d'ions métalliques (effet de l'EDTA).

Les vitesses initiales d'accumulation du glucose et du fructose dépendent de la concentration externe des substrats selon une relation de pseudo-Michaelis. Les constantes cinétiques mesurées sont très proches :

- pour la glucose perméase : K_m apparent = $0,7 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 38$ nanomoles de glucose transporté par mg de protéines et par mn,
- pour la fructose perméase : K_m apparent = $0,2 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 5$ nanomoles de fructose transporté par mg de protéines et par mn.

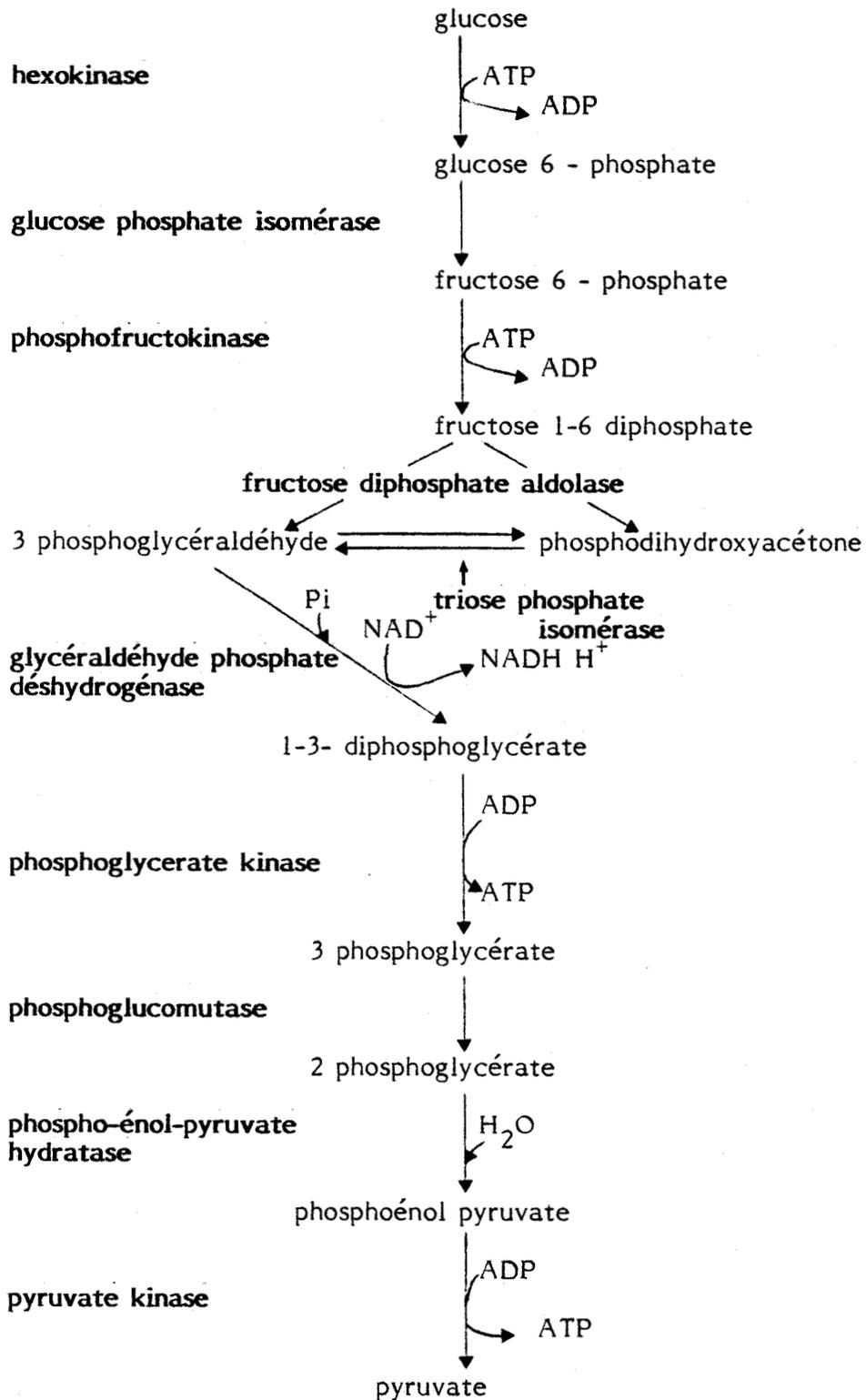
D'autre part, on constate que chacun de ces substrats est un inhibiteur compétitif de l'accumulation de l'autre (K_i mesuré avec le fructose = $1,2 \text{ mM}$; K_i mesuré avec le glucose = $2,8 \text{ mM}$).

L'activité des perméases est régulée par le succinate. Nous avons mis en évidence des courbes de croissance diauxique lors du développement de **R. meliloti** sur des milieux contenant du succinate de sodium en concentration limitante et du glucose ou du fructose. Le suivi du phénomène en bioréacteur a été facilité par la mise au point des conditions du contrôle de la croissance microbienne par la mesure en continu de l'oxygène dissous. La diauxie est levée par l'addition aux milieux d'incubation d'AMPc 10 mM .

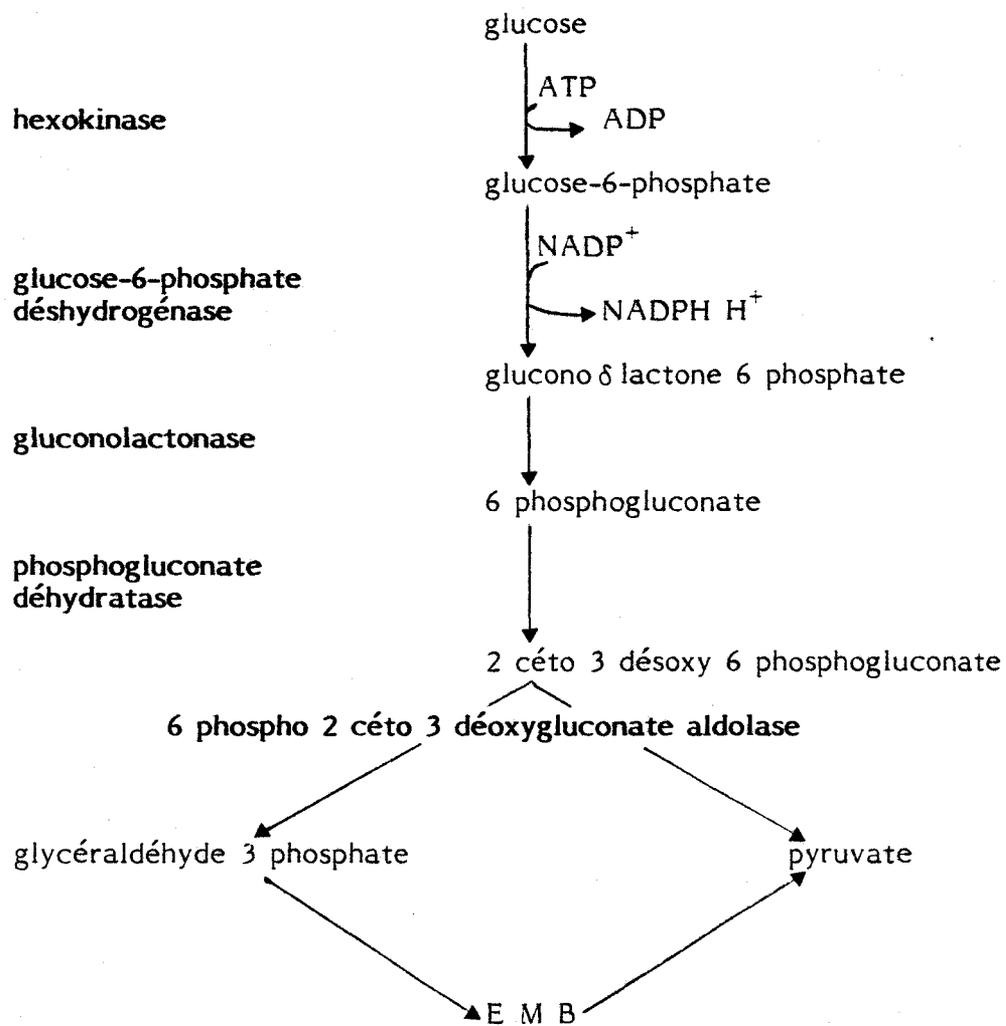
Chacune des perméases subit la répression catabolique AMPc dépendante par le succinate. Ce phénomène de régulation est tout à fait original et n'a jamais été décrit chez **Rhizobium**.

