

50376
1987
293

50376
1987
293

N° d'ordre : 186

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES

Option : Microbiologie

par

Mounir El GUEZZAR

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SYMBIOSE RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE :
OBTENTIONS ET ETUDES DE DEUX MUTANTS METABOLIQUES
DE RHIZOBIUM MELILOTI

Présentée le : 10 Décembre 1987, devant le Jury composé de :

SCD LILLE 1



D 030 320330 9

50376
1987
293

50376
1987
293

ABBREVIATIONS



- o O o -

AMPc	:	adénosine 3'-5' monophosphate cyclique.
Ara	:	arabinose.
Ars	:	arséniat de sodium.
ATC	:	cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs.
CCCP	:	carbonyl cyanurée-m-chlorophénylhydrazone.
DCI	:	mutant incapable d'utiliser le succinate.
DNP	:	2,4-dinitrophénol.
D.O	:	densité optique.
ED	:	voie Entner-Doudoroff.
EMP	:	voie Embden-Meyerhoff-Parnas ou voie glycolytique.
F-6-P	:	fructose-6-phosphate.
Fix ⁻	:	mutant incapable de fixer l'azote atmosphérique.
Gal	:	galactose.
Gal-1-P	:	galactose-1-phosphate.
Glc	:	glucose.
Gly	:	glycérol.
6-P-G	:	gluconate-6-phosphate.
G-1-P	:	glucose-1-phosphate.
G-6-P	:	glucose-6-phosphate.
HDI	:	mutant incapable d'utiliser le fructose.
K _I	:	constante d'inhibition.
K _M	:	constante d'affinité.
NaF	:	fluorure de sodium.
NaN ₃	:	azide de sodium.
NEM	:	N-éthyl maléide.
PEP	:	phosphoenolpyruvate.
PP	:	voie des pentoses phosphates ou voie Dickens-Horecker.
PTS	:	système phosphotransférase.
Su	:	succinate.
TCA	:	acide trichloroacétique.
TMG	:	thiométhylgalactoside.

T A B L E D E S M A T I E R E S

- o o o -

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	
I. - PRESENTATION DU GENRE <u>RHIZOBIUM</u> ET DE LA SYMBIOSE	2
1.1. Le genre <u>Rhizobium</u>	2
1.2. La symbiose	2
II. - NUTRITION CARBONÉE DES CELLULES LIBRES DE <u>RHIZOBIUM</u>	4
III. - TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONES PAR LES CELLULES LIBRES DE <u>RHIZOBIUM</u>	4
3.1. Transport des disaccharides	4
3.2. Transport des hexoses	6
3.3. Transport des acides dicarboxyliques en C ₄	6
IV. - METABOLISME DES SUBSTRATS CARBONES PAR LES CELLULES DE <u>RHIZOBIUM</u>	8
4.1. Métabolisme des disaccharides	8
4.2. Métabolisme des hexoses	11
4.3. Métabolisme des polyols	13
4.4. Métabolisme des pentoses	13
4.5. Métabolisme des acides organiques	13
V. - TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONES PAR LES BACTEROIDES .	14

VI. - METABOLISME DES SUBSTRATS CARBONES CHEZ LES BACTEROIDES	16
--	-----------

VII. - CONCLUSION	17
--------------------------------	-----------

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

I. - SOUCHES BACTERIENNES	19
--	-----------

II. - TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE	19
--	-----------

2.1. Tampon de non prolifération	19
--	----

2.2. Milieu minimum de croissance	19
---	----

2.3. Milieu riche TY	19
----------------------------	----

2.4. Milieu RC	20
----------------------	----

2.5. Milieu de NICOL et THORNTON	20
--	----

III. - CROISSANCE BACTERIENNE	20
--	-----------

IV. - TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONES	21
---	-----------

4.1. Préparation des cellules pour les études de transport	21
--	----

4.2. Transport des substrats	21
------------------------------------	----

V. - ETUDE DE LA NATURE DES PRODUITS ACCUMULES	22
---	-----------

5.1. Préparation du pool intracellulaire	22
--	----

5.2. Analyse chromatographique	22
--------------------------------------	----

VI. - DOSAGES ENZYMATIQUES	22
---	-----------

6.1. Préparation des extraits cellulaires de protéines	22
--	----

6.2. Dosages enzymatiques	23
---------------------------------	----

VII. - DETERMINATION DES PROPRIETES SYMBIOTIQUES	35
7.1. Infectivité	35
7.1.1. Stérilisation des graines de Luzerne et prégermination	35
7.1.2. Culture aseptique des Légumineuses	35
7.1.3. Inoculation	35
7.2. Efficience	36
7.2.1. Conditions expérimentales	36
7.2.2. Dosage de la réduction d'acétylène	36
7.2.3. Mesure de la quantité d'acétylène réduite	36
7.2.4. Isolement des souches à partir des nodules	37
VIII. - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	37

RESULTATS ET DISCUSSION

I. - CATABOLISME DES HEXOSES CHEZ <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u>	39
II. - ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN MUTANT DE <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u> INCAPABLE D'UTILISER LE FRUCTOSE	42
2.1. Isolement du mutant HD1	42
2.2. Identification du mutant HD1	42
2.3. Propriétés de croissance du mutant HD1	43
2.3.1. Conditions de croissance	43
2.3.2. Propriétés de croissance	43
2.4. Transport du fructose chez <u>R. meliloti</u> M5N1 et HD1	43
2.5. Dosages enzymatiques des voies cataboliques	47
2.6. Accumulation du fructose par le mutant HD1	47
2.6.1. Etude préliminaire	47
2.6.2. Accumulation du fructose en présence de sources de carbone permissives	50
2.6.3. Inhibition de la fructokinase par le F-6-P	52
2.7. Propriétés symbiotiques	52
2.8. Discussion	54

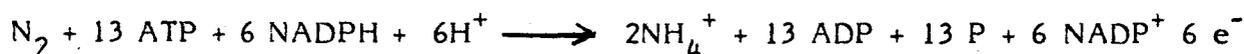
III. - ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN MUTANT DE <u>RHIZOBIUM MELILOTI INCAPABLE D'UTILISER LE SUCCINATE</u>	57
3.1. Isolement du mutant DC1	57
3.2. Propriétés de croissance du mutant DC1	59
3.3. Transport du succinate	60
3.4. Spécificité du système perméasique chez <i>R. meliloti</i> M5N1	60
3.4.1. Action des analogues structuraux	60
3.4.2. Nature de l'inhibition du transport du succinate par le fumarate	63
3.4.3. Etude de la nature du système de transport	63
3.5. Action des inhibiteurs métaboliques	65
3.6. Isolement de révertants et propriétés symbiotiques	65
3.7. Ultrastructure des nodules	67
3.8. Discussion	69
3.8.1. Transport du succinate chez <i>R. meliloti</i>	69
3.8.2. Isolement et caractérisation du mutant DC1	70
 CONCLUSION GENERALE	 73
 ANNEXE I	 77
 ANNEXE II	 86
 BIBLIOGRAPHIE	 91
 RESUME	 104

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

- o O o -

Pour la croissance des bactéries hétérotrophes tels que les Rhizobia, la production d'ATP à partir de molécules organiques est fondamentale. L'association symbiotique des bactéries du genre Rhizobium avec les Légumineuses, qui se traduit par la formation de nodules racinaires, nécessite de grandes quantités d'énergie.

La plante infectée fournit les produits de la photosynthèse au bactéroïde, lequel convertit ces substrats carbonés en énergie nécessaire pour le maintien du nodule et en ATP et électrons pour la réduction de l'azote atmosphérique :



Cette réaction nécessite 355 KJ/ion NH_4^+ formé.

Les mécanismes régulant cette production d'énergie se manifestent dans les séquences de dégradation des substrats carbonés.

Toutefois, les Rhizobia, à l'état de cellules libres ou de bactéroïdes, manifestent des comportements différents vis-à-vis des substrats énergétiques. La croissance des bactéries est la fonction primordiale de la cellule libre, alors que le bactéroïde montre une étroite spécificité vis-à-vis des substrats carbonés pour la réduction de l'azote atmosphérique.

Ainsi, malgré l'abondance des glucides dans les nodules des Légumineuses, leur rôle reste incertain dans l'établissement de l'efficacité, contrairement aux intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques dont l'implication a été démontrée.

Afin de contribuer à une meilleure compréhension de la symbiose Légumineuse-Rhizobium, nous avons cherché des mutants métaboliques ou de transport des substrats carbonés chez Rhizobium meliloti.

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

I. - PRESENTATION DU GENRE RHIZOBIUM ET DE LA SYMBIOSE

1.1. Le genre Rhizobium

Les Rhizobia sont des bacilles à gram négatif, capables d'induire la formation de nodules sur les racines des plantes de la famille des Légumineuses.

FRED et coll. (1932) répartissent les **Rhizobium** en 7 groupes formés par l'ensemble des souches capables d'infecter une Légumineuse donnée (tab. 1).

Cependant, cette classification qui ne fait intervenir qu'environ 1 000 Légumineuses parmi les 13 000 connues (ALLEN et BALDWIN 1954) est inadaptée à certaines souches de **R. leguminosarum**, **R. trifolii** et **R. phaseoli**, qui sont capables de noduler de nombreuses plantes hôtes communes. L'utilisation de la flagellation, des études sérologiques et lysotypiques (DELEY et RASSEL 1965, VINCENT et HUMPHREY 1970) ont abouti à la séparation du genre **Rhizobium** en 2 grands groupes (tab. 1) :

- les souches à croissance lente du "cowpea group" et des groupes du Soja et du Lupin,
- les souches à croissance rapide des groupes du Trèfle, du Pois, du Haricot et de la Luzerne.

D'autres critères ont été utilisés pour différencier les 2 groupes de **Rhizobium**, notamment la nutrition carbonée et l'utilisation de certaines voies enzymatiques que nous aborderons ultérieurement.

1.2. La symbiose

Le phénomène de la symbiose est caractérisé par une série d'évènements conduisant à un nodule "efficient", c'est-à-dire fixant l'azote atmosphérique.

L'étape d'initiation fait intervenir un chimiotactisme des **Rhizobium** vis-à-vis des exsudats racinaires des Légumineuses. Il s'ensuit un enrichissement de la rhizosphère en bactéries du genre **Rhizobium**. Les **Rhizobium** s'attachent ensuite aux poils radiculaires et forment un cordon infectieux qui progresse dans le poil vers les cellules de la Légumineuse hôte. Ces dernières se différencient pour former le nodule.

Sous l'action de la pectinase et de la cellulase, conjointement synthétisées par la bactérie et son hôte, les cellules de **Rhizobium** sont libérées et se différencient en "bactéroïdes" de nature pléiomorphe.

Groupe d'inoculation croisée	Espèce de Rhizobium	Croissance
Pois	R. leguminosarum	
Haricot	R. phaseoli	rapide
Trèfle	R. trifolii	
Luzerne	R. meliloti	
Soja	R. japonicum	lente
Lupin	R. lupini	
"Cowpea Group"	R. cowpea	

Tableau 1 - Groupes d'inoculation croisée du genre Rhizobium.

Ces bactéroïdes acquièrent alors le pouvoir de fixer l'azote atmosphérique grâce à la nitrogénase.

Le fonctionnement de cette enzyme est régulé par la légghémoglobine dont la globine est synthétisée par la plante et l'hème par **Rhizobium**.

Cette protéine assure le transport de l'oxygène du cytosol anaérobie des cellules hôtes aux bactéroïdes, tout en protégeant la nitrogénase de l'inactivation par l'oxygène.

II. - NUTRITION CARBONÉE DES CELLULES LIBRES DE RHIZOBIUM

De nombreux travaux ont examiné la diversité nutritionnelle des sources de carbone utilisées par les espèces de **Rhizobium**.

Le tableau 2 représente l'utilisation des substrats énergétiques par les espèces de **Rhizobium**.

Les Rhizobia à croissance rapide sont capables de croître sur une grande variété de substrats carbonés tels que les hexoses, pentoses, acides organiques, di et trisaccharides. Les Rhizobia à croissance lente sont, par contre, incapables d'utiliser les acides organiques, les di et trisaccharides. Les acides organiques sont cependant transportés et oxydés par ce second groupe de **Rhizobium** (KEELE et coll., 1970 ; STOWERS et ELKAN, 1984).

Le glycérol constitue la source de carbone la plus universelle pour la croissance de toutes les espèces de **Rhizobium** (ARIAS et MARTINEZ-DRETS, 1976).

III. - TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONÉS PAR LES CELLULES LIBRES DE RHIZOBIUM

3.1. Transport des disaccharides

Les Rhizobia à croissance lente sont incapables de transporter les disaccharides (ELKAN et KWIK, 1968) ; ceux à croissance rapide possèdent au moins 2 systèmes de transport, un commun au saccharose, maltose et tréhalose, et l'autre spécifique au lactose (GLENN et DILWORTH, 1981b).

Source de carbone	Rhizobium à croissance rapide	Rhizobium à croissance lente
Glucose	+ ^a	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Gluconate	ND ^b	+
Mannose	+	+
Mannitol	+	+
Rhamnose	+ ^c	ND
Dulcitol	+ ^c	ND
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Raffinose	+	ND ^d
Saccharose	+	+
Lactose	+	+
Tréhalose	+	ND
Glycérol	+	+
Pyruvate	+	+
Citrate	+	-
Succinate	+	+
Fumarate	+	ND
Malate	+	-

Tableau 2 - Nutrition carbonée chez Rhizobium (d'après STOWERS, 1985, modifié).

- a : la majorité des souches sont capables d'utiliser la source de carbone
- b : croissance non déterminée
- c : au moins une souche est capable d'utiliser le substrat carboné.
- d : aucune souche n'est capable d'utiliser la source de carbone

3.2. Transport des hexoses

Le mécanisme de transport du glucose a été bien établi chez *Rhizobium* (HUDMAN et GLENN, 1980 ; DE VRIES et coll., 1982 ; STOWERS et ELKAN, 1983 ; THEODOROPOULOS, 1986).

Le glucose est transporté activement par énergisation de la membrane plasmique. Son accumulation n'est pas observée lorsque les cellules de *R. leguminosarum* ou *R. meliloti* sont cultivées sur succinate ou malate comme source de carbone (HUDMAN et GLENN, 1980 ; DE VRIES et coll., 1982 ; HORNEZ et coll., 1984). HORNEZ et coll. (1984) ont montré, chez *R. meliloti* M5N1, que le succinate réprime la glucose perméase, et l'addition d'AMPc lève cette répression.

Comme le glucose, le fructose est accumulé par un processus actif dépendant de l'énergisation de la membrane (GLENN et DILWORTH, 1981a ; SAROSO et coll., 1984 ; HORNEZ, 1987).

RONSON et PRIMROSE (1979) ont montré, par le biais d'un mutant fructose perméase⁻ de *R. trifolii*, que les systèmes de transport des hexoses ne sont pas nécessaires pour l'établissement d'une symbiose efficiente.

Le transport du mannose chez *R. meliloti* est actif (ARIAS et coll., 1982) et réprimé lorsque les cellules sont cultivées sur succinate.

De par l'action des découplants énergétiques sur le transport des hexoses chez *Rhizobium*, l'utilisation de mutants métaboliques a permis de montrer la nature active de ces systèmes de transport. Ainsi, les mutants fructokinase⁻ de *R. meliloti* (GARDIOL et coll., 1982) et *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984a) accumulent le fructose à l'intérieur des cellules. Ces transports ne sont pas réalisés par un système PTS. Ce système est aussi absent chez *R. trifolii* puisque le mutant glucokinase⁻ possède l'activité glucose perméase mais reste incapable de croître en présence de glucose (RONSON et PRIMROSE, 1979). Le transport actif des hexoses chez *Rhizobium* par des systèmes non-PTS est en accord avec les résultats reportés chez d'autres bactéries aérobies (ROMANOV et coll., 1980).

3.3. Transport des acides dicarboxyliques en C4

Le tableau 3 résume les études de transport des acides dicarboxyliques chez les différentes espèces de *Rhizobium*.

Espèce et souche étudiées	Substrat transporté	Paramètres cinétiques		Inhibition du transport par				Nature de l'accumulation	Nature du système	Références
		Km(a)	Vmax(b)	Découplants énergétiques	NEM	Cyanure	Arséniate			
R. leguminosarum										
GF 160	succinate malate	2,6	78,0					Active par énergisation de la membrane		Finan et coll., 1981
CFS 18	succinate malate	1,9	36,0	++	ND	ND	-	"	inductible	
WU 235	succinate	ND	ND	++	++	++	-	"	constitutif	Glenn et coll., 1980
R. cowpea										
NGR 234	succinate	ND	ND	++	ND	ND	ND	"	inductible	Saroso et coll., 1984
USDA 3278	succinate malate	10,0 6,1	23,0 7,7	++ ++	++ ++	++ ++	- -	" "	constitutif	San Francisco et Jacobson, 1985
R. japonicum										
USDA I-110	succinate malate	7,5 6,7	22,5 12,6	++ ++	++ ++	++ ++	- -	" "	" "	San Francisco et Jacobson, 1985
USDA 110 USDA 217	succinate succinate	3,8 1,8	1,6 3,3	++ ++	ND ND	++ ++	- -	" "	plutôt inductible	McAllister et Lepo, 1983
R. trifolii										
CF 7012	succinate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	inductible	Ronson et coll., 1981

Tableau 3 - Le transport des acides dicarboxyliques en C₄ et sa régulation chez les cellules libres de Rhizobium (d'après THEODOROPOULOS, 1986).

Abréviations utilisées :

ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ; = : inhibition entre 55 et 80 % ; + : inhibition entre 45 et 55 % ; - : pas d'inhibition ; (a) valeurs exprimées en μ Molaire ; (b) : valeurs exprimées en nmoles.mn x mg de protéines.



Les cinétiques d'accumulation montrent que les perméases spécifiques aux acides dicarboxyliques fonctionnent comme des enzymes Michaeliennes, les k_m apparents sont de l'ordre du millimolaire.

Le transport de ces acides est réalisé par un mécanisme actif et la nature inductible ou constitutive du système perméasique est dépendante de la souche étudiée.

RONSON et coll. (1981) et FINAN et coll. (1981) ont montré, respectivement chez *R. trifolii* et *R. leguminosarum*, que le succinate, malate et fumarate possèdent le même système de transport en vertu de l'inhibition compétitive exercée par le fumarate ou le malate sur le transport du succinate et aussi du fait que les mutants déficients au niveau de la perméase au succinate n'utilisent pas non plus les deux autres acides dicarboxyliques.

L'importance majeure de ce système de transport, comme support de la fixation d'azote, a été montrée chez diverses espèces de *Rhizobium*. Ainsi, des mutants de *R. trifolii* (RONSON et coll., 1981), *R. leguminosarum* (FINAN et coll., 1981) et *R. meliloti* (BOLTON et coll., 1986), incapables de transporter les acides dicarboxyliques en C_4 , forment des nodules inefficients. Ces nodules sont blanchâtres et dépourvus de lég'hémoglobine (FINAN et coll., 1981 ; RONSON et coll., 1981).

IV. - METABOLISME DES SUBSTRATS CARBONES PAR LES CELLULES LIBRES DE RHIZOBIUM

Les figures 1 et 2 représentent les principales voies de dégradation des substrats carbonés chez *Rhizobium*.

4.1. Métabolisme des disaccharides

L'utilisation des disaccharides est restreinte aux Rhizobia à croissance rapide (MARTINEZ-DRETS et coll., 1974 ; GLENN et DILWORTH, 1981b).

- L'invertase est détectée uniquement dans les extraits de cellules de *R. meliloti*, *R. leguminosarum* et *R. trifolii* (MARTINEZ-DRETS et coll., 1974). Son activité est élevée lorsque les cellules sont cultivées sur saccharose indiquant la nature inductible de cette enzyme.

- Le métabolisme du lactose est aussi réduit aux Rhizobia à croissance rapide (GLENN et DILWORTH, 1981b). La β -galactosidase est présente dans les extraits

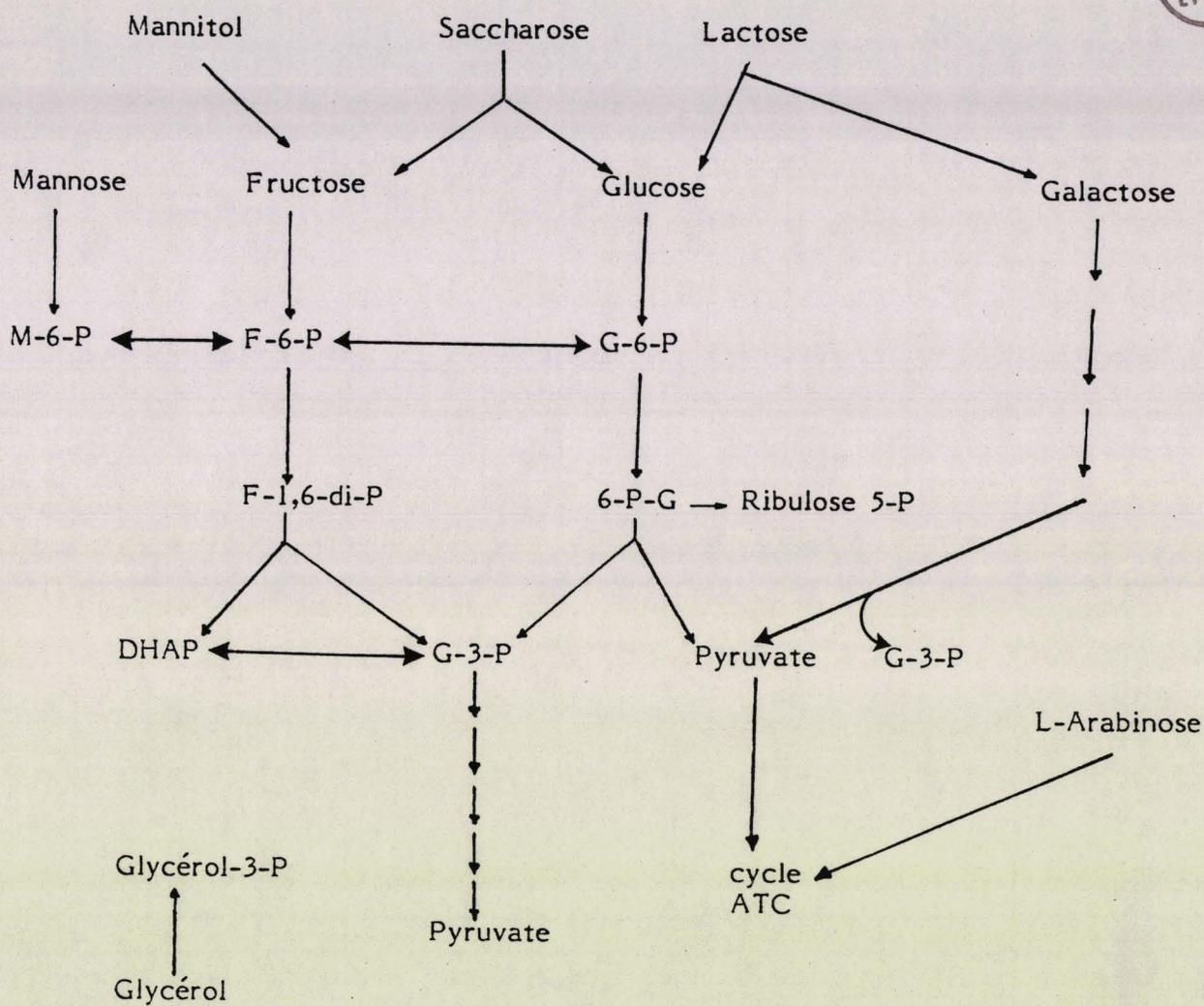


Figure 1 - Métabolisme des substrats carbonés chez *Rhizobium* à croissance rapide.

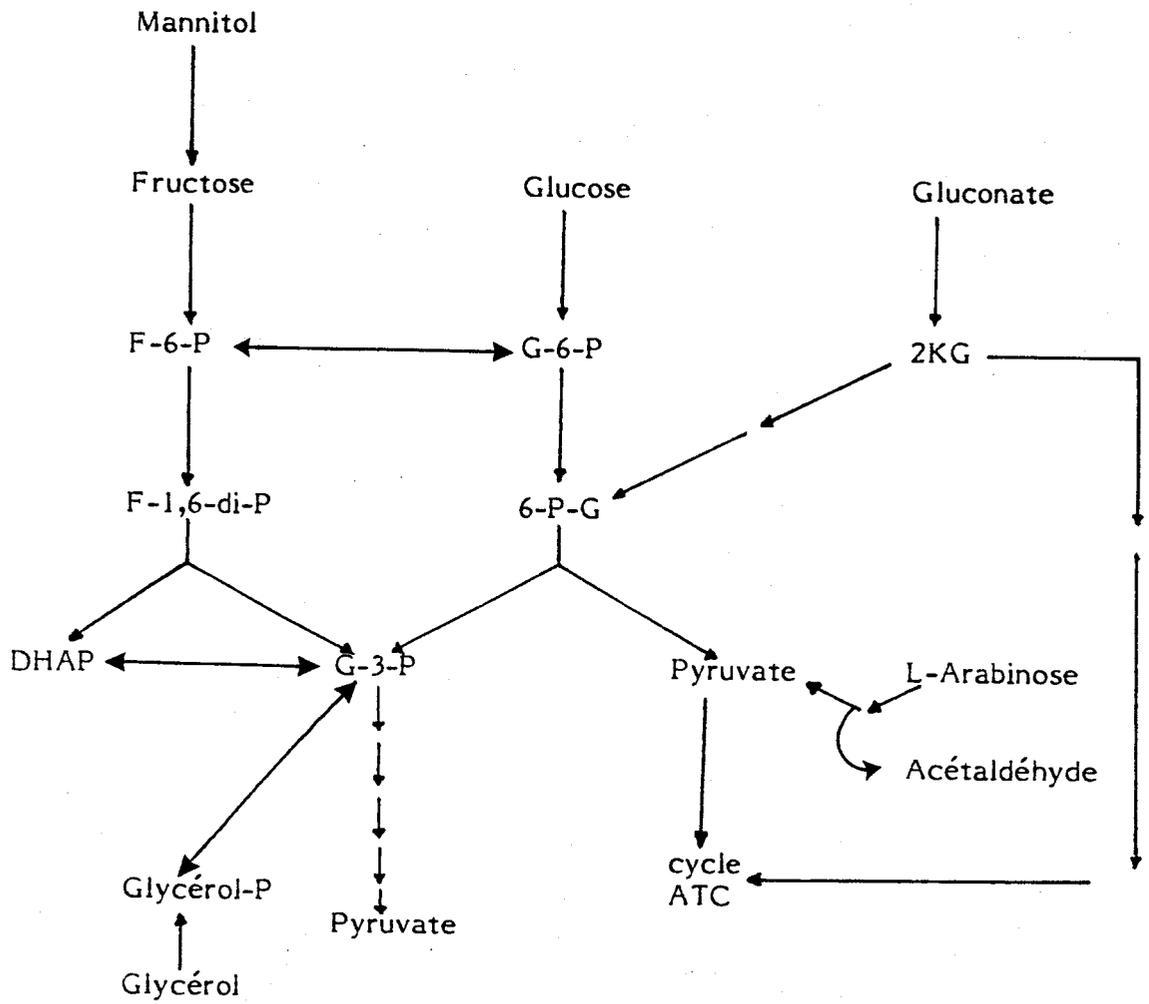


Figure 2 - Métabolisme des substrats carbonés chez Rhizobium à croissance lente.

cellulaires de *R. meliloti*, *R. leguminosarum* et *R. trifolii* en croissance sur lactose (UCKER et SIGNER, 1978 ; GLENN et DILWORTH, 1981b) et la nature inductible ou constitutive est dépendante de la souche étudiée.

UCKER et SIGNER (1978) observent chez *R. meliloti* une croissance diauxique en présence de lactose et de succinate. Ce dernier réduit le taux de β -galactosidase. Ils suggèrent que le succinate est un répresseur catabolique de la β -galactosidase.

4.2. Métabolisme des hexoses

Les analyses enzymatiques (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; KEELE et coll., 1969 ; GLENN et coll., 1984b) et radiorespirométriques (KEELE et coll., 1970 ; STOWERS et EAGLESHAM, 1984) ont permis de montrer l'importance de la voie d'Entner-Doudoroff dans la dégradation des hexoses dans la majorité des espèces de *Rhizobium*.

- La production de pyruvate à partir de gluconate-6-phosphate et aussi la présence de la gluconate-6-phosphate déshydratase et de la 2-céto-3-désoxy-gluconate-6-phosphate aldolase ont été observées pour des cellules en croissance sur glucose (KEELE et coll., 1969 ; MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972 ; STOWERS et ELKAN, 1983 ; GLENN et coll., 1984b). L'importance de la voie ED dans la dégradation du glucose a été confirmée en utilisant la radiorespirométrie, notamment chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1969 ; KEELE et coll., 1970) et *Rhizobium* sp. 32H1 (STOWERS et ELKAN, 1983 ; STOWERS et ELKAN, 1984).

La voie d'Embden-Meyerhoff Parnas est présente chez *R. japonicum* (MULONGOY et ELKAN, 1977a), *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1983) et absente chez *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979), *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984b) et *R. meliloti* (ARIAS et coll., 1979).

La dégradation du glucose par cette voie a été corrélée au taux d'efficacité symbiotique chez *R. japonicum* (MULONGOY et ELKAN, 1977a). Cette relation reste invérifiée du moment que les bactéroïdes de *R. japonicum* ne peuvent ni transporter ni métaboliser activement le glucose (TUZIMURA et MEGURO, 1960 ; REIBACH et STREETER, 1984).