L'ensemble des résultats nous a permis de proposer pour **Rhizobium meliloti** un schéma métabolique d'utilisation du glucose et du fructose.

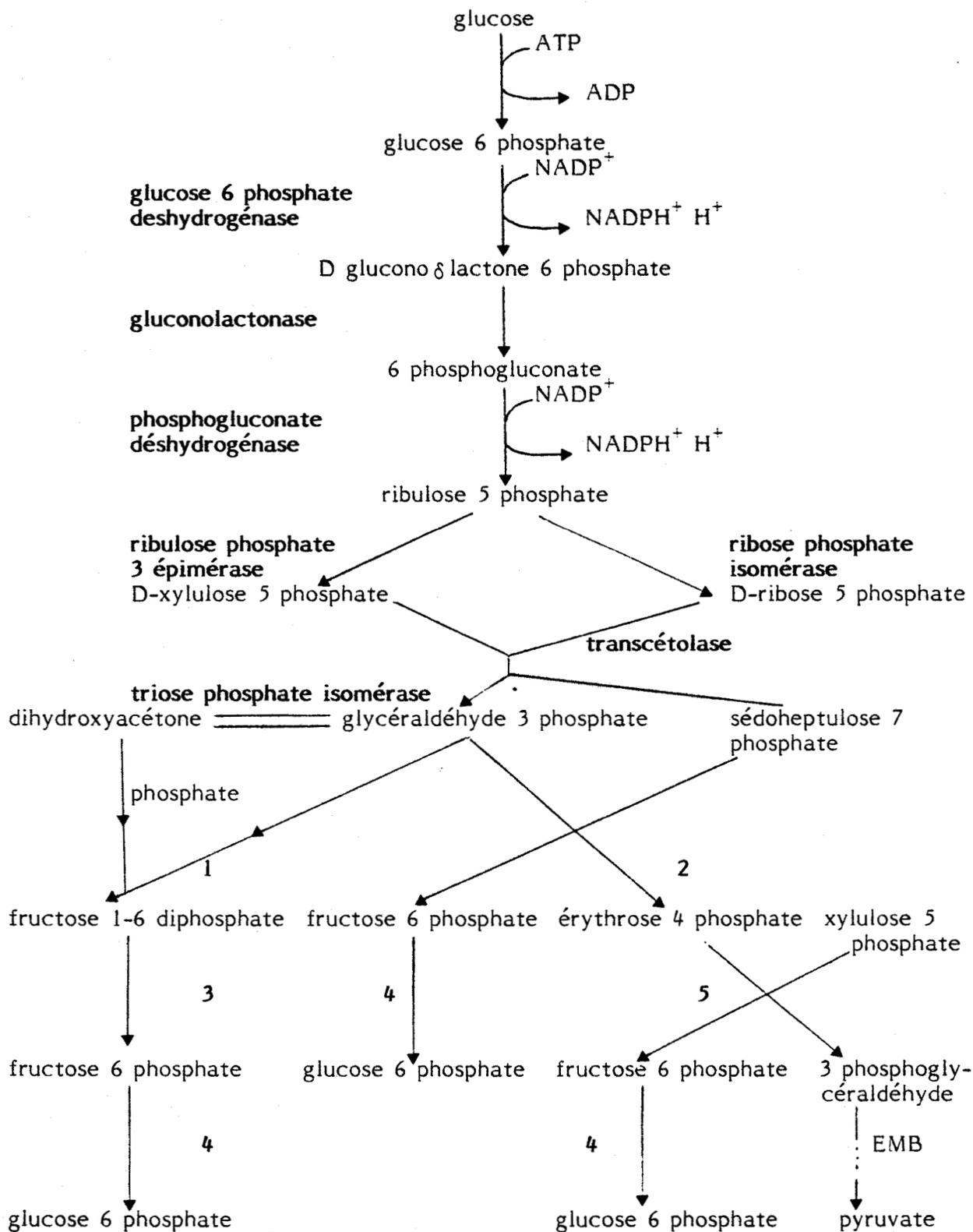
A N N E X E



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

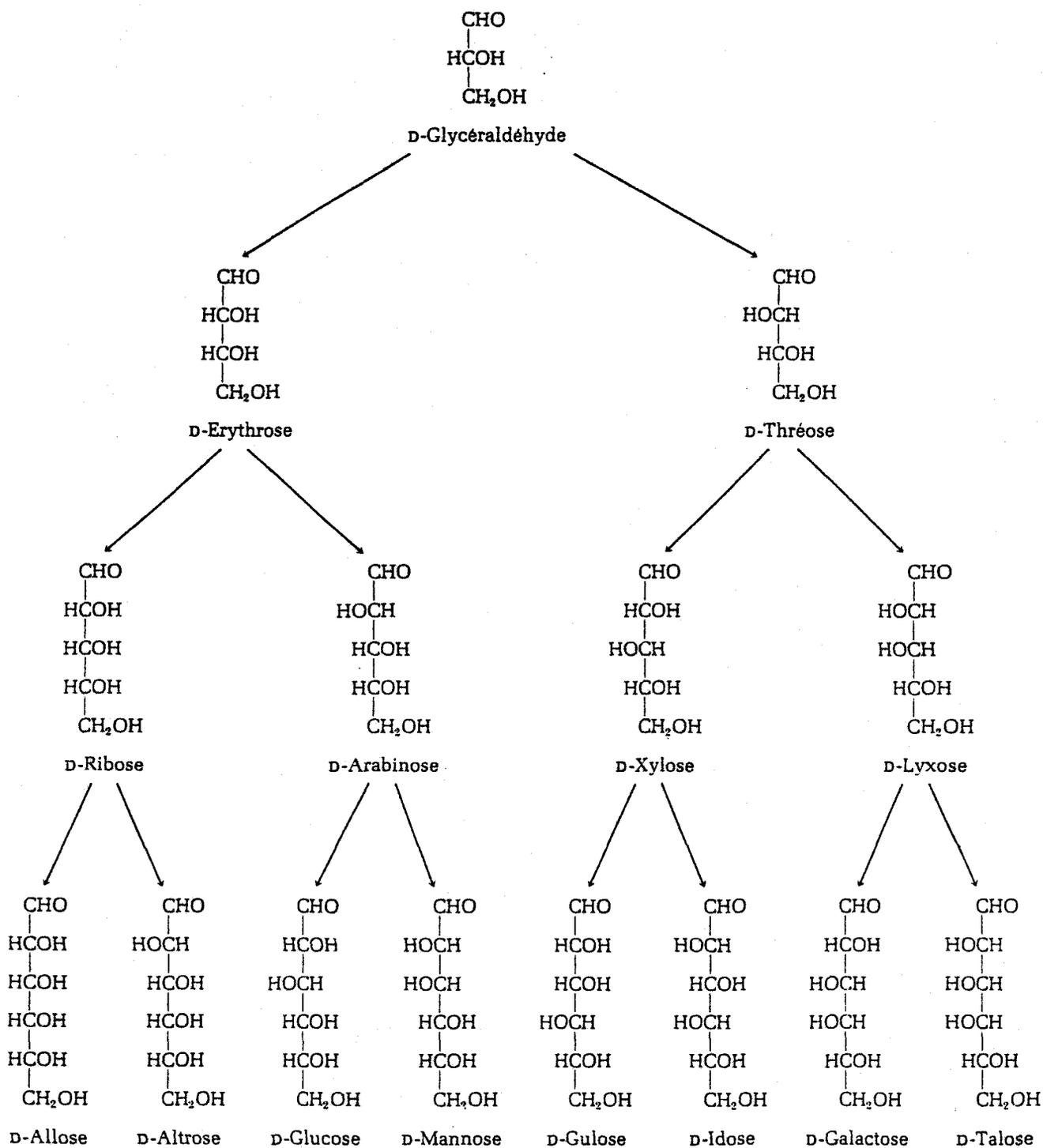


Métabolisme du glucose par la voie d'Entner-Doudoroff (ED)
ou voie du KDPG



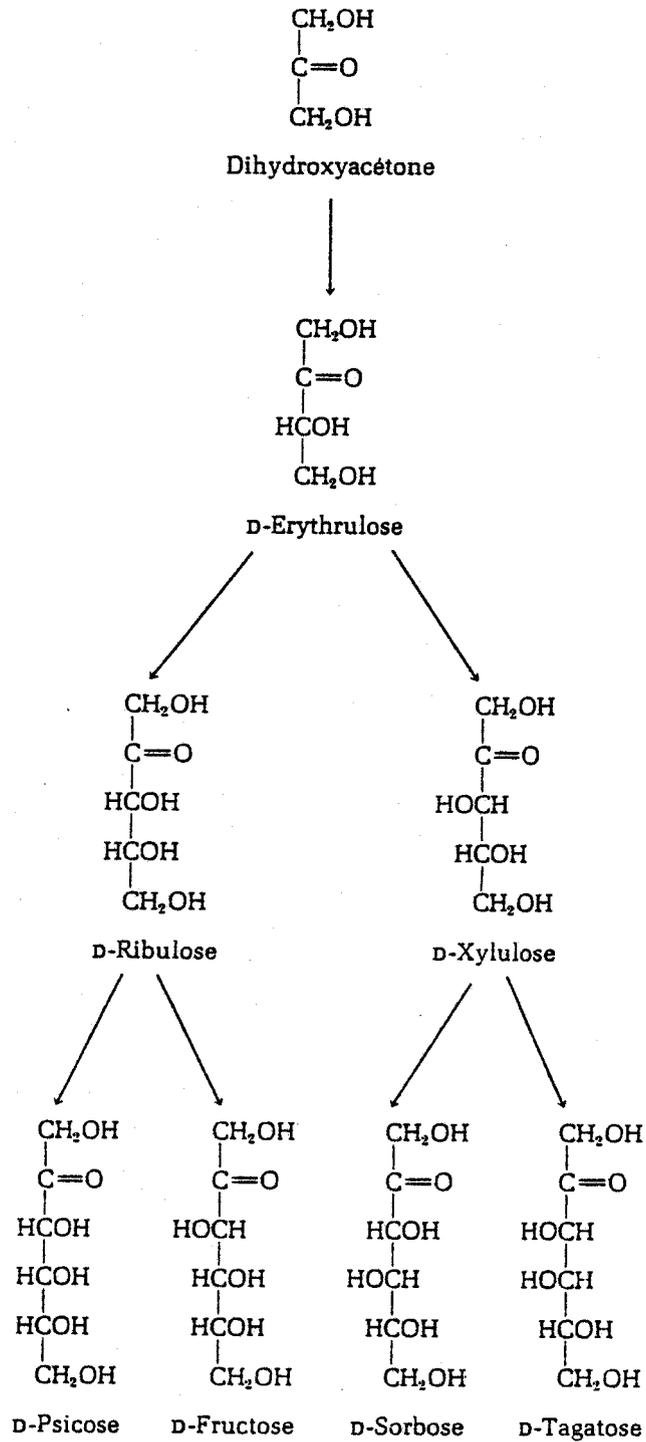
Métabolisme du glucose par la voie de Dickens Horecker (DH) ou voie des pentoses

1 : fructose 1-6 diphosphate aldolase ; 2 : transaldolase ; 3 : hexose diphosphatase ; 4 : glucose phosphate isomérase ; 5 : transcétolase.



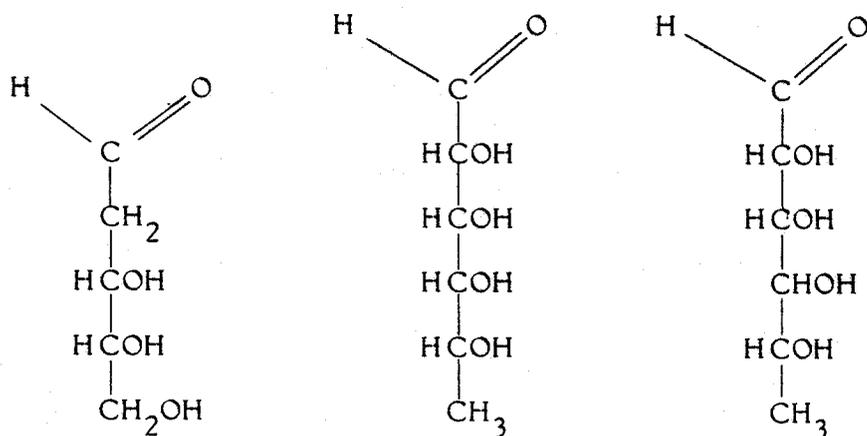