La voie de Dickens-Horecker ou voie des pentoses phosphates est rencontrée exclusivement chez les *Rhizobia* à croissance rapide. MARTINEZ-DRETS et ARIAS (1972) utilisent la gluconate-6-phosphate déshydrogénase à NADP, l'enzyme clef de cette voie, pour différencier les deux groupes de *Rhizobium*.

- Le métabolisme du fructose a été étudié chez *R. meliloti* et *R. leguminosarum* en utilisant des mutants fructokinase⁻ (GARDIOL et coll., 1980 ; GLENN et coll., 1984a) incapables d'utiliser le fructose. La capacité de ces mutants à croître sur glucose ou mannose indique la spécificité de la fructokinase pour son substrat.

D'autre part, GLENN et coll. (1984b) ont montré, chez *R. leguminosarum*, que le fructose rejoint le 6-P-G respectivement par l'intermédiaire de la fructokinase, de la glucose-6-phosphate isomérase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Le gluconate-6-phosphate est ensuite métabolisé par les voies ED et PP.

A côté des voies du métabolisme énergétique du glucose et du fructose, *R. meliloti* emprunte d'autres voies annexes. Le glucose est à l'origine d'une acidification des milieux d'incubation due à la production d'acide 2-cétogluconique (HORNEZ et coll., 1976) alors que le fructose favorise la production d'exopolysaccharides (COURTOIS et coll., 1983). Ce critère a été utilisé pour différencier *R. meliloti* des autres espèces de *Rhizobium* à croissance rapide.

- Le métabolisme du mannose a été étudié chez *R. meliloti* (ARIAS et coll., 1982). La mannokinase fournit le mannose-6-phosphate qui, par isomérisation, donne le F-6-P. Ce dernier est utilisé par la voie ED.

- Deux voies d'utilisation du galactose sont connues chez les bactéries :

- la voie Leloir (MAXWELL et coll., 1962) présente chez les entérobactéries :
Gal → Gal-1-P → G-1-P → G-6-P,
- et la voie De Ley-Doudoroff présente chez les espèces de *Pseudomonas* (DE LEY et DOUDOROFF, 1957) : Gal → galactono-γ-lactone → galactonate → 2 céto-3-désoxy-gluconate-6-phosphate → pyruvate + glycéraldéhyde-3-phosphate.

La présence d'activité galactose déshydrogénase chez *R. meliloti* (CERVENANSKY et ARIAS, 1984) et *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979), ainsi que la capacité des mutants G-6-P déshydrogénase⁻ et ED⁻ à croître sur galactose suggèrent que la voie Leloir n'est pas fonctionnelle chez *Rhizobium*. D'autre part, ARIAS et CERVENANSKY (1986) ont montré chez *R. meliloti* la présence des enzymes de la voie De Ley-Doudoroff et l'incapacité des mutants 2 céto-3-désoxy-galactonate-6-phosphate aldolase⁻ à croître sur galactose.

4.3. Métabolisme des polyols

Le mannitol et l'arabitol utilisent une même déshydrogénase chez *R. meliloti* (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970), tandis que le sorbitol est métabolisé en fructose par une déshydrogénase spécifique.

Le glycérol est transformé en glycérate-3-phosphate par l'intermédiaire de la glycérol kinase et de la glycérol phosphate déshydrogénase. Le glycérate-3-phosphate est ensuite métabolisé en pyruvate (ARIAS et MARTINEZ-DRETS, 1976).

4.4. Métabolisme des pentoses

- Chez les *Rhizobia* à croissance lente, l'arabinose est déshydrogéné en L-arabinolactone, qui est hydrolysé en arabinate. Celui-ci est déshydraté en 2-céto-3-désoxy-arabinate, qui se scinde en pyruvate et acétaldéhyde par l'intermédiaire de l'aldolase (PEDRODZ et ZANCAN, 1974). Cette enzyme est absente chez les *Rhizobia* à croissance rapide (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972) qui utilisent préférentiellement la 2-céto-3-désoxy arabinate déshydratase (DUNCAN, 1979).

- Les voies d'utilisation du xylose et du ribose ne sont pas bien déterminées chez *Rhizobium*. Ainsi, le mutant ribokinase⁻ de *R. leguminosarum* (DILWORTH et coll., 1986) est incapable de croître sur ribose, mais continue à consommer ce pentose à la même vitesse que la souche sauvage.

Chez *R. meliloti*, le mutant G-6-P isomérase⁻, bloqué au niveau du F-6-P, est incapable d'utiliser le xylose ou le ribose. Le métabolisme de ces deux substrats a lieu via le F-6-P (ARIAS et coll., 1979).

4.5. Métabolisme des acides organiques

Le succinate, le fumarate et le malate sont métabolisés suivant le cycle des acides tricarboxyliques (KEELE et coll., 1970 ; MULONGOY et ELKAN, 1977a ; STOWERS et ELKAN, 1984).

Le mutant succinate déshydrogénase⁻ de *R. meliloti* (GARDIOL et coll., 1982) est incapable d'utiliser le succinate, le glutamate, l'acétate, le pyruvate ou l'arabinose comme source de carbone. Ces substrats rejoignent le cycle des ATC.

Le gluconate est utilisé chez *R. japonicum* (KEELE et coll., 1970) et *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1984) principalement par la voie ED et à un degré moindre par la voie céto-gluconate (KG) suivant laquelle le 2-céto-gluconate, issu de la déshydrogénation du gluconate, est soit phosphorylé en 2-céto-6-phosphogluconate puis réduit en 6-phosphogluconate, soit soumis à la voie non phosphorylée qui conduit à l' α -céto-glutarate.

V. - TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONES PAR LES BACTEROIDES

Une variété de substrats carbonés, disponibles dans le cytosol des cellules hôtes, constitue des sources d'énergie potentielle pour la réduction de l'azote atmosphérique chez les bactéroïdes.

Le saccharose, le glucose et le fructose sont les plus abondants dans les nodules de Légumineuses (LAWRIE et WHEELER, 1975 ; ANTONIW et SPRENT, 1978). GLENN et DILWORTH (1981b) montrent que ces substrats ne sont pas transportés par les bactéroïdes des espèces à croissance rapide ou lente. Cependant, les bactéroïdes de *R. lupini* incorporent et utilisent le glucose durant des temps d'incubation de 5 à 15 mn (ROMANOV et coll., 1980 ; KRETOVICH et coll., 1985). Chez *R. japonicum*, le glucose est accumulé par diffusion facilitée (REIBACH et STREETER, 1984).

Le transport des acides dicarboxyliques est d'un intérêt particulier du fait que ces composés sont oxydés par les bactéroïdes de *Rhizobium* (TUZIMURA et MEGURO, 1960 ; GLENN et DILWORTH, 1981b) et aussi du fait qu'ils supportent l'activité nitrogénasique (BERGERSEN, 1977). Les différentes études sur les systèmes de transport des acides dicarboxyliques en C_4 et leur régulation chez les bactéroïdes sont représentées dans le tableau 4.

Le succinate est transporté par les bactéroïdes de *Rhizobium* selon un mécanisme actif par énergisation de la membrane plasmique. La perte d'un tel système de transport est à l'origine de la perte d'activité nitrogénasique. En effet, les mutants déficients au niveau du transport des acides dicarboxyliques en C_4 donnent des nodules inefficients (GLENN et BREWIN, 1981 ; RONSON et coll., 1981 ; FINAN et coll., 1983 ; ARWAS et coll., 1985 ; BOLTON et coll., 1986).

Bactéroïdes	Substrat transporté	Paramètres cinétiques		Inhibition du transport par				Nature de l'accumulation	Nature du système	Références
		Km(a)	Vmax(b)	Découplants énergétiques	NEM	Cyanure	Arséniate			
R. leguminosarum										
WU 235	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	active	constitutif	Glenn et coll., 1980
RBL 1	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	"	"	De Vries et coll., 1982
MNF 3841	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	"	"	Glenn et coll., 1984b
GF 160	succinate	1,5	23,00	+	ND	ND	-	"	inductible	Finan et coll., 1983
GF 252	succinate	2,5	9,20	ND	ND	ND	ND	"	"	Finan et coll., 1983
R. japonicum										
USDA 1-110	succinate	10,1	3,00	+	++	++	-	"	constitutif	San Francisco et Jacobson, 1985
USDA 1-110	malate	20,4	2,00	+	++	++	-	"	"	
USDA 111, USDA 138, 8-D et 8-T	succinate malate	40,0 40,0	2,72(c) 1,05(c)	+ ND	ND ND	ND ND	ND ND	" "	ND ND	Reibach et Streeter, 1984
R. cowpea										
USDA 3278	succinate malate	10,4 15,1	0,70 0,27	++ +	++ ++	++ ++	- -	" "	inductible "	San Francisco et Jacobson, 1985

Tableau 4 - Le transport des acides dicarboxyliques en C₄ et sa régulation chez des bactéroïdes isolés des nodules (d'après THEODOROPOULOS, 1986).

Abréviations utilisées :

ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ; = : inhibition entre 55 et 80 % ; + : inhibition entre 45 et 55 % ; - : pas d'inhibition ; (a) valeurs exprimées en μ Molaire ; (b) : valeurs exprimées en nmoles.mn x mg de protéines ; (c) : valeurs exprimées en nmoles.mn x mg de bactéroïdes.



VI. - METABOLISME DES SUBSTRATS CARBONES CHEZ LES BACTEROIDES

Les glucides sont généralement non métabolisés par les bactéroïdes de *Rhizobium* (TUZIMURA et MEGURO, 1960). Cependant, chez les bactéroïdes de *Bradyrhizobium japonicum*, la forte accumulation du tréhalose (SALMINEN et STREETER, 1987) et l'activité élevée de la tréhalase (SALMINEN et STREETER, 1986) fournissent le glucose qui est métabolisé principalement par la voie des PP et à un degré moindre par la voie EMP. REIBACH et STREETER (1983) montrent chez les bactéroïdes de *R. japonicum* l'absence des voies ED, PP et EMP. Les bactéroïdes de *R. leguminosarum* possèdent les enzymes clefs des voies ED et PP (GLENN et coll., 1984b). Les activités des enzymes impliquées dans la dégradation des hexoses sont présentes chez les bactéroïdes à des taux très faibles relativement aux activités très élevées des enzymes du cycle des ATC (KARR et coll., 1984), ceci en rapport avec la faible vitesse d'oxydation des sucres relativement au succinate.

L'utilisation de mutants déficients au niveau du métabolisme des sucres (ARIAS et coll., 1979 ; GARDIOL et coll., 1980 ; DUNCAN, 1981 ; ARIAS et coll., 1982 ; CERVENANSKY et ARIAS, 1984 ; GLENN et coll., 1984a) a permis de montrer la non implication de ces substrats dans l'établissement d'une symbiose efficiente. En effet, excepté le mutant fructokinase⁻ de *R. meliloti* (DUNCAN, 1981), tous les autres mutants sont capables de fixer l'azote atmosphérique.

Les acides organiques sont considérés comme étant la source d'énergie primaire pour les bactéroïdes (RONSON et coll., 1981 ; GARDIOL et coll., 1982). Les activités des enzymes du cycle des ATC sont présentes chez les bactéroïdes et comparables à celles des cellules libres de *Rhizobium* (KURZ et LARUE, 1977 ; STOVALL et COLE, 1978 ; DUNCAN et FRAENKEL, 1979 ; KARR et coll., 1984).

Les mutants α -cétoglutarate déshydrogénase⁻ et succinate déshydrogénase⁻ de *R. meliloti* (DUNCAN et FRAENKEL, 1979 ; GARDIOL et coll., 1982) donnent des nodules inefficients et rendent compte de l'intérêt d'un cycle ATC fonctionnel pour l'établissement d'une symbiose efficiente.

Les nodules induits par de tels mutants ou par les mutants de transport des acides dicarboxyliques en C₄ sont blanchâtres et dépourvus de lég'hémoglobine. Cette protéine assure le transport de l'oxygène du cytosol anaérobique des cellules hôtes aux bactéroïdes (WITTENBERG et coll., 1974). Elle renferme l'hème responsable de la coloration rosâtre des nodules. Le succinyl CoA est le précurseur de la biosynthèse de l'hème (AVISSAR et NADLER, 1978).

Les acides dicarboxyliques en C₄ peuvent donc jouer à la fois le rôle de substrats énergétiques pour la fixation de l'azote et aussi être les précurseurs de la biosynthèse de l'hème (RONSON et coll., 1981 ; FINAN et coll., 1983).

TAJIMA et coll. (1985) montrent *in vitro*, chez les bactéroïdes isolés de *R. japonicum*, une augmentation de l'activité nitrogénasique lors de l'addition du succinate et de la léghémoglobine à l'acétylène. D'autre part, la dégradation des acides organiques est accélérée en présence d'oxygène à 20 %. Les mêmes profils de dégradation sont observés en présence de léghémoglobine et à faible concentration en oxygène (1 %).

VII. - CONCLUSION

Les études entreprises sur le métabolisme énergétique chez les cellules libres de *Rhizobium* ont permis de montrer que :

- les cellules libres utilisent un grand nombre de substrats carbonés pour la croissance et la production d'énergie ;
- la voie ED et le cycle des ATC sont présents chez toutes les espèces de *Rhizobium* ;
- la voie des PP est restreinte aux *Rhizobia* à croissance rapide ;
- la voie EMP est présente chez les *Rhizobia* à croissance lente et l'utilisation du glucose par cette voie a été corrélée à une augmentation de l'activité nitrogénasique chez *R. japonicum* (MULONGOY et ELKAN, 1977a) ;
- l'accumulation des hexoses et des acides dicarboxyliques a lieu selon un processus actif par énergisation de la membrane ;
- le succinate réprime les activités fructose perméase, glucose perméase et β -galactosidase.

L'analyse des résultats publiés sur le transport et l'oxydation des substrats carbonés par les bactéroïdes de *Rhizobium* indique le rôle que peuvent jouer les acides organiques en tant que support énergétique pour la réduction de l'azote atmosphérique. En effet, les bactéroïdes de *Rhizobium* sont capables de transporter et d'oxyder activement les acides organiques, alors que le transport et l'oxydation des sucres ont lieu passivement.

En raison de la forte concentration des sucres au sein des nodules et de leur diffusion passive, ces substrats peuvent participer à la biosynthèse des barrières cellulaires, du glycogène et du tréhalose dans les bactéroïdes (REIBACH et STREETER, 1983 ; SALMINEN et STREETER, 1986).

L'isolement et la caractérisation de mutants métaboliques chez **Rhizobium** offrent l'opportunité d'une étude complémentaire des mécanismes d'utilisation des substrats carbonés par **Rhizobium** et leur régulation symbiotique.

Dans cette optique, nous avons cherché des mutants de transport ou de métabolisme des substrats carbonés chez **R. meliloti**. Ceci nous a permis d'envisager l'étude à la fois du transport et/ou du métabolisme de ces substrats ainsi que la nature des sources de carbone transmises aux bactéroïdes lors d'une symbiose efficiente.

MATERIEL ET METHODES

I. - SOUCHES BACTERIENNES

La souche sauvage utilisée est *Rhizobium meliloti* M5N1 efficiente pour la Luzerne (*Medicago sativa*).

Les mutants HD1 et DC1, isolés à partir de cette souche ainsi que les révertants DC2 et DC3, sont décrits dans le texte.

Les différentes souches sont conservées à - 20°C dans le milieu TY (BERINGER, 1974) en présence de glycérol à 20 %.

II. - TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE

2.1. Tampon de non prolifération (TNP)

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
QSP 1 l d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,4.	

2.2. Milieu minimum de croissance (RHBI)

- Tampon R

K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ NO ₃	1 g
QSP 1 l d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,4.	

Pour le milieu gélosé, on ajoute 15 g/l d'Agar Difco. Le milieu minimum de croissance est le tampon R auquel on ajoute la biotine à 0,01 mg/l, la thiamine à 0,5 mg/l et la source de carbone à la concentration désirée.

Les vitamines et les sources de carbone sont stérilisées à 105°C pendant 30 mn.

2.3. Milieu riche TY (Tryptone-Yeast)

Tryptone	5 g
Extrait de levure (Difco)	3 g
CaCl ₂ , 6H ₂ O	1,3 g
QSP 1 l d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,4.	

2.4. Milieu RC

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Extrait de levure	1 g
QSP 1 l d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,4.	

2.5. Milieu de NICOL et THORNTON

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
FePO ₄	1 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2 g
FeCl ₃	1 ml d'une solution mère à 10 g/l
QSP 1 l d'eau distillée.	

Ce milieu est utilisé pour la culture des graines de Luzerne.

Tous les milieux et tampons utilisés sont stérilisés à 120°C pendant 20 mn sauf le milieu NICOL et THORNTON dont la stérilisation s'effectue à 105°C pendant 30 mn.

III. - CROISSANCE BACTERIENNE

Un litre du milieu RHB1 additionné de la source de carbone est inoculé avec 10 ml d'une préculture de même composition que le milieu d'incubation. Les cultures sont réalisées en fiole à toxine de 2 l sous agitation rotative à 30°C.

Les temps de génération sont déterminés en suivant l'absorbance des cellules à 600 nm.

IV. - TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONES

4.1. Préparation des cellules pour les études de transport

Les cultures, en fin de phase exponentielle, sont récoltées par centrifugation à 8 000 g durant 20 mn. Le culot est lavé 2 fois avec du TNP et repris dans un petit volume de ce même tampon. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues sont conservées à 4°C après avoir mesuré leur absorbance à 600 nm.

4.2. Transport des substrats

Les produits radiomarqués utilisés sont :

- D(U-¹⁴C) fructose (286 mCi/mole) obtenu du Centre radiochimique Amersham ;
- (U-¹⁴C) acide succinique (144 mCi/mole) obtenu du Centre d'études nucléaires de Saclay.

Pour les mesures d'incorporation, 1 ml de la suspension cellulaire à DO1 (DO1 = $1,2 \cdot 10^9$ cells/ml) est pré-incubé 15 mn à 30°C avant l'addition du substrat à 0,1 mM. Des prélèvements de 0,1 ml sont effectués à différents temps d'incubation, filtrés immédiatement sur filtres Millipore de 0,45 µm et rincés par 2 ml de TNP + NaCl à 5 % à 0°C. Les filtres sont ensuite séchés sous lampe infra-rouge pendant 30 mn puis déposés dans des pots à scintillation. On ajoute 7,5 ml de liquide scintillant (Lipoluma).

La radioactivité est déterminée sur le compteur à scintillation liquide de type "Beckman".

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

Pour l'étude de la nature du système de transport, l'inhibiteur métabolique est ajouté 30 sec avant l'addition du substrat radiomarqué.

Pour les études d'inhibition compétitive, le substrat à une concentration donnée et l'inhibiteur sont ajoutés simultanément aux cellules (DO 0,3) préalablement incubées à 30°C.

V. - ETUDE DE LA NATURE DES PRODUITS ACCUMULES

5.1. Préparation du pool intracellulaire

Les cellules, provenant de 10 ml de culture en présence de fructose radiomarqué, sont lavées 2 fois, reprises dans 10 ml d'eau distillée et portées à 100°C pendant 10 mn.

Les débris membranaires sont éliminés par centrifugation à 12 000 g durant 20 mn. Le surnageant est évaporé par l'évaporateur rotatif à sec, repris par 0,1 ml d'eau distillée et gardé à - 20°C pour l'analyse chromatographique.

5.2. Analyse chromatographique

Le fructose et le F-6-P, présents dans le pool intracellulaire, sont séparés sur couche mince en gel de silice 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'orcinoïl 0,1 % (P/v) dans H₂SO₄ à 20 %. Le gel est découpé en bandes de 1 cm et celles correspondant au fructose et au F-6-P sont comptées en scintillation liquide.

VI. - DOSAGES ENZYMATIQUES

6.1. Préparation des extraits cellulaires de protéines

Les cellules provenant de cultures en phase exponentielle sont récoltées par centrifugation à 8 000 g durant 20 mn, lavées 2 fois au tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,2 et resuspendues dans le même tampon additionné de β-mercaptoéthanol à 0,1 mM.

Les cellules sont ensuite traitées aux ultrasons à 0°C (MSE 150 W Ultrasonic Desintegrator ; λ = 15,5 μ) pendant 5 périodes de 30 sec séparées par intervalles de 30 sec. La température ne dépasse pas 10°C lors de ce traitement. Le broyat est centrifugé à 4°C pendant 30 mn à 27 000 g afin d'éliminer les débris membranaires.

La concentration des extraits cellulaires en protéines est déterminée par la méthode de LOWRY et coll. (1951).

6.2. Dosages enzymatiques

Les différents dosages enzymatiques sont effectués au spectrophotomètre BECKMAN DU-8B, en suivant la réduction du NAD(P) ou l'oxydation du NADH à 340 nm et à 30°C.

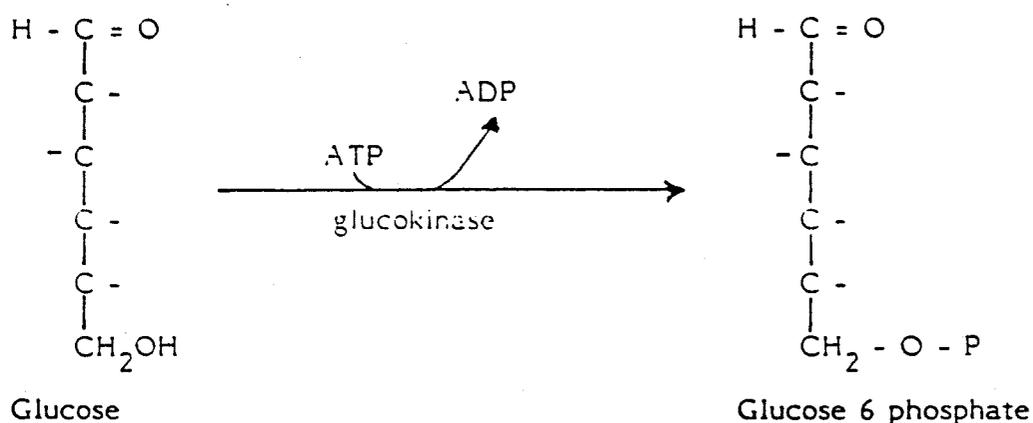
Le NAD(P)H a une bande d'absorption spécifique à cette longueur d'onde.

Les résultats sont exprimés en nmoles de produit formé par mn et par mg de protéines.

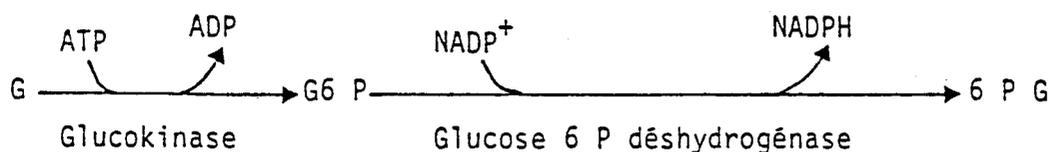
GLUCOKINASE (E.C. 2-7-1-2)



Activité



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

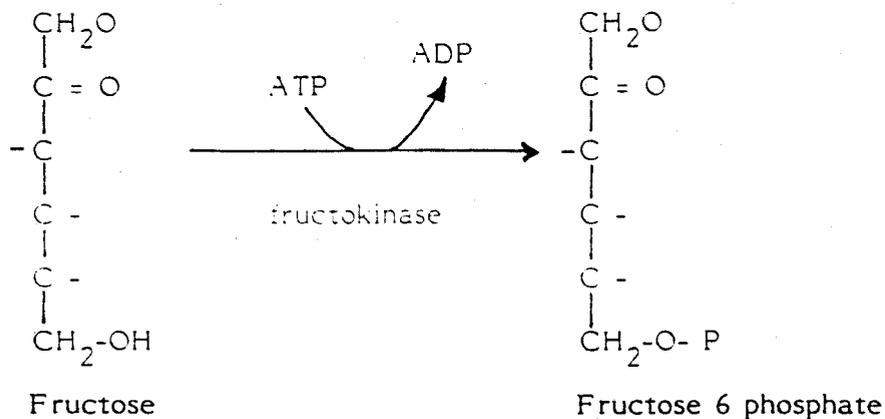


Mode opératoire

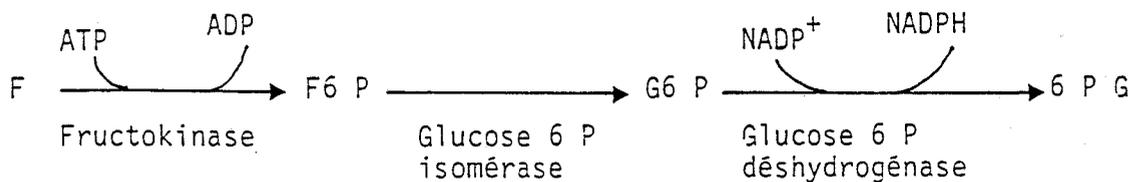
Le mélange réactionnel (3 ml) contient :

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

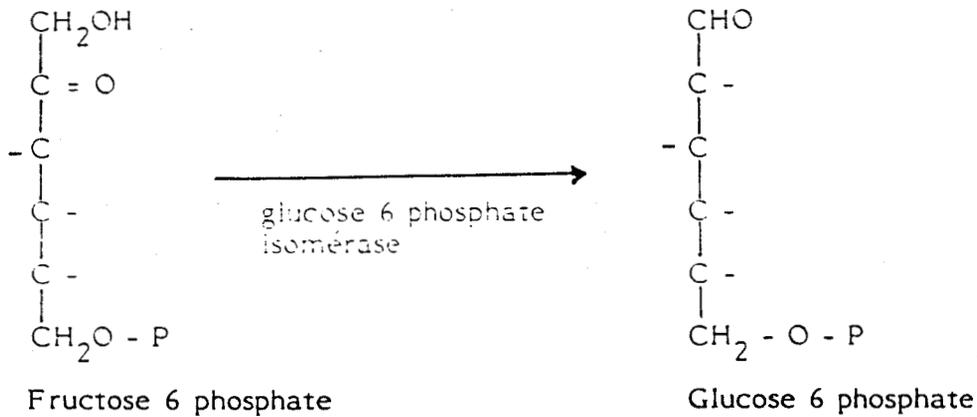
Principe de la mesure de l'activité : KEELE et coll., 1969 modifiée.

Mode opératoire

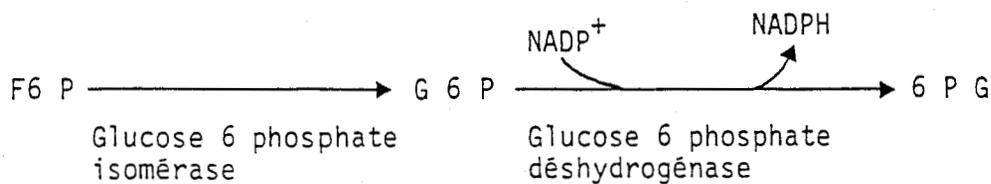
Le mélange réactionnel (3 ml) contient :

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

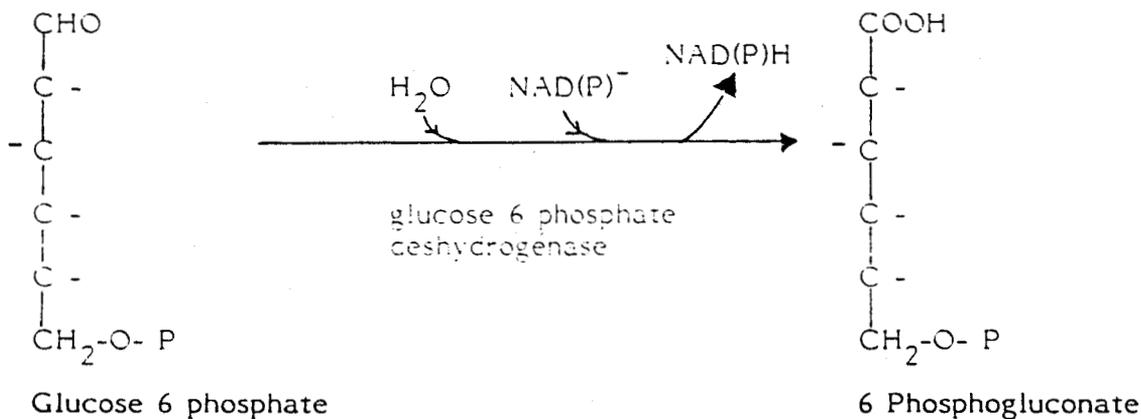
Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

Mode opératoire

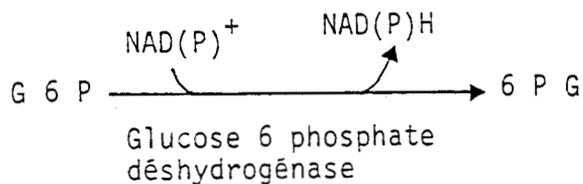
Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

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		

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

Activité

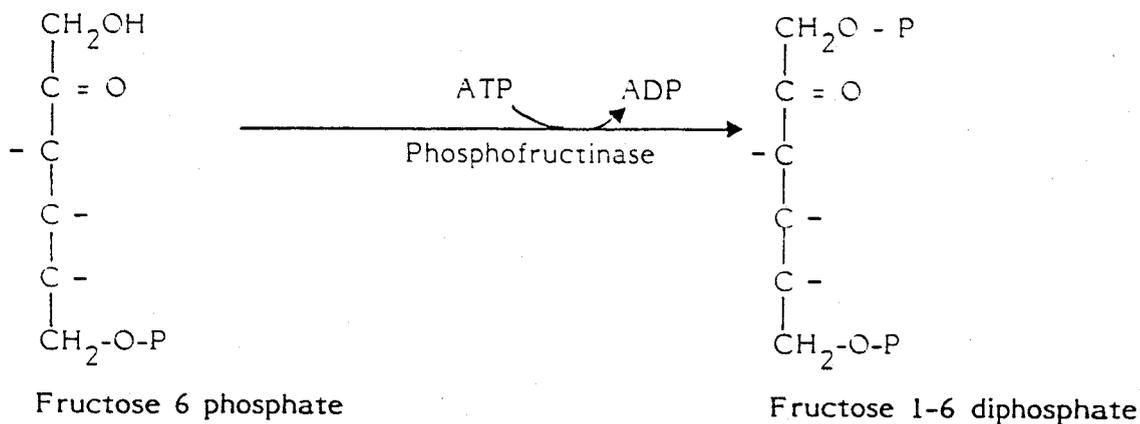
Principe de la mesure de l'activité : KEELE et coll., 1969.