La famille des D-aldoses, comportant de trois à six atomes de carbone.
 Ces représentations doivent être considérées comme des formules
 projectives (d'après LEHNINGER, 1981).





La famille des D-cétooses : forme en chaîne ouverte (d'après LEHNINGER, 1981).



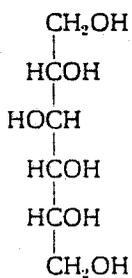


2 désoxy-D-ribose

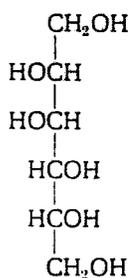
L-Rhamnose

L-Fucose

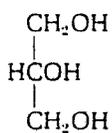
Les désoxyoses : forme en chaîne ouverte (d'après LEHNINGER, 1981).



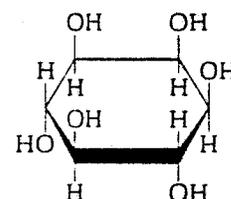
Sorbitol



D-Mannitol



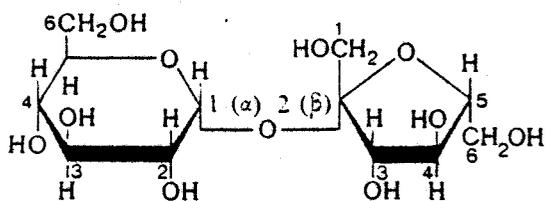
Glycérol



myo-Inositol

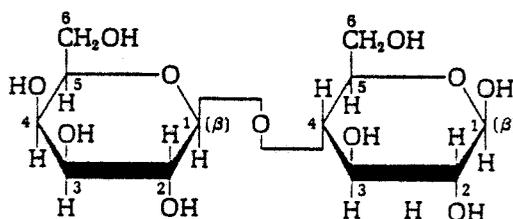
Les polyols dérivés d'oses (d'après LEHNINGER, 1981).