Mode opératoire

Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

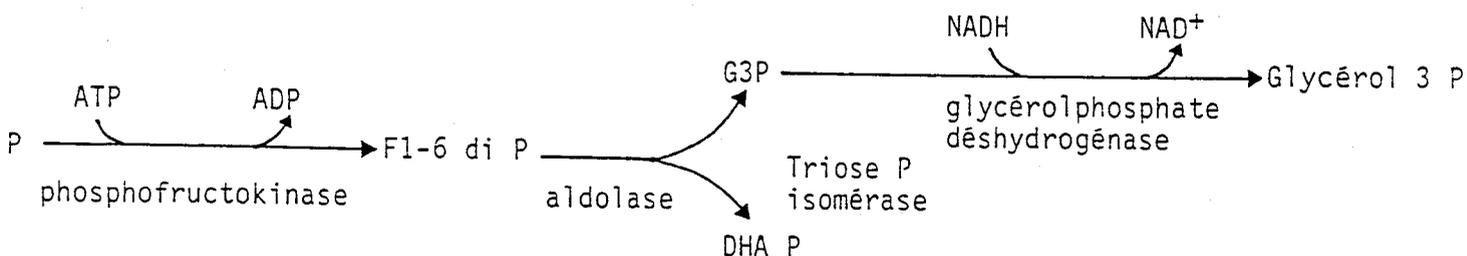
40	μmoles	tampon glycyl-glycine pH 8
12	μmoles	MgSO ₄
3	μmoles	glucose 6 phosphate
1,5	μmole	NAD(P) ⁺
extrait		

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

Activité

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

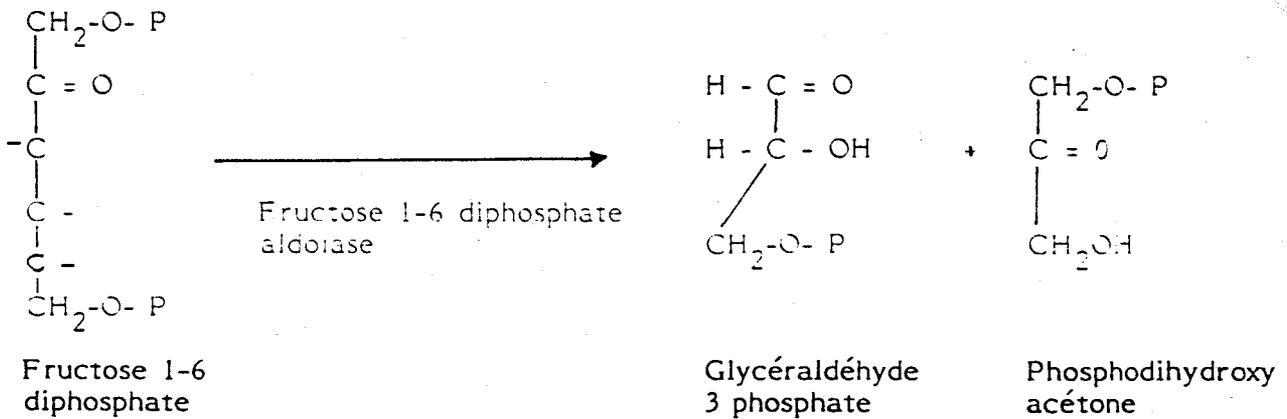
On mesure la vitesse d'oxydation du NADH conduisant à la formation du glycérol 3 phosphate (STOWERS et ELKAN, 1983).

Mode opératoire

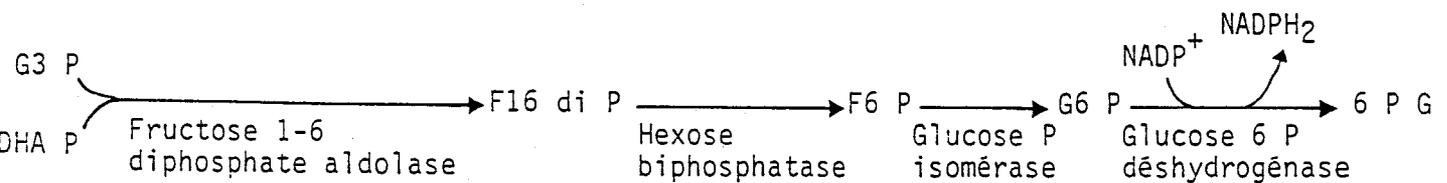
Le mélange réactionnel (2 ml) contient :

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

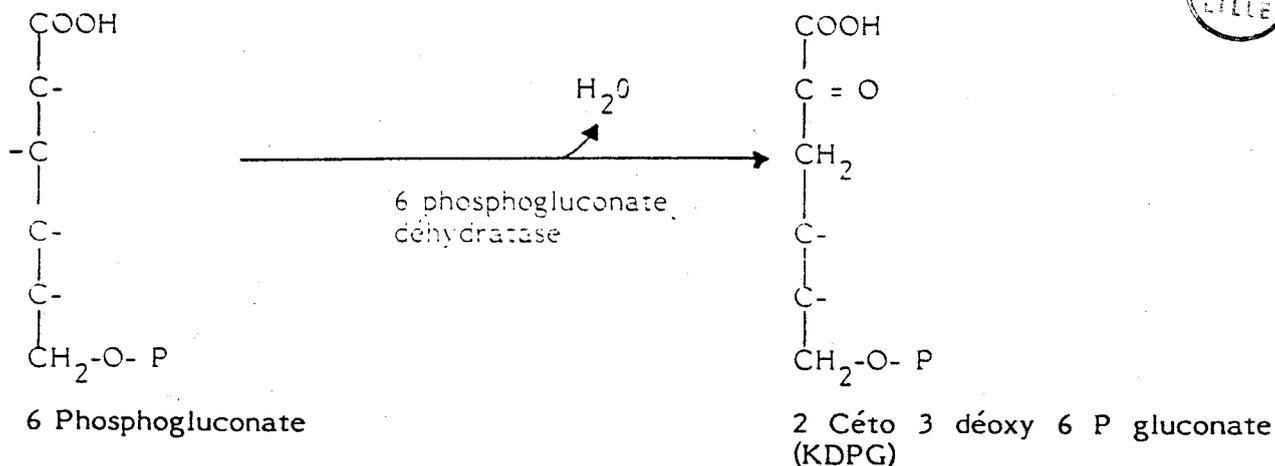
Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

Mode opératoire

Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

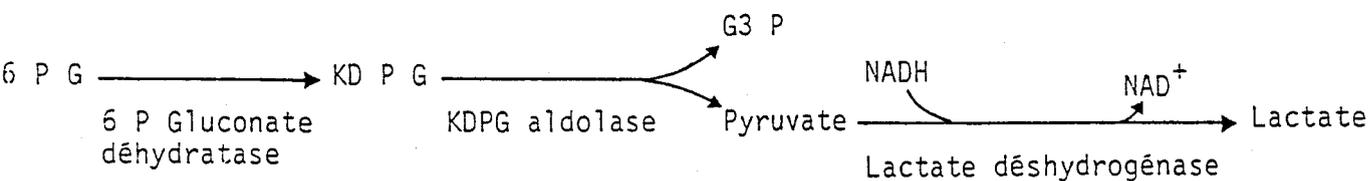
40	µmoles	de tampon glycylglycine pH 8.
12	µmoles	MgSO ₄ .
3	µmoles	G3 P
3	µmoles	DHA P
0.5	unité	hexose biphosphatase
0.5	unité	glucose 6 P isomérase
0.5	unité	G6 P DN
0.3	µmole	NADP ⁺ .
extrait		

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

Activité

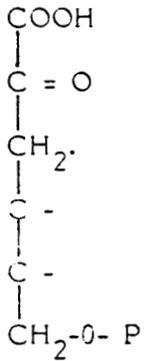
Principe de la mesure de l'activité : LESSIE et coll., 1972.

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

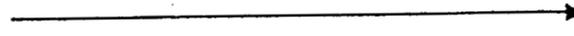
Mode opératoire

Voir Mode opératoire pour la KDPG aldolase.

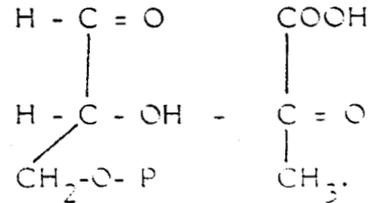
2 KETO 3 DEOXY 6 PHOSPHOGLUCONATE ALDOLASE (E.C. 4-1-2-14)

Activité

2 Céto 3 déoxy
6 phospho gluconate



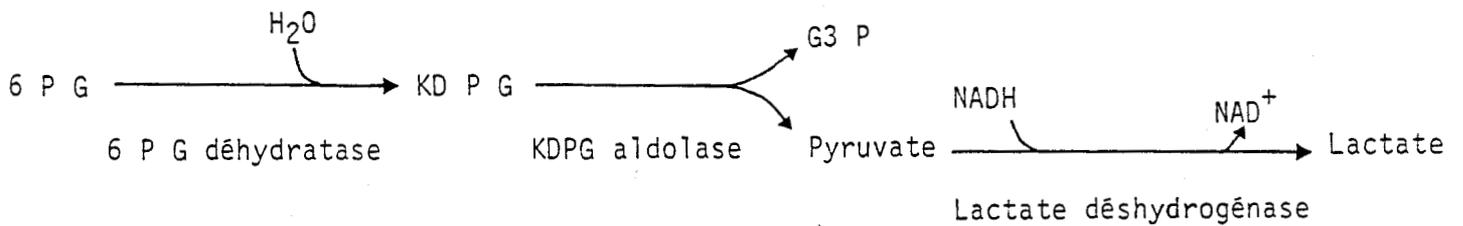
2 céto 3 déoxy 6 phosphogluconate
aldolase



Glycéraldéhyde 3 phosphate Pyruvate

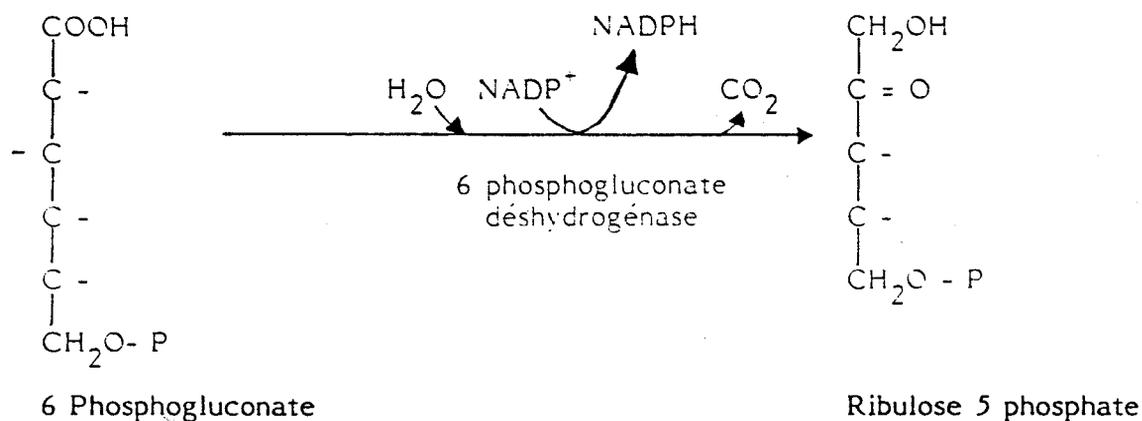
Principe de la mesure de l'activité : LESSIE et coll., 1972.

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

Mode opératoire

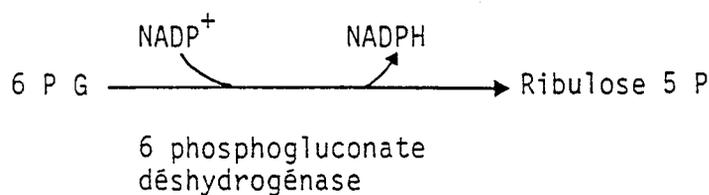
Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

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

6 PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASE A NADP^+ (E.C. 1-1-1-44)Activité

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

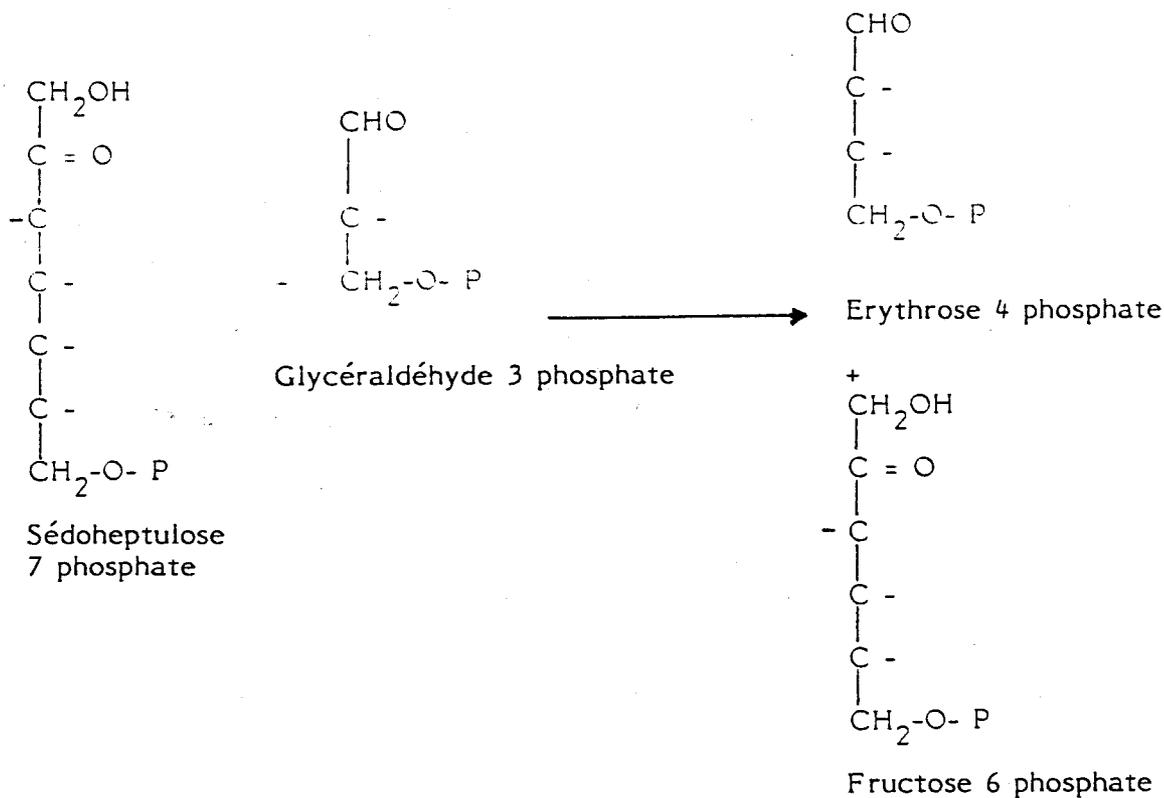
On mesure la réduction de NADP^+ à 340 nm.

Mode opératoire

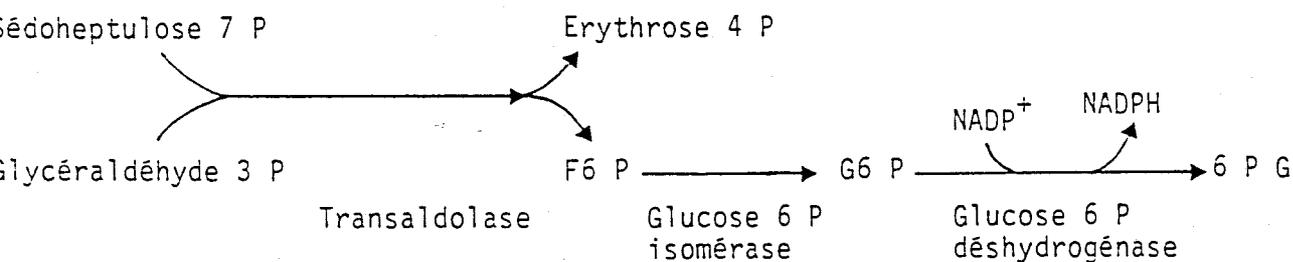
Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

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

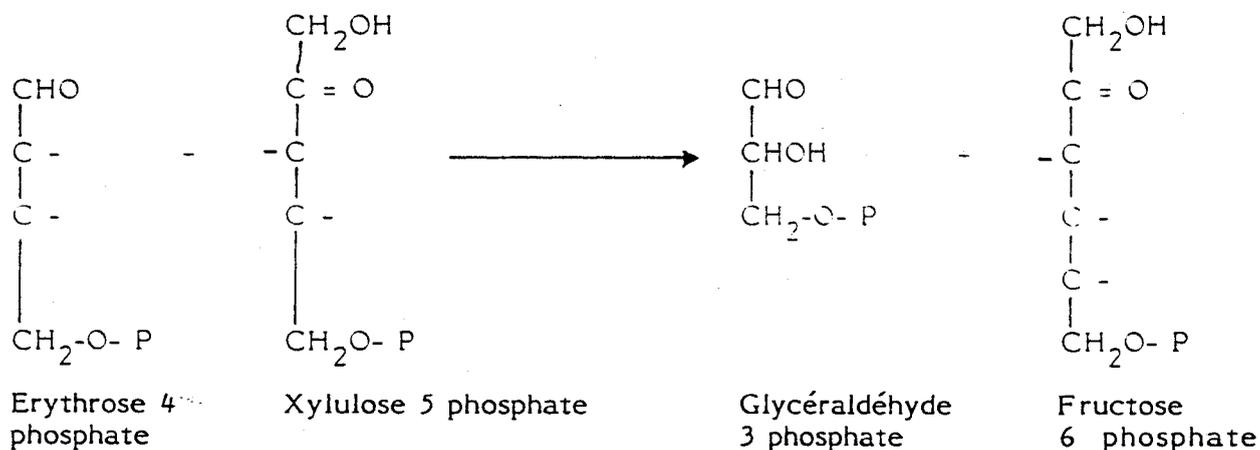
Principe de la mesure de l'activité : STOWERS et ELKAN, 1983.

Mode opératoire

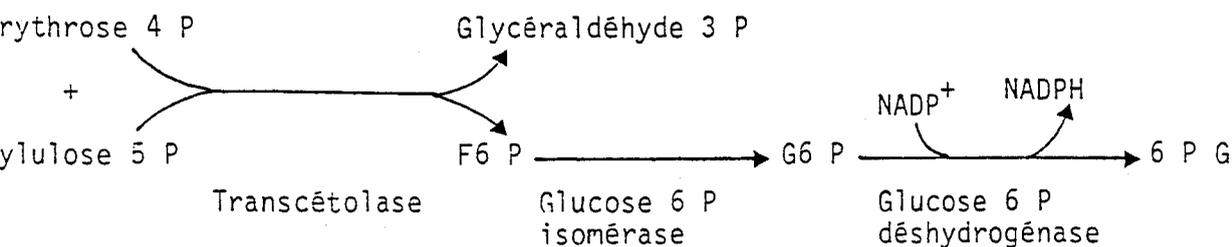
Le mélange réactionnel (1 m) contient :

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.

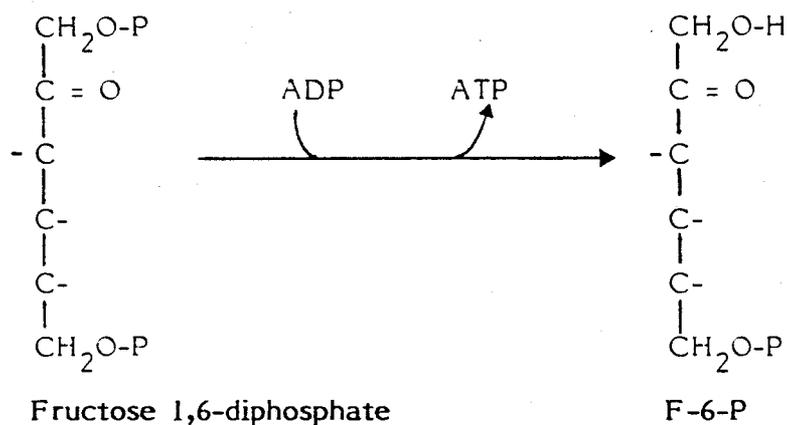
Mode opératoire

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		

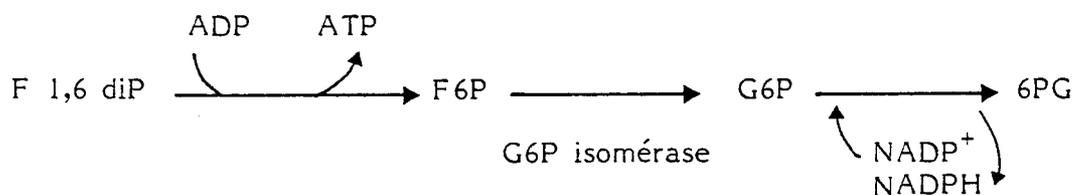
HEXOSE BIPHOSPHATASE (EC 3.1.3.11)

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		

VII. - DETERMINATION DES PROPRIETES SYMBIOTIQUES

7.1. Infectivité

Le seul critère réel pour vérifier l'appartenance d'une souche isolée au genre *Rhizobium* est le pouvoir de la bactérie à infecter les racines de la Légumineuse adéquate et d'y provoquer l'apparition de nodules.

7.1.1. Stérilisation des graines de Luzerne et prégermination

Les graines sont désinfectées pendant 5 mn en présence de chlorure mercurique à 2,5 %, et une goutte de détergent (Teepol). Le désinfectant est ensuite éliminé par plusieurs rinçages à l'eau distillée. Une vingtaine de graines sont déposées stérilement par boîte de Pétri contenant le milieu RC glucosé. La prégermination dure de 2 à 4 jours à 30°C.

7.1.2. Culture aseptique des Légumineuses

Les graines germées, d'une longueur de 1 à 2 cm, sont placées sur le support à raison de 2 plantules par tube. L'incubation s'effectue à 26°C avec 16 h d'éclairage par jour.

7.1.3. Inoculation

Les plantules sont inoculées dès apparition des racines secondaires par environ 10^6 cellules par tube, afin de minimiser le risque de réversion. La suspension bactérienne est préalablement centrifugée, lavée avec du TNP et reprise dans le même tampon.

7.2. Efficienc

Outre la nodulation, la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse aboutit à la fixation de l'azote atmosphérique : $N_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow 2NH_3$.

La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la réduction de l'azote en ions ammonium. Elle peut utiliser d'autres substrats analogues à l'azote tel que l'acétylène : $3C_2H_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow 3C_2H_4$.

La réduction d'une molécule d'azote est réalisée de la même façon que la formation de 3 molécules d'éthylène à partir d'acétylène. L'activité nitrogénasique est mesurée en utilisant l'acétylène comme substrat.

7.2.1. Conditions expérimentales

Le chromatographe est de type Intersmat I.G.C. 112 F.L.

Les conditions de dosage sont les suivantes :

- . gaz vecteur N_2
- . température du four $50^\circ C$
- . température d'injection $70^\circ C$
- . température du détecteur $115^\circ C$
- . détecteur à ionisation de flamme
- . colonne Sphérosil XoBo75 (2 m x 3,1 mm)

7.2.2. Dosage de la réduction d'acétylène

Quand les plantules sont bien développées (5 à 6 semaines), elles sont rincées à l'eau distillée et mises dans un flacon de 150 ml fermé hermétiquement (8 plantules par flacon). On prélève 17 ml d'air que l'on remplace par 15 ml d'acétylène [10 % (v/v)] et 2 ml de propane dilué 100 fois par l'air (témoin interne) de façon à avoir 1,27 μ moles. Le flacon est ensuite agité manuellement. L'incubation se fait à $30^\circ C$. La mesure de l'acétylène réduit est effectuée après différents temps d'incubation (0, 3, 6 et 8 h) par injection de 50 μ l dans le chromatographe en phase gazeuse.

7.2.3. Mesure de la quantité d'éthylène produite

La formule appliquée pour le calcul de la quantité d'éthylène produite est la suivante :

$$Q = C \times K \times \frac{H_1 (C_2H_4)}{H_2 (C_3H_8)}$$

où : Q = nombre de moles de C_2H_4 produites

C = nombre de moles de C_3H_8 injectées

K = coefficient de proportionnalité établi à partir d'un mélange en proportions égale (V/V) de C_3H_8 et de C_2H_4 dans l'air ;
hauteur du pic C_3H_8

dans notre expérience K = $\frac{\text{hauteur du pic } C_2H_4}{\text{hauteur du pic } C_3H_8} = 1,5$

H_1 = hauteur du pic de C_2H_4

H_2 = hauteur du pic de C_3H_8

$$\Delta Q = Q_6 - Q_0,$$

où Q_6 = Nombre de moles de C_2H_4 produites après 6 h d'incubation,

Q_0 = Nombre de moles de C_2H_4 produites au temps $t = 0$.

7.2.4. Isolement des souches à partir des nodules

Les nodules sont séparés des racines de Légumineuses. Ils sont lavés stérilement à l'eau distillée puis désinfectés 5 mn dans une solution d' $HgCl_2$ à 2,5 %, additionnée d'une goutte de Teepol.

Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, les nodules sont introduits dans des tubes en plastique contenant 2 ml de saccharose à 20 %. Les nodules sont écrasés à l'aide d'un étaleur stérile. On inocule 0,1 ml dans le milieu TY. Après croissance, les cellules sont étalées sur le milieu TY gélosé. Les clones apparus sont analysés pour leur caractère génétique.

VIII. - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les nodules, obtenus par inoculation des plantules de Luzerne par le mutant DC1, sont sectionnés puis on utilise la méthode de FINAN et coll. (1983) qui associe une double fixation par le glutaraldéhyde et le tétr oxyde d'osmium et une coloration à l'acétate d'uranyle. La déshydratation se fait à l'éthanol et à l'oxyde de propylène. Le matériel est inclus dans l'epon selon LUFT (1961). Les coupes sont

réalisées à l'ultra-microtome et colorées sur grille par le citrate de plomb selon REYNOLDS (1963). L'observation est faite au microscope électronique Jeol 120 CX par comparaison avec les photos de coupes nodulaires issues de l'inoculation des plantules par la souche M5N1 de *R. meliloti* (HORNEZ et coll., 1974).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. - CATABOLISME DES HEXOSES CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI

Les substrats carbonés, issus de la photosynthèse, sont des facteurs limitants pour l'établissement d'une symbiose *Rhizobium*-Légumineuse efficace. Le saccharose est le produit prédominant dans les nodules racinaires qui présentent une forte activité invertasique.

Le glucose et le fructose, issus de la dégradation du saccharose dans les nodules, sont donc les produits majeurs dont disposent les bactéroïdes.

L'examen du métabolisme des hexoses par les cellules libres de *R. meliloti* s'avère intéressant pour la compréhension des événements intervenant dans l'utilisation des hydrates de carbone par les bactéroïdes.

Le tableau 5 représente l'ensemble des activités enzymatiques caractéristiques des différentes voies de dégradation des hexoses. Ces différents dosages ont été réalisés sur des extraits de cellules provenant de la culture de *R. meliloti* M5N1 sur milieu minimum RHB1 additionné de glucose ou de fructose à 1 % (P/V).

Les activités glucokinase et fructokinase sont importantes respectivement sur glucose et fructose et semblent donc spécifiques à leurs substrats. RONSON et PRIMROSE (1979) puis GARDIOL et coll. (1980) ont montré par le biais des mutants glucokinase⁻ de *R. trifolii* et fructokinase⁻ de *R. meliloti* que ces 2 enzymes sont spécifiques à leurs substrats respectifs. En effet, le mutant glucokinase⁻ utilise le fructose et non le glucose, alors que le mutant fructokinase⁻ utilise le glucose mais pas le fructose.

La présence d'activité fructokinase cytoplasmique chez *R. meliloti* M5N1 est en faveur d'un transport du fructose par un système non-PTS. L'utilisation d'inhibiteurs métaboliques a permis de montrer que le transport de ce substrat chez *R. meliloti* M5N1 est réalisé par un mécanisme actif qui dépend de l'énergisation de la membrane (HORNEZ, 1987).

Les deux enzymes clés de la voie Embden-Meyerhoff-Parnas sont présentes à des taux très faibles, indiquant que *R. meliloti* M5N1 n'opère pas selon cette voie. En plus, la croissance de *R. meliloti* M5N1 sur fructose ne semble pas induire les activités phosphofructokinase et fructose 1,6-diphosphate aldolase.

Enzyme	Activité spécifique (nmoles/mn.mg prot.)	
	Glc	Fr
Glucokinase	174	79
Fructokinase	80	120
G-6-P déshydrogénase	NAD	47
	NADP	120
6-P-G déshydrogénase	NAD	< 5
	NADP	66
Transcétolase	19	ND
Transaldolase	7	ND
Phosphofructokinase	15	17
Fr 1,6-di-P-aldolase	< 5	< 5
Hexose biphosphatase	36	ND
6-P-G déshydratase et 2 céto-3-désoxy 6-P-G aldolase	160	145



Tableau 5 - Activités des enzymes spécifiques des voies de dégradation des hexoses chez R. meliloti M5N1.