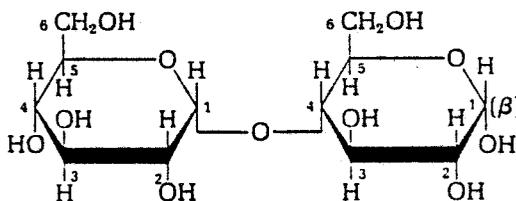
Le saccharose

(O-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranoside)



Le lactose (forme β)

(O-β-D-galactopyranosyl -(1→4)-β-D-glucopyranose)



Le maltose (forme β)

(4-0-α-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranose)



Les dissaccharides (d'après LEHNINGER, 1981)

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

- AKKERMANS A.D.L., ABDULKADIR S. and TRINICK M.J., 1978.
Nature (London), 274 : 190.
- ALLEN E.K. and ALLEN O.N., 1950.
Bacteriol. Rev., 14 : 273-330.
- ALLISON F.E., 1935.
Soil Sci., 39 : 123-143.
- ANTONIW L.O. and SPRENT J., 1978.
Phytochemistry, 17 : 675-678.
- APPLEBY C.A., TURNER G.L. and MACNICOL A.K., 1975.
Biochim. Biophys. Acta, 387 : 461.
- ARIAS A. and MARTINEZ-DRETS G., 1976.
Can. J. Microbiol., 22 : 150-153.
- ARIAS A., CERVENANSKY C., GARDIOL A. and MARTINEZ-DRETS G., 1979.
J. Bacteriol., 137 : 409-419.
- ARIAS A., GARDIOL A. and MARTINEZ-DRETS G., 1982.
J. Bacteriol., 151 : 1069-1072.
- ARIAS A. and CERVENANSKY C., 1986.
J. Bacteriol., 167 : 1092-1094.
- ARWAS R., MCKAY I.A., ROWNEY F.R.P., DILWORTH M.J. and GLENN A.R., 1985.
J. Gen. Microbiol., 131 : 2059-2066.
- ARWAS R., GLENN A.R., MCKAY I.A. and DILWORTH M.J., 1986.
J. Gen. Microbiol., 132 : 2743-2747.
- ATKINSON D.E., 1968.
Biochemistry, 7 : 4030.
- ATKINSON D.E., 1969.
Annu. Rev. Microbiol., 23 : 47.
- AUSUBEL F.M., MARGOLSKEE R.F. and MAIZELS N., 1977.
In : NEWTON W., POSTGATE J.R. and RODRIGUEZ-BARRUELO C. (eds.) :
"Recent Developments in Nitrogen Fixation", Academic Press, London, p. 347.
- AVISSAR Y.J. and NADLER K.D., 1978.
J. Bacteriol., 135 : 782.
- BALDWIN I.L. and FRED E.B., 1927.
Soil Sci., 24 : 217-230.
- BAULCOMBE D. and VERMA D.P.S., 1978.
Nucl. Acids Research, 5 : 4141.
- BERGERSEN F.J., 1967.
Biochim. Biophys. Acta, 130 : 304-312.

- BERGERSEN F.J., 1970.
Aust. J. Biol. Sci., 23 : 1015-1025.
- BERGERSEN F.J., 1971a.
Annu. Rev. Plant Physiol., 22 : 121.
- BERGERSEN F.J., 1971b.
Plant Soil (Special Vol.), p. 611.
- BERGERSEN F.J., 1977.
In : HARDY R.W.F. and SILVER W. (eds.) : "A treatise of dinitrogen fixation".
Section III : Biology. John WILEY, New-York, p. 519-556.
- BERGERSEN F.J. and BRIGGS M.J., 1958.
J. Gen. Microbiol., 19 : 482-490.
- BERGERSEN F.J. and GIBSON A.H., 1977.
In : DOBEREINER J., BURRIS R.M. and HOLLAENDER A. (eds.) : "Limitations
and potentials for biological nitrogen fixation in the Tropics". Plenum Press,
New-York, p. 263.
- BERGERSEN F.J. and GOODCHILD D.J., 1973.
Aust. J. Biol. Sci., 26 : 741.
- BERGERSEN F.J. and TURNER G.L., 1967.
Biochim. Biophys. Acta, 141 : 507-515.
- BERGERSEN F.J. and TURNER G.L., 1975.
J. Gen. Microbiol., 89 : 31-47.
- BERGERSEN F.J., TURNER G.L. and APPLEBY C.A., 1973.
Biochim. Biophys. Acta, 292 : 271.
- BERGERSEN F.J., TURNER G.L., GIBSON A.H. and DUDMAN W.F., 1976.
Biochim. Biophys. Acta, 444 : 164-174.
- BERINGER J.E., 1974.
J. Gen. Microbiol., 84 : 188-198.
- BISHOP P.E., GUEVARA J.G., ENGELKE J.A. and EVANS H.J., 1976.
Plant Physiol., 57 : 542-555.
- BOLTON E., HIGGISSON B., HARRINGTON A. and O'GARA F., 1986.
Arch. Microbiol., 144 : 142-146.
- BONNIER C. et BROUWERS L., 1959.
Bull. Inst. Agro. et Stat. Rech. Gembloux, 26 : 317-321.
- BRISOU J., TYSSET C., DE RAUTLIN DE LA ROY Y., CURSIER R. et MOREAU
R., 1964.
Ann. Inst. Pasteur (Paris), 106 : 469-474.
- BURLEY J.W.A., 1961.
Plant Physiol., 36 : 820-824.

- BURRIL T. and HANSEN R., 1917.
Illinois Agric. Exp. Stat. Bull., 202 : 115-181.
- CERVENANSKY C. and ARIAS A., 1984.
J. Bacteriol., 160 : 1027-1030.
- CHAKRABARTI S., LEE M. and GIBSON A.H., 1981.
Soil Biol. Biochem., 13 : 349-354.
- CHEN Y.P., GLENN A.R. and DILWORTH M.J., 1984.
FEMS Microbiol. Lett., 21 : 201-205.
- CHING T.M., 1976.
Life Sci., 18 : 1071.
- CHING T.M., HEDTKE S., RUSSEL S.A. and EVANS H.J., 1975.
Plant Physiol., 55 : 796-800.
- COOPER C.M., FERNSTROM G.A. and MILLER S.A., 1944.
Ind. Eng. Chem., 36 : 504-507.
- CORRIEU G., 1975.
Thèse Doct. Ing., Université de Dijon.
- CORRIEU G., LALANDE M. and PERINGER P., 1975.
Rev. Ferm. Ind. Alim., 30 (5) : 126.
- COURTOIS B., DERIEUX J.C. et HORNEZ J.P., 1975.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur (Paris), 126B (1) : 1-15.
- COURTOIS B., HORNEZ J.P. et DERIEUX J.C., 1979.
Can. J. Microbiol., 25 (10) : 1191-1196.
- COURTOIS B., HORNEZ J.P. et DERIEUX J.C., 1982.
Bio-Sciences, 4 : 59-62.
- COURTOIS B., HORNEZ J.P. et DERIEUX J.C., 1983.
Bio-Sciences, 11 (11) : 198-199.
- COURTOIS B., HORNEZ J.P., COURTOIS J. et DERIEUX J.C., 1982.
Bull. Soc. Bot. Fr., 35 : 19-25.
- COURTOIS B., HORNEZ J.P., COURTOIS J. et DERIEUX J.C., 1983.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur (Paris), 134B : 141-147.
- COURTOIS B., HORNEZ J.P., TAILLIEZ R., COURTOIS J. et DERIEUX J.C., 1982.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 294 (III) : 95-98.
- CUTTING J.A. and SCHULMAN H.M., 1969.
Biochim. Biophys. Acta, 192 : 486.
- DART P.J. and MERCER F.V., 1963a.
Arch. Mikrobiol., 46 : 382-387.

- DART P.J. and MERCER F.V., 1963b.
Arch. Mikrobiol., 47 : 1-6.
- DAVIES S.L. and WHITTENBURY, H.A., 1970.
J. Gen. Microbiol., 64 : 227-233.
- DAVIS L.C. and NORDIN P., 1983.
Plant Physiol., 72 : 1051-1055.
- DE HERTOOGH A.A., MAYEUX P.A. and EVANS H.J., 1964.
J. Biol. Chem., 239 : 2446-2453.
- DE HOLLANDER J.A., BRETTEHAUSSEN C.W. and STOUTHAMMER A.H., 1979.
Antonie Van Leeuwenhoek, 45 : 401-415.
- DE HOLLANDER J.A. and STOUTHAMER A.H., 1979.
FEMS Microbiol. Lett., 6 : 57-59.
- DELATTRE J.M., 1971.
Thèse de Doct. Ing., Université des Sciences et Techniques de Lille.
- DE LEY J. and DOUDOROFF M., 1957.
J. Biol. Chem., 227 : 745-757.
- DERIEUX J.C., HORNEZ J.P. et COURTOIS B., 1983.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 296 (III) : 995-1000.
- DE VRIES G.D., IN'TVELD P. and KIJNE J.W., 1980.
Plant Sci. Lett., 20 : 115-123.
- DE VRIES G.E., VAN BRUSSEL A.A.N. and QUISPÉL A., 1982.
J. Bacteriol., 149 : 872-879.
- DILWORTH M.J., 1966.
Biochem. Biophys. Acta, 127 : 285-294.
- DILWORTH M.J., 1969.
Biochem. Biophys. Acta, 184 : 432.
- DILWORTH M.J., ARWAS R., MCKAY I.A., SAROSO S. and GLENN A.R., 1986.
J. Gen. Microbiol., 132 : 2733-2742.
- DILWORTH M.J., MCKAY I.A., FRANKLIN M. and GLENN A.R., 1983.
J. Gen. Microbiol., 129 : 359-366.
- DI MARCO A.A. and ROMANO A.H., 1985.
Appl. Environ. Microbiol., 49 : 151-157.
- DIXON R.O.D., 1964.
Arch. Mikrobiol., 48 : 166.
- DUNCAN M., 1981.
J. Gen. Microbiol., 122 : 61-67.

- DUNCAN M.J. and FRAENKEL D.G., 1979.
J. Bacteriol., 137 : 415-419.
- EISENBERG R.C. and DOBROGOSZ W.J., 1967.
J. Bacteriol., 83 : 879-886.
- EL GUEZZAR M., HORNEZ J.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C., 1987.
J. Bacteriol., soumis JB-253-87.
- ELKAN G.H., 1981.
In : ATHERLY A. (ed.) : "Int. Rev. Cytol. Suppl. 13". New-York Academic, p. 1-14.
- ELKAN G.H. and KWIK I., 1968.
J. Appl. Bact., 31 : 399-404.
- EVANS H.J., EMERICH D.W., RUIZ ARGUESO T., MAIER R.J. and ALBRECHT S.L., 1980.
In : NEWTON W.E. and ORME JOHNSON W.H. (eds.) : "Nitrogen fixation". Baltimore University Park, vol. 2, p. 69-86.
- FAHRÄEUS G., 1957.
J. Gen. Microbiol., 16 : 374-378.
- FINAN T.M., WOOD J.H. and JORDAN D.C., 1981.
J. Bacteriol., 148 : 193-202.
- FINAN T.M., WOOD J.M. and JORDAN D.C., 1983.
J. Bacteriol., 154 : 1403-1413.
- FRED E.B., 1912.
Va. Agric. Stat. Ann. Rep., 145-173.
- FRED E.B., BALDWIN I.L. and McCOY E., 1932.
In : Root nodule bacteria and leguminous plants. University Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 343 p.
- GARDIOL A., ARIAS A., CERVENANSKY C., GAGGERO C. and MARTINEZ-DRETS G., 1980.
J. Bacteriol., 144 : 12-16.
- GARDIOL A., ARIAS A., CERVENANSKY C. and MARTINEZ-DRETS G., 1982.
J. Bacteriol., 151 : 1621-1623.
- GEORGI C.E. and ETTINGER J.M., 1941.
J. Bacteriol., 41 : 323-340.
- GERSON T., PATEL J.J. and WONG M.M., 1978.
Physiol. Plant, 42 : 420-424.
- GHEI O.K. and KAY W.W., 1973.
J. Bacteriol., 114 : 65-79.
- GLAUERT A.M. and GLAUERT R.H., 1958.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 4 : 191-196.

- GLENN A.R. and BREWIN N.J., 1981.
J. Gen. Microbiol., 126 : 237-241.
- GLENN A.R. and DILWORTH M.J., 1981a.
J. Gen. Microbiol., 126 : 243-247.
- GLENN A.R. and DILWORTH M.J., 1981b.
Arch. Microbiol., 129 : 233-239.
- GLENN A.R., ARWAS R., McKAY I.R. and DILWORTH M.J., 1984a.
J. Gen. Microbiol., 130 : 231-237.
- GLENN A.R., ARWAS R., McKAY I.R. and DILWORTH M.J., 1984b.
J. Gen. Microbiol., 130 : 239-245.
- GLENN A.R., POOLE P.S. and HUDMAN J.F., 1980.
J. Gen. Microbiol., 119 : 267-271.
- GOODCHILD D.J., 1978.
In : BOURNE G.H., DANIELLI J.F. and JEON K.W. (eds.) : "International Review of Cytology", Academic Press, London, suppl. 6, p. 235-288.
- GOODCHILD D.J. and BERGERSEN F.J., 1966.
J. Bacteriol., 92 : 204.
- GRAHAM P.H., 1964.
Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., 30 : 68-72.
- GUILLAUME J., MARTIN G. et DERIEUX J.C., 1959.
Ann. Inst. Pasteur (Lille), 10 : 159-166.
- HAACK A., 1964.
Zeutr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt., 117 : 343-345.
- HARDY R.W.F., HOLSTEN R.D., JACKSON E.K. and BURNS R.C., 1968.
Plant Physiol., 43 : 1185-1207.
- HELLRIEGEL H. and WILLFORTH H., 1888.
Beilage Z. Vers. Rubenzuckerind., 1 : 234.
- HERNANDEZ B.S. and FOCHT D.D., 1984.
Appl. Environ. Microbiol., 48 : 206-210.
- HOCHSTER R.M. and KATZNELSON H., 1957.
Can. J. Biochem. Physiol., 36 : 669-689.
- HOOYMANS J.J.M. and LOGMAN G.J.J., 1984.
In : "Advances in Nitrogen Fixation". **Proc. 5th Int. Symp.**, eds. VEEGER C. and NEWTON W.E., Den Haag (Netherlands), p. 261.
- HOPKINS C.G., 1902.
J. Amer. Chem. Soc., 24 : 1155.
- HORNEZ J.P., 1976.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°608, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

- HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C., 1976.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 283 : 1559-1562.
- HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C., 1982a.
Bio-Sciences, 1 : 5-7.
- HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C., 1982b.
Bio-Sciences, 1 (5) : 71-74.
- HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C., 1983.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur (Paris), 134B : 231-234.
- HORNEZ J.P., COURTOIS B., DEFIVES C. et DERIEUX J.C., 1974.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 278 : 157-160.
- HORNEZ J.P., OCHIN D., COURTOIS B. et DERIEUX J.C., 1983.
Bio-Sciences, 8 : 137-138.
- HORNEZ J.P., THEODOROPOULOS A.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C., 1984.
In : "Advances in Nitrogen Fixation". *Proc. 5th Int. Symp.*, eds. VEEGER C. and NEWTON W.E., Den Haag (Netherlands).
- HORNEZ J.P., THEODOROPOULOS P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C., 1987.
Lett. in App. Microbiol., soumis.
- HUDMAN J.F. and GLENN A.R., 1980.
Arch. Microbiol., 128 : 72-77.
- HUSSAIN QUADRI S.M. and HOARE D.S., 1968.
J. Bacteriol., 95 : 2344.
- HUSSIEN Y.A., TEWFIK M.S. and HANDI Y.A., 1974.
Soil Biol. Biochem., 6 : 377-381.
- JOHNSON G.V., EVANS H.J. and CHING T.M., 1966.
Plant Physiol., 41 : 1130-1136.
- JORDAN D.C., 1962.
Bacteriol. Rev., 26 : 119-141.
- JORDAN D.C., 1982.
Int. J. Syst. Bacteriol., 32 : 136-139.
- JORDAN D.C. and ALLEN O.N., 1974.
In : BUCHANAN R.E. and GIBBONS N.E. (eds.) : "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Williams and Wikkins Co, Baltimore, 8th ed., p. 261-267.
- KABACK H.R., 1973.
In : JAKOBY W.B. (ed.) : "Methods in Enzymology". Academic Press, London, 22 : 99-120.
- KARR D.B., WATERS J.K., SUZUKI F. and EMERICH D.W., 1984.
Plant Physiol., 75 : 1158-1162.
- KATZNELSON H., 1955.
Nature, 175 : 551-552.

- KATZNELSON H.D., TANNEBAUM S.W. and TATUM E.L., 1953.
J. Biol. Chem., 204 : 43-59.
- KATZNELSON H. and ZAGALLO A.C., 1957.
Can. J. Microbiol., 3 : 879-884.
- KEELE B.B., HAMILTON P.B. and ELKAN G.H., 1969.
J. Bacteriol., 97 : 1184-1191.
- KEELE B.B., HAMILTON P.B. and ELKAN G.H., 1970.
J. Bacteriol., 101 : 698-704.
- KENNEDY I.R., 1966.
Biochim. Biophys. Acta, 130 : 285-289.
- KENNEDY L.D. and GREENWOOD R.M., 1982.
NZJ. Sci., 25 : 361-366.
- KIJNE J.W., 1974.
Physiol. Plant Pathol., 36 : 262-264.
- KING E.T., 1971.
In : COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O. (eds.) : "Methods in Enzymology".
Academic Press, New-York, XXII.
- KLEVESTRAND R. and NORDAL A., 1950.
Acta Chem. Scand., 4 : 1320-1324.
- KLUCAS R.V. and EVANS H.J., 1968.
Plant Physiol., 42 : 1458-1460.
- KOCH J.P., HAYASCHI S. and LIN E.C.C., 1964.
J. Biol. Chem., 239 : 3106-3108.
- KOUCHI H. and YONEYAMA I., 1984.
Ann. Bot., 53 : 883-887.
- KRETOVICH W.L., ROMANOV V.I., YUSHKOVA L.A., SHRANKO V.I. and FEDULOVA N.G., 1977.
Plant Soil, 48 : 291-302.
- KURZ W.G.W. and LA RUE T.A., 1975.
Nature, 256 : 407-408.
- KURZ W.G.W. and LA RUE T.A., 1977.
Can. J. Microbiol., 23 : 1197-1200.
- KUYKENDALL L.D. and ELKAN G.H., 1976.
Appl. Environ. Microbiol., 32 : 511-519.
- KUYKENDALL L.D. and ELKAN G.H., 1977.
J. Gen. Microbiol., 98 : 291-295.
- LAIRD D.J., 1932.
Arch. Microbiol., 3 : 159-193.

- LANGE R.T., 1961.
J. Gen. Microbiol., 26 : 351-359.
- LANNING S.C. and COHEN S.S., 1951.
J. Biol. Chem., 189 : 109-114.
- LA RUE T.A., 1977.
In : HARDY R.W.F. and SILVER N.S. (eds.) : "A treatise of dinitrogen fixation".
Section III : Biology. John WILEY, New-York, p. 19.
- LATURAZE J., 1959.
Thèse de Doctorat en Pharmacie, n° 247, Université de Lille, p. 35.
- LAWRIE A.C. and WHEELER C.T., 1975.
New Phytol., 74 : 429-445.
- LEHNINGER A.L., 1981.
In : "Biochimie", 2ème ed.. Traduction par CARTIER P. et KAMOUN P.. Ed.
Flammarion Médecine - Sciences, Paris.
- LESSIE T.G. and VANDERWICK J.C., 1972.
J. Bacteriol., 110 : 1107-1117.
- LIM S.T. and SHANMUGAN K.T., 1979.
Biochim. Biophys. Acta, 584 : 479-492.
- LOWE R.H. and EVANS H.J., 1962.
Soil Science, 94 : 351-356.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J., 1951.
J. Biol. Chem., 193 : 265-275.
- MAKMAN R.S. and SUTHERLAND E.W., 1965.
J. Biol. Chem., 240 : 1309-1314.
- MARAIS B., SLACHCIAK M. et MOSCHETTO Y., 1981.
Innov. Tech. Biol. Med., 3 : 309-322.
- MARCUS L. and MARR A.G., 1961.
J. Bacteriol., 82 : 224-232.
- MARTINEZ-DRETS G. and ARIAS A., 1970.
J. Bacteriol., 103 : 97-103.
- MARTINEZ-DRETS G. and ARIAS A., 1972.
J. Bacteriol., 109 : 467-470.
- MARTINEZ-DRETS G., GARDIOL A. and ARIAS A., 1977.
J. Bacteriol., 130 : 1139-1143.
- MARTINEZ-DRETS G., ARIAS A. and ROVIRA DE CUTINELLA M., 1974.
Can. J. Microbiol., 20 : 605-609.
- MAXWELL E.S., KURAHASHI K. and KALCKAR H.M., 1962.
Methods Enzymol., 5 : 174-189.

- McALLISTER C.F. and LEPO J.E., 1983.
J. Bacteriol., 153 : 1155-1162.
- McGETRICK A.M., GOULDING C.F., MANIAN S.S. and O'GARA F., 1985.
J. Bacteriol., 163 : 1282-1284.
- MICHL H., 1951.
Monatsh. Chem., 82 : 489.
- MIFLIN B.J. and LEA P.J., 1976.
Phytochemistry, 15 : 873-879.
- MONOD J., 1942.
In : "Recherche sur la croissance des cultures bactériennes". Ed. Hermann, Paris.
- MONTREUIL J. et SPIK G., 1963.
In : "Méthodes colorimétriques du dosage des glucides totaux". Monographie du Laboratoire de Chimie-Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, p. 30.
- MORRISON N.A., HAU C.Y., TRINICK M.J., SHINE J. and ROLFE B.G., 1983.
J. Bacteriol., 153 (1) : 527-531.
- MOSSE B., 1964.
J. Gen. Microbiol., 36 : 49-66.
- MROZ C., 1984.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°1238, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.
- MROZ C., COURTOIS B., HORNEZ J.P. and DERIEUX J.C., 1984a.
In : "Symbiotic Nitrogen Fixation". Ed. GHAI B.S., U.S.G. Publishers and Distributors, Ludhiana (India).
- MROZ C., COURTOIS B., HORNEZ J.P. and DERIEUX J.C., 1984b.
In : "Advances in Nitrogen Fixation". **Proc. 5th. Int. Symp.**, eds. VEEGER C. and NEWTON W.E., Den Haag (Netherlands).
- MULONGOY K. and ELKAN G.H., 1977a.
J. Bacteriol., 131 : 179-187.
- MULONGOY K. and ELKAN G.H., 1977b.
Can. J. Microbiol., 23 : 1293-1298.
- MULONGOY K. and ELKAN G.H., 1978.
Curr. Microbiol., 1 : 335-340.
- MUTHUKUMAR G., ARUNAKUMARI A. and MAHADEVAN A., 1982.
Plant Soil, 69 : 163-169.
- NANDADASA H.G., ANDREESEN M. and SCHLEGEL H.G., 1974.
Arch. Microbiol., 99 : 15-24.
- NICOL H. and THORNTON H.G., 1941.
Proc. Roy. Soc. (London), ser. B., 2 : 32-59.
- NIEL C., DELMAERE F. et GUILLAUME J.B., 1980.
C. R. Acad. Sci. (Paris), ser. D, 291 : 771-774.