ND : non déterminé

L'absence de la voie EMP a été aussi rencontrée chez *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979), *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984b) et *R. meliloti* (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972 ; ARIAS et coll., 1979).

Le dosage de la glucose-6-phosphate déshydrogénase chez *R. meliloti* M5N1 a permis de montrer une large spécificité vis-à-vis du NADP comme coenzyme. Le rapport d'activité $\frac{\text{NADP}}{\text{NAD}}$ est de 2,9. MULONGOY et ELKAN (1977a) trouvent chez *R. japonicum* des résultats similaires, alors que chez *R. cowpea*, STOWERS et ELKAN (1983) mentionnent l'existence de 2 isoenzymes dont l'une est spécifique au NAD et l'autre utilisant soit le NAD soit le NADP.

La gluconate-6-phosphate déshydrogénase à NADP, enzyme clef de la voie des pentoses phosphates, est présente chez *R. meliloti* M5N1. Cette enzyme constitue un critère pour différencier les Rhizobia à croissance rapide de ceux à croissance lente (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972). Ce dernier groupe est dépourvu de cette activité et, par conséquent, de la voie des PP.

Nous n'avons pas trouvé d'activité gluconate-6-phosphate déshydrogénase à NAD chez *R. meliloti* M5N1. Cette enzyme catalyse la formation d'un composé cétohexonique phosphorylé (MULONGOY et ELKAN, 1977b).

Deux autres enzymes participent ultérieurement à la voie des PP. Il s'agit de la transcétolase et de la transaldolase qui sont présentes à des taux faibles.

L'activité combinée de la gluconate-6-phosphate déshydratase et de la 2 céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase est très élevée chez *R. meliloti* M5N1 comparativement à d'autres souches de *Rhizobium* (ARIAS et coll., 1979 ; RONSON et PRIMROSE, 1979 ; GLENN et coll., 1984b). Ceci indique que la voie Entner-Doudoroff est fonctionnelle chez *R. meliloti*.

D'après ces résultats, on peut dire que la dégradation des hexoses chez *R. meliloti* a lieu principalement par la voie ED et partiellement selon la voie des PP, en vertu des faibles activités transcétolase et transaldolase.

La voie EMP n'étant pas fonctionnelle, en vertu des faibles activités phosphofructokinase et F-1,6-diphosphate aldolase.

II. - ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN MUTANT DE RHIZOBIUM MELILOTI INCAPABLE D'UTILISER LE FRUCTOSE

La recherche de mutants métaboliques chez *R. meliloti* présente deux avantages. D'une part, par le biais des sources de carbone non utilisables par le mutant, on peut mesurer l'importance de ces substrats pour l'établissement d'une symbiose efficace. D'autre part, la nature de la mutation rend compte de l'importance des voies d'utilisation de ces substrats carbonés.

Il nous a donc semblé intéressant de chercher un mutant incapable de croître sur fructose comme seule source de carbone.

2.1. Isolement du mutant HD1

La souche de *R. meliloti* M5N1 est précultivée dans 10 ml de milieu TY jusqu'à l'obtention d'une croissance en fin de phase exponentielle. Après centrifugation, les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon tris-maléate 50 mM (pH 6,1) et resuspendues dans 10 ml du même tampon. La N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine est additionnée à 200 µg/ml. Après 20 mn d'incubation à 30°C, les cellules sont lavées 2 fois au TNP, reprises dans 50 ml de milieu TY et incubées 18 h à 30°C. Ensuite, on inocule le milieu RHB1 fructosé et en début de phase exponentielle ($DO_{600} = 0,3$), la pénicilline est ajoutée à 2 000 U/ml. Après 20 h d'incubation à 30°C, les cellules viables (1 %) sont reprises par centrifugation et on effectue différentes dilutions (10^{-5} à 10^{-7}) avec du TNP. 50 µl de ces différentes dilutions sont prélevés et étalés sur milieu TY gélosé. Après 4 à 5 jours, les colonies apparues sont répliquées sur RHB1 fructosé gélosé selon la technique de LEDERBERG (1952) en utilisant des velours stériles.

2.2. Identification du mutant HD1

Les colonies se développant sur la boîte mère (TY) et non sur RHB1 fructosé sont mises en culture sur milieu TY. Après centrifugation et lavage avec du TNP, les cellules sont reprises dans le milieu R et testées pour leur aptitude à croître sur milieu minimum RHB1 additionné de différentes sources de carbone.

2.3. Propriétés de croissance du mutant HD1

2.3.1. Conditions de croissance

La souche parentale *R. meliloti* M5N1 et le mutant HD1 sont précultivés sur milieu TY. Après centrifugation, les cellules sont lavées 2 fois avec du TNP. Ensuite, on inocule 200 ml de milieu RHBI additionné de la source de carbone à 0,2 % (P/V). La lecture de la densité optique se fait à 600 nm.

2.3.2. Propriétés de croissance

Nous constatons d'après le tableau 6 que le mutant HD1 croît à la même vitesse que la souche parentale sur glucose, succinate, arabinose et glycérol. En plus du fructose, le mannitol, sorbitol, mannose, xylose ou ribose comme sources de carbone ne permettent pas une croissance du mutant. En présence de succinate et de fructose à 0,1 % (P/V) chacun, *R. meliloti* M5N1 présente une croissance diauxique (HORNEZ et coll., 1984). Par contre, dans les mêmes conditions, une seule phase de croissance est présente chez le mutant HD1 avec une inhibition de la croissance (fig. 3) et une augmentation du temps de génération (tab. 6). Sur succinate et glucose à 0,1 % chacun, le mutant HD1 tout comme la souche parentale présente une croissance diauxique. La croissance du mutant HD1 sur saccharose est fortement inhibée (fig. 4) avec une augmentation très marquée du temps de génération (tab. 6).

2.4. Transport du fructose chez *R. meliloti* M5N1 et HD1

L'accumulation du fructose par les cellules de la souche parentale et du mutant HD1 est effectuée selon la technique décrite par THEODOROPOULOS (1986). La figure 5 montre une forte activité fructose perméasique chez le mutant HD1 et la vitesse initiale d'accumulation du fructose chez ce mutant (25 nmoles/mn.mg de protéines) est supérieure à celle observée chez la souche parentale (10 nmoles/mn.mg de protéines). D'autre part, on observe que l'accumulation du fructose à 0,1 mM est linéaire chez *R. meliloti* M5N1 même après 15 mn d'incubation, alors que chez le mutant HD1 on assiste à une diminution de la vitesse d'accumulation après 5 mn.

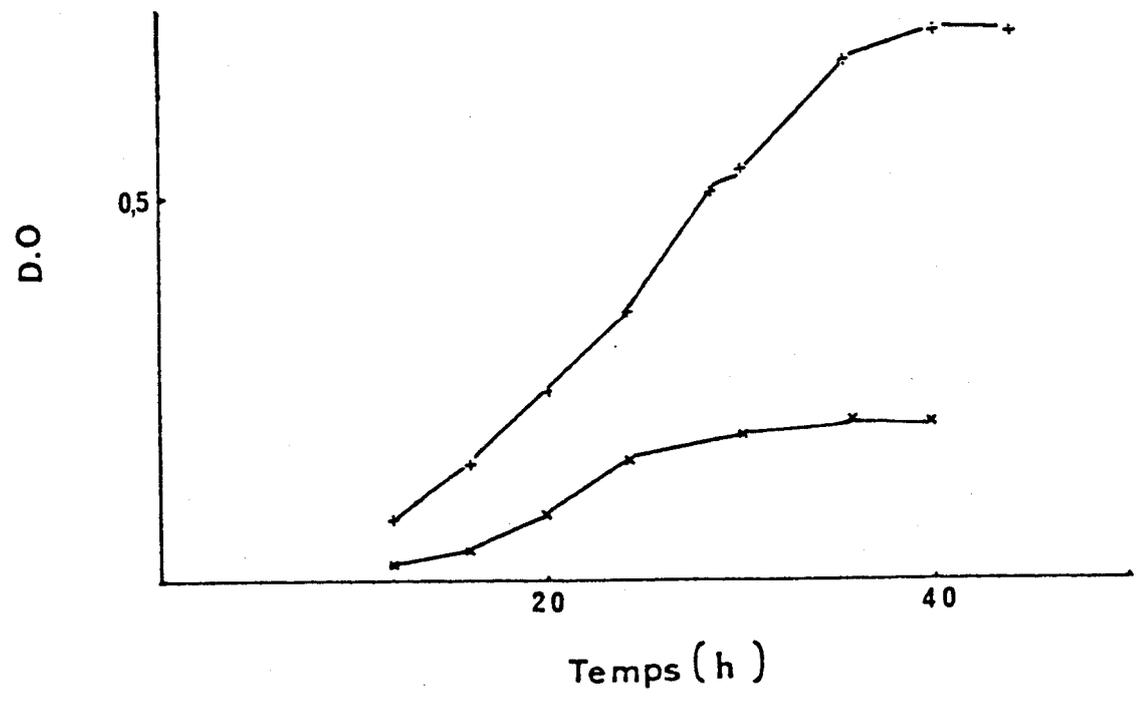


Figure 3 - Croissance de R. meliloti M5N1 (+) et HD1 (x) sur RHB1 additionné de fructose (0,1 %) et de succinate (0,1 %).

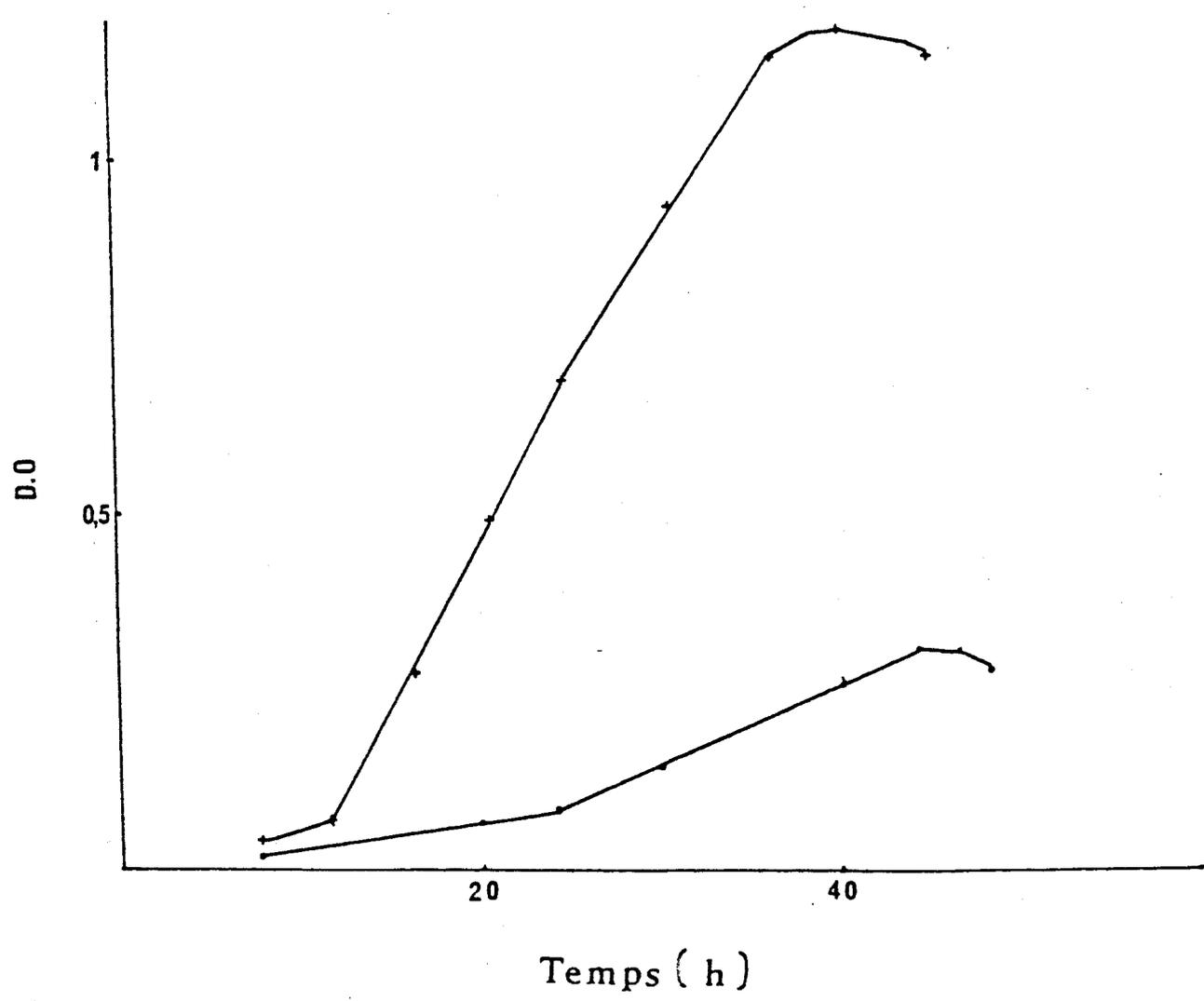


Figure 4 - Croissance de R. meliloti M5N1 (+) et HD1 (.) sur RHB1 additionné de saccharose (0,2 %).

Source de carbone	Temps de génération (h)	
	M5N1	HDI
Fructose	4	- ^a
Mannitol	4,5	-
Sorbitol	4,5	-
Mannose	4,5	-
Ribose	5	-
Xylose	5	-
Glucose	4,5	4,5
Saccharose	2	8
L-arabinose	6	7
Glycérol	10	12
Succinate	3,5	3,5
Succinate + Fructose	3,5;3 ^b	5,5
Succinate + Glucose	4,5;4	4,5;4



Tableau 6 - Croissance de R. meliloti M5N1 et HD1 sur différentes sources de carbone.

Les cellules sont cultivées sur milieu minimum RHB1 additionné de 0,2 ou 0,1 % selon qu'il s'agisse d'une croissance simple ou mixte.

a : pas de croissance

b : les 2 temps de génération lors de la croissance diauxique

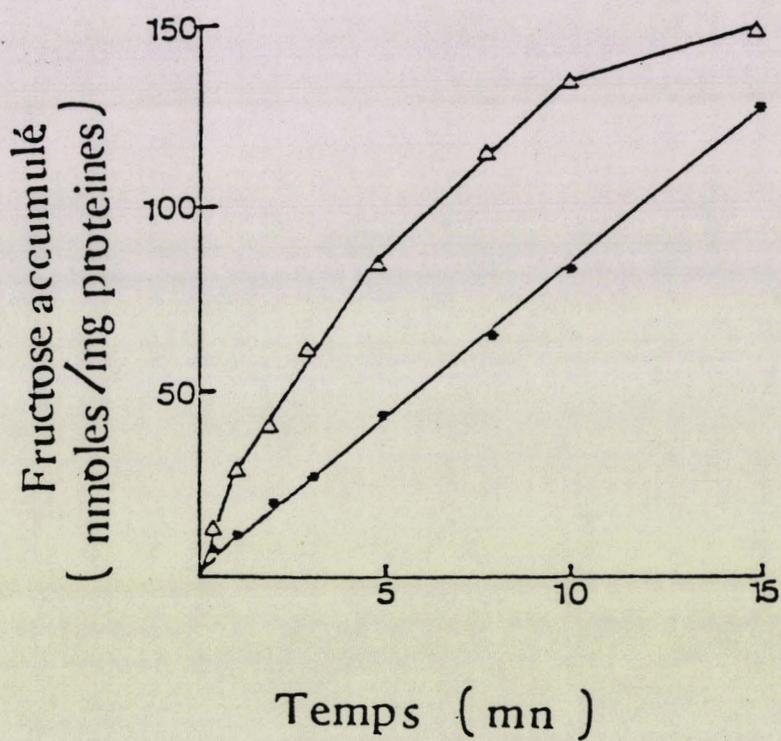


Figure 5 - Accumulation du fructose 0,1 mM par les cellules de *R. meliloti* M5N1 (•) et HD1 (Δ) préalablement cultivées sur glucose.