- NIEL C., GUILLAUME J.B. et BECHET M., 1977.
Can. J. Microbiol., 23 : 1178-1181.
- NUTMAN P.S., 1959.
J. Exptl. Botany, 10 : 250-255.
- NUTMAN P.S., DONCASTER C.C. and DART P.J., 1960.
In : "Infection of clover by root nodule bacteria". Black and White, 16 mm optical sound track film available from the British Film Institute, 81 Dean Street, London, W1V 6AA.
- OCHIN D., HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C., 1983.
Bio-Sciences, 2 (7) : 114-115.
- O'GARA F. and SHANMUGAM K.T., 1976.
Biochim. Biophys. Acta, 437 : 313.
- ORME-JOHNSON W.H., DAVIS L.C., HENZL M.T., AVERILL B.A., ORME-JOHNSON N.R., MUNCK E. and ZIMMERMANN R., 1977.
In : NEWTON W., POSTAGE J.R. and RODRIGUEZ-BARRUECO C. (eds.) : "Recent developments in nitrogen fixation". Academic Press, New-York, p. 271-285.
- PAGAN J.D., CHILD J.J., SCOWCROFT W.R. and GIBSON A.H., 1975.
Nature, 256 : 406.
- PANKURST C.E., 1981.
J. App. Bact., 50 : 45-54.
- PARKE D.L. and ORNSTON L.N., 1984.
J. Gen. Microbiol., 130 : 1743-1750.
- PARTRIDGE S.M., 1949.
Biochem. Soc. Symp., 3 : 52.
- PATE J.S., 1962.
Plant Soil, 17 : 333-337.
- PATE J.S., 1975.
In : LUTTGE U. and PITMAN M.G. (eds.) : "Encyclopaedia of Plant physiology". Springer Verlag, Berlin, 1 : 451-473.
- PEDROSA F.O. and ZANCAN G.T., 1974.
J. Bacteriol., 119 : 336-338.
- PETERSON J.B. and LA RUE T.A., 1981.
Plant Physiol., 68 : 489-493.
- PREVOT A.R., 1961.
In : "Traité de systématique bactérienne". Ed. Dunod, Paris.
- PRIMROSE S.B. and RONSON C.W., 1980.
J. Bacteriol., 141 : 1109-1111.
- RAJ H.D., 1967.
J. Bacteriol., 94 : 615-623.

- RAWSTHORNE S., MINCHIN F.R., SUMMERFIELD R.J., COOKSON C. and COOMBS J., 1980.
Phytochemistry, 19 : 341-355.
- REIBACH P.H. and STREETER J.G., 1983.
Plant Physiol., 72 : 634-640.
- REIBACH P.H. and STREETER J.G., 1984.
J. Bacteriol., 159 : 47-52.
- REYNOLDS E.S., 1963.
J. Cell. Biol., 17 : 208-213.
- RIBBONS D.W., HARRISSON J.E. and WADZINSKI A.M., 1970.
Ann. Rev. Microbiol., 24 : 135-150.
- ROHM M. and WERNER D., 1985.
Arch. Microbiol., 140 : 375-379.
- ROLFE B.G., GRESSHOLF P.M. and SHINE J., 1981.
Plant Sci. Lett., 19 : 277-279.
- RONSON C.W. and PRIMROSE S.B., 1979a.
J. Gen. Microbiol., 112 : 77-88.
- RONSON C.W. and PRIMROSE S.B., 1979b.
J. Bacteriol., 139 : 1075-1078.
- RONSON C.W., ASTWOOD P.M. and DOWNIE J.A., 1984.
J. Bacteriol., 160 : 903-909.
- RONSON C.W., LYTTLETON P. and ROBERTSON J.G., 1981.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78 : 4284-4288.
- RYTER A. and KELLENBERGER F., 1958.
Z. Naturforsch., 13b : 597-605.
- SAN FRANCISCO M.J.D. and JACOBSON G.R., 1985.
J. Gen. Microbiol., 131 : 765-773.
- SAROSO S., GLENN A.R. and DILWORTH M.J., 1984.
J. Gen. Microbiol., 130 : 1809-1814.
- SCHÖLLHORN R. and BURRIS R.H., 1967.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 58 : 213-216.
- SCOLNICK E.M. and LIN E.C.C., 1962.
J. Bacteriol., 84 : 631-637.
- SCOWCROFT W.R., GIBSON A.H. and PAGAN J.D., 1976.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 73 : 516-522.
- SELIGSON A. and SHAPIRO H., 1952.
Anal. Chem., 24 : 754-759.
- SIDDIQUI K.A.I. and BANERJEE A.K., 1975.
Folia Microbiol., 20 : 412-417.

- SINGH R., SIDHU P.S., VADHERA S., SITAL J.S. and BATHIA I.S., 1980.
Physiol. Plant., 48 : 504-508.
- SKOTNICKI M.L. and ROLFE B.G., 1977.
Microbios, 20 : 15-28.
- SKOTNICKI M.L. and ROLFE B.G., 1979.
Aust. J. Biol. Sci., 32 : 501-517.
- SMART J.B., DILWORTH M.J. and ROBSON A.D., 1984.
Arch. Microbiol., 140 : 281-286.
- SMITH U. and RIBBONS D., 1970.
Arch. Microbiol., 74 : 110-117.
- STOVALL I. and COLE M., 1978.
Plant Physiol., 61 : 787-790.
- STOWERS M.D., 1985.
Ann. Rev. Microbiol., 39 : 89-108.
- STOWERS M.D. and EAGLESHAM A.R.J., 1983.
J. Gen. Microbiol., 129 : 3651-3655.
- STOWERS M.D. and EAGLESHAM A.R.J., 1984.
Plant Soil, 77 : 3-14.
- STOWERS M.D. and ELKAN G.H., 1983.
Can. J. Microbiol., 29 : 398-440.
- STOWERS M.D. and ELKAN G.H., 1984a.
Plant Soil, 80 : 191-200.
- STOWERS M.D. and ELKAN G.H., 1984b.
Arch. Microbiol., 137 : 3-9.
- STOWERS M.D. and ELKAN G.H., 1985.
FEMS Microbiol. Lett., 26 : 45-48.
- STREETER J.G. and REIBACH P.H., 1984.
In : NEWTON W.E. and VEEGER C. (eds.) : "Advances of nitrogen fixation research". Nijhoff-Junk, The Hague, p. 522.
- STREICHER S. and VALENTINE R.C., 1977.
In : HARDY R.W.F. and W.S. SILVER (eds.) : "A treatise of dinitrogen fixation". Section III : Biology. John WILEY, New-York, p. 623.
- STUMPF D.K. and BURRIS R.H., 1979.
Anal. Biochem., 95 : 311-315.
- SULLIVAN D., BRISSON N., GOODCHILD B., VERMA D.P.S. and THOMAS D.Y., 1981.
Nature (London), 289 : 516.
- TAGUCHI H. and HUMPHREY A.E., 1966.
J. Ferment. Technol., 44 : 881-887.

- TAJIMA S., KIMURA I. and SASAHARA H., 1986.
Agric. Biol. Chem., 50 (4) : 1009-1014.
- TAJIMA S., SASAHARA H., KOUCHI H., YONEYAMA T. and ISHIZUKA J., 1985.
Agric. Biol. Chem., 49 : 3473-3479.
- THEODOROPOULOS P., 1986.
Thèse n°31, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.
- THEODOROPOULOS P.A., HORNEZ J.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C., 1985a.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur (Paris), 136A : 261-269.
- THEODOROPOULOS P.A., HORNEZ J.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C., 1985b.
C. R. Forum des Jeunes Chercheurs, Liège.
- THEODOROPOULOS P.A., HORNEZ J.P., COURTOIS B. and DERIEUX J.C., 1985c.
C. R. Forum des Jeunes Chercheurs, Liège.
- THIERY J.P., 1967.
J. Microsc., 6 : 995-1001.
- TIMBLIN C.R. and KAHN M.L., 1984.
J. Bacteriol., 158 : 1204-1207.
- TJEPKEMA J. and YOCUM C.S., 1974.
Planta, 119 : 351-360.
- TRINCHANT J.C. and RIGAUD J., 1974.
Physiol. Plant., 32 : 394-399.
- TRINCHANT J.C. et RIGAUD J., 1979.
L. Physiol. Vég., 17 : 547-556.
- TRINCHANT J.C., BIROT A.M. and RIGAUD J., 1981.
J. Gen. Microbiol., 125 : 159-165.
- TRINICK M.J., 1973.
Nature (London), 244 : 459-460.
- TRINICK M.J., 1980.
J. Appl. Bacteriol., 49 : 39-53.
- TRUCHET G., 1972.
C. R. Acad. Sci. (Paris), ser. D., 274 : 1290-1293.
- TRÜPER H.G., 1968.
J. Bacteriol., 95 : 1910.
- TSAO G.T. and KEMPE L.L., 1960.
J. Biochem. Microbiol. Technol., 2 : 129-142.
- TU J.C., 1974.
J. Bacteriol., 119 : 986-991.

- TUZIMURA K. and MEGURO H., 1960.
J. Biochem., 47 : 391-397.
- UCKER D.S. and SIGNER E.R., 1978.
J. Bacteriol., 136 : 1197-1200.
- ULLMANN A. et DANCHIN A., 1986.
In : GASSER F. (ed.) : "Régulation de l'expression génétique : rôle de l'AMP-cyclique". Hermann, Paris, p. 2.
- UMBREIT W.W., BURRIS R.H. and STAUFFER J.F., 1959.
In : "Manometric Technics". Ed. Burgess Publishing Co.
- UPCHURCH R.G. and ELKAN G.H., 1977.
Can. J. Microbiol., 23 : 1118-1122.
- VELLE W., 1975.
Methods Enzymol., 41 : 165-170.
- VERMA D.P.S., 1982.
In : SMITH H. and D. GRIERSON (eds.) : "Molecular biology of plant development". Blackwell Scientific Publ., Oxford, p. 437-466.
- VERMA D.P.S. and BAL A.K., 1976.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 73 : 3843.
- VERMA D.P.S. and LONG S., 1983.
In : GOURNE G.H., DANIELLI J.F. and JEON K.W. (eds.) : "International Review of Cytology". Suppl. 14, Intracellular symbiosis, Academic Press, London, p. 211-245.
- VINCENT J.M., 1974.
In : "The Biology of nitrogen fixation". Ed. QUISPEL A., Amsterdam (Holland), p. 265-341.
- VINCENT J.M., 1980.
In : HARDY R.W.F. and SILVER W.S. (eds.) : "Nitrogen fixation". Wiley - Interscience, New-York, p. 277-366.
- VINCENT J.M., 1982.
In : STARR M.P., STOLP H., TRUPER H.G., BALOWS A. and SCHLEGEL H.G. (eds.) : "The prokaryotes : a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria". Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New-York, p. 818-841.
- VINCENT J.M., HUMPHREY B. and NORTH R.J., 1962.
J. Gen. Microbiol., 29 : 551-560.
- VORHEES E.B. and LIMPAN J.G., 1905.
J. Amer. Chem. Soc., 27 : 556.
- WANG C.H., STERN I.J. and GILMORE C.M., 1959.
Arch. Biochem. Biophys., 81 : 489-492.
- WATTEL F., 1961.
Thèse de Doctorat en Médecine, Université de Lille. p. 33.
- WEBER H.A., 1898.
J. Amer. Chem. Soc., 20 : 9.

- WHITING P.H., MIDGLEY M. and DAWES E.A., 1976.
J. Gen. Microbiol., 92 : 304-310.
- WILDON D.C. and MERCER F.C., 1963.
Aust. J. Biol. Sci., 16 : 585-590.
- WILEY J., 1894.
J. Amer. Chem. Soc., 16 : 1.
- WINTER H.C. and BURRIS R.H., 1976.
Ann. Rev. Biochem., 45 : 409.
- WITTENBERG J.B., BERGERSEN F.J., APPLEBY C.A. and TURNER G.L., 1974.
J. Biol. Chem., 249 : 4057.
- WONG P.P. and EVANS H.J., 1971.
Plant Physiol., 47 : 750-755.
- WONG P.P., EVANS H.J., KLUCAS R. and RUSSEL S., 1971.
Plant Soil, Special vol., p. 525.
- WRIGHT W.H., 1926.
Soil Science, 20 : 95-129.
- WURTZ B. and JEHL C., 1957.
Bull. Soc. Chim. Biol., 39 : 1139.
- YASHIMA S. and KITAHARA K., 1968.
J. Gen. Appl. Microbiol., 14 : 358-371.
- ZIMMERMAN M.H., 1960.
Ann. Rev. Plant Physiol., 1 : 167-188.
- ZIPFLE H., 1911.
Z. Bakt. Parasitenk., 32 : 97-137.

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON, J. CORTOIS.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUICHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale.
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. MESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre

Après la présentation d'une étude en microscopie électronique permettant d'illustrer les propriétés symbiotiques de *Rhizobium* avec les Légumineuses, l'observation du développement des cellules libres en présence de différents substrats carbonés montre qu'à partir du glucose, l'acidification est un caractère spécifique de l'espèce *R. meliloti*. Elle est due à l'accumulation d'acide 2 céto-gluconique, résultant de l'activité de deux enzymes membranaires : la glucose deshydrogénase et la gluconate deshydrogénase. Les constantes cinétiques de ces enzymes sont définies ainsi que leurs propriétés physiologiques (inductibilité, spécificité, dépendance de la concentration en glucose des milieux et de leur pression partielle en oxygène).

R. meliloti utilise le glucose et le fructose avec la même efficacité : cinétiques de croissance et rendements moléculaires calculés identiques, mesures respirométriques comparables. La recherche de l'activité des enzymes de dégradation des glucides, l'identification d'intermédiaires métaboliques hydrosolubles et l'étude des propriétés d'un mutant phosphoglucose isomérase moins isolé, ont permis de démontrer que seule la voie d'Entner-Doudoroff fonctionne pour assurer la croissance de la souche à partir de ces deux oses.

Glucose et fructose sont véhiculés par leur propre système de transport, actif, lié à l'énergisation directe de la membrane par la chaîne d'oxydations cellulaires. Les constantes cinétiques des perméases sont calculées. Ces enzymes subissent la répression catabolique AMPc dépendante par le succinate, ils sont le support d'un phénomène de régulation tout à fait original.

L'ensemble des résultats permet d'une part de proposer pour *R. meliloti* un schéma métabolique d'utilisation du glucose et du fructose et, d'autre part d'énoncer quelques hypothèses sur le fonctionnement énergétique du bactéroïde, cellule bactérienne en symbiose.