2.5. Dosages enzymatiques des voies cataboliques

Afin de déterminer la localisation de la mutation chez la souche HD1 et en vertu de la présence d'activité fructose perméasique, nous nous sommes proposés de tester les activités enzymatiques des voies clefs de la dégradation du fructose chez le mutant comparativement à la souche parentale (tab. 7).

Les 2 souches ont été cultivées sur milieu minimum RHBI additionné de glucose à 1 %.

Les voies de dégradation du glucose et du fructose chez *R. meliloti* sont communes à partir du glucose-6-phosphate. Les 2 enzymes qui permettent l'utilisation du fructose en G-6-P sont la fructokinase et la G-6-P isomérase.

L'activité fructokinase est présente chez le mutant HD1 à un taux plus faible mais comparable à celui observé chez la souche sauvage. Le dosage de la G-6-P isomérase a permis de montrer une très faible activité chez le mutant HD1 (12 nmoles/mn.mg de protéines) relativement à *R. meliloti* M5N1 (107 nmoles/mn.mg de protéines). D'autres enzymes sont présentes à des taux plus faibles chez le mutant HD1, notamment la G-6-P déshydrogénase et la 6-P-G déshydrogénase dont les pourcentages d'activité sont de 60 et 38 comparativement à la souche sauvage.

Comme pour *R. meliloti* M5N1, le mutant HD1 présente des activités phosphofruktokinase et F-1,6-di-P aldolase faibles, indiquant l'absence de la voie EMP.

Enfin, l'activité combinée de la 6-P-G déshydratase et de la 2-céto-3-déoxy-6-P-G aldolase est du même ordre que celle observée chez la souche sauvage.

2.6. Accumulation du fructose par le mutant HD1

2.6.1. Etude préliminaire

Dans un premier temps, nous avons réalisé la croissance de *R. meliloti* M5N1 et HD1 sur milieu RHBI en présence de la source de carbone permissive (Glc, Gal, Su, Ara ou Gly) et du fructose à 0,5 % chacun. Les différents milieux ont été inoculés par 10^8 cellules/ml (DO = 0,1). Le tableau 8 représente les DO finales des différentes cultures après 48 h d'incubation.



Enzyme	Activité spécifique (nmoles/mn.mg prot.)	
	M5N1	HD1
Fructokinase	80	67
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	120	72
Glucose-6-phosphate isomérase	107	12
Gluconate-6-phosphate déshydatase et 2 céto-3-désoxy gluconate-6-phosphate aldolase	160	160
Phosphofructokinase	15	12
Fructose 1,6-diphosphate aldolase	< 5	< 5
Hexose biphosphatase	36	40

Tableau 7 - Activités spécifiques des enzymes de dégradation du fructose chez R. meliloti M5N1 et HD1^a.

a : les extraits de cellules libres sont obtenus à partir des cultures sur milieu minimum RHB1 glucosé à 1 %.

La croissance du mutant HDI sur arabinose, succinate ou glycérol comme seule de carbone est comparable à celle de la souche sauvage M5N1. Cependant, lorsque le fructose est combiné à ces substrats permissifs, nous assistons à une forte inhibition de la croissance du mutant HDI (tab. 8).

Source de carbone	DO finale ^a	
	M5N1	HDI
Fructose	1,53	0,10
Glucose	0,76	0,78
Glucose + Fructose	1,45	0,70
Galactose	1,27	1,16
Galactose + Fructose	1,64	0,57
Arabinose	0,65	0,59
Arabinose + Fructose	1,28	0,22
Succinate	0,70	0,73
Succinate + Fructose	1,58	0,48
Glycérol	0,65	0,72
Glycérol + Fructose	1,09	0,18



Tableau 8 - Croissance de *R. meliloti* M5N1 et HDI en présence de sources de carbone permissives et de fructose^b.

- a : les DO finales sont déterminées après 48 h d'incubation
 b : les cellules sont préalablement cultivées sur milieu TY, lavées et reprises dans le milieu minimum RHB1 additionné de la source de carbone indiquée à 0,5 ou 1 % selon qu'il s'agisse d'une culture mixte ou simple

2.6.2. Accumulation du fructose en présence de sources de carbone permissives

Pour mettre en évidence ce phénomène d'accumulation du fructose et de ses dérivés chez le mutant HD1, nous avons réalisé la croissance du mutant sur milieu minimum RHBI additionné de sources de carbone permissives telles que le succinate, le glycérol ou l'arabinose à 0,1 % (P/V). Le fructose à 1 %, contenant le ^{14}C -fructose (1 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{moles}$), est additionné en début de phase exponentielle. Le suivi de la DO en fonction du temps d'incubation révèle une inhibition nette de la croissance chez le mutant HD1 (fig. 6).

Le tableau 9 montre que le fructose et le F-6-P sont les produits d'accumulation lors de l'utilisation du fructose par la souche HD1. Ceci rend compte, d'une part de l'absence de la voie EMP -sinon le F-6-P serait transformé- et, d'autre part de la localisation de la mutation au niveau de la G-6-P isomérase.

Souche	Source de carbone	nmoles/mg de prot.	
		Fr	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 9 - Accumulation du fructose et du F-6-P par R. meliloti M5N1 et HD1^a.

- a : le fructose à 1 % (1 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{moles}$) est ajouté aux cellules en croissance sur RHBI additionné de la source de carbone indiquée en début de phase exponentielle. Le fructose et le F-6-P sont déterminés par chromatographie après 20 h d'accumulation

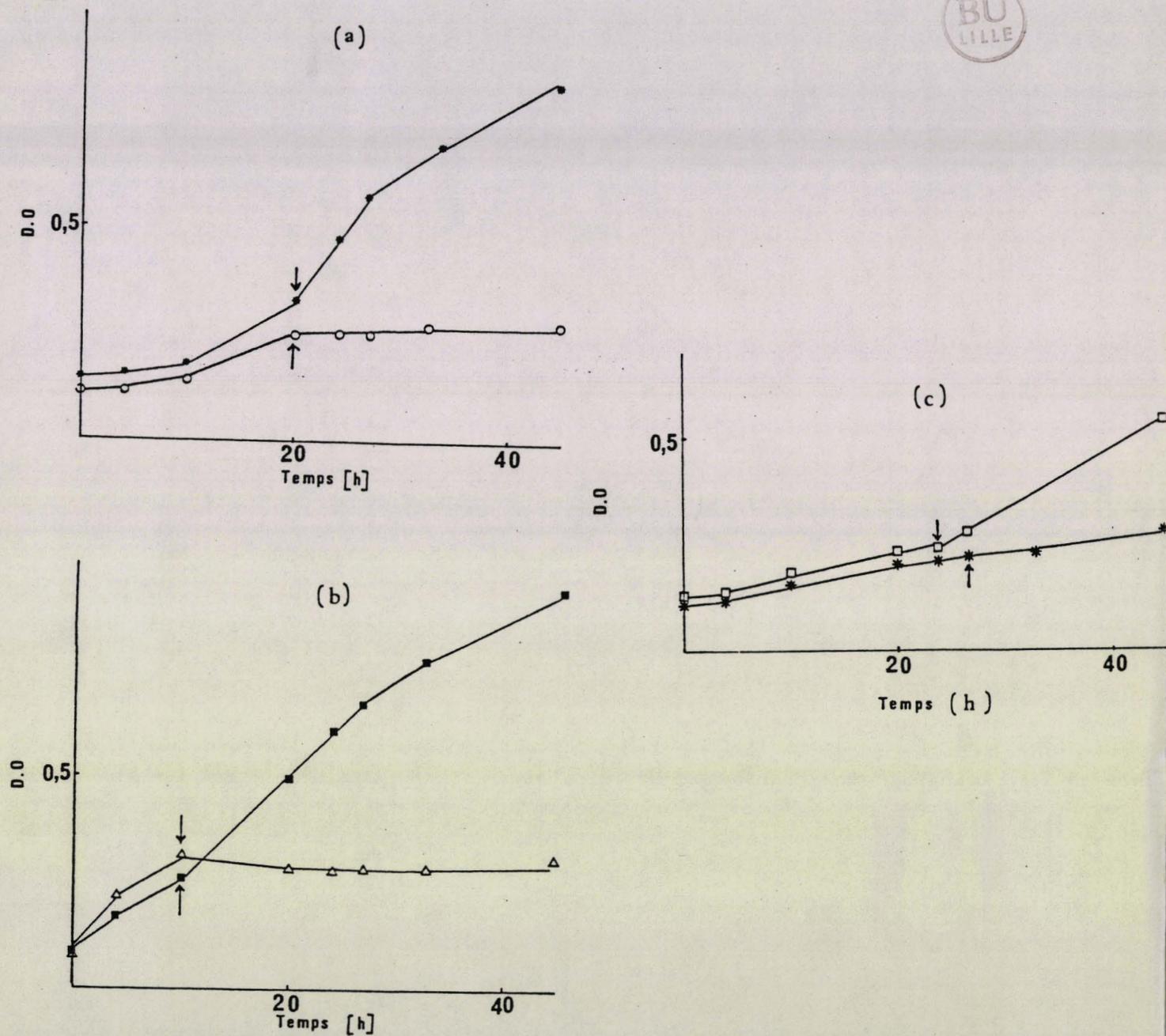


Figure 6 - Effet du fructose sur la croissance de *R. meliloti* M5N1 et HD1. La flèche indique le moment d'addition du fructose (1 %) aux cultures suivantes :

- (a) : M5N1/RHBI Ara 0,1 % (*)
HD1/RHBI Ara 0,1 % (O)
- (b) : M5N1/RHBI Su 0,1 % (■)
HD1/RHBI Su 0,1 % (Δ)
- (c) : M5N1/RHBI Glyc 0,1 % (□)
HD1/RHBI Glyc 0,1 % (*)

2.6.3. Inhibition de la fructokinase par le F-6-P

Au vu de l'utilisation du fructose par le mutant HD1, on devrait s'attendre à une accumulation du F-6-P uniquement, en vertu des blocages de la voie EMP et de la G-6-P isomérase. Or, comme on l'a vu précédemment (2.6.2.), le fructose s'accumule aussi.

Nous avons donc envisagé de doser, *in vitro*, l'activité fructokinase dans les extraits de cellules en présence de concentrations croissantes de F-6-P. Comme le montre la figure 7, le F-6-P inhibe fortement l'activité fructokinase et le fructose s'accumule dans ces conditions.

2.7. Propriétés symbiotiques

Dans le but d'élucider l'importance de l'apport de la source de carbone chez *R. meliloti* pour l'établissement d'une symbiose efficace, nous avons testé les propriétés symbiotiques du mutant HD1 (tab. 10). L'activité nitrogénase est la même pour le mutant HD1 que pour la souche parentale et de ce fait la perte d'activité G-6-P isomérase n'a pas d'effet sur la symbiose et la capacité de *R. meliloti* à utiliser des sources de carbone non permissives telles que le fructose, mannitol, sorbitol, mannose, xylose ou ribose, n'est pas essentielle pour la nodulation ni pour la fixation de l'azote. Notons que lors de l'isolement des souches à partir des nodules, le mutant inoculé a bien conservé son caractère initial.

Souche	Nodulation	Activité nitrogénase nmoles C ₂ H ₄ /plante.h
M5N1	+	29
HD1	+	29

Tableau 10 - Propriétés symbiotiques de *R. meliloti* M5N1 et du mutant HD1.

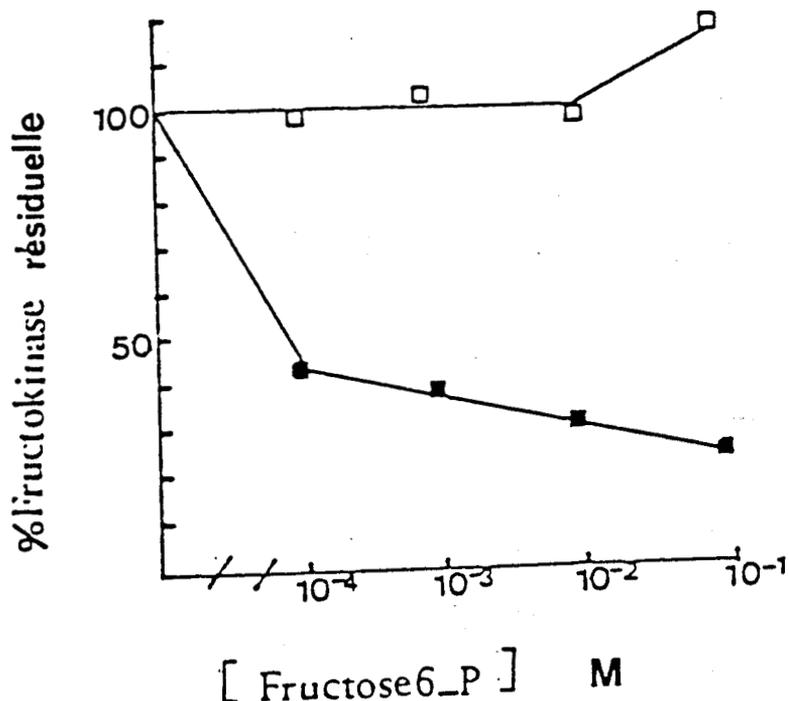


Figure 7 - Inhibition de la fructokinase : M5N1, HD1.

Les extraits de cellules libres sont préparés à partir de cultures sur RHBI additionné de fructose et de glucose à 0,5 % chacun. Le mélange réactionnel (1 ml) contient :

300 μ moles tampon Tris-HCl pH 7

5 μ moles ATP

1 mg NADP

5 μ moles MgCl₂

1 μ mole fructose

1 μ Ci ¹⁴C-fructose

0,4 mg extrait

La réaction est arrêtée après 25 mn d'incubation par 0,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 50 %.

Après centrifugation, le surnageant est neutralisé par le tampon Tris 1 M, évaporé à sec puis repris dans 0,1 ml d'eau distillée.

L'activité fructokinase est déterminée par la quantité de ¹⁴C-fructose résiduelle.

Les activités fructokinase non inhibées sont de 0,83 et 0,79 μ moles/mg de protéines respectivement pour la M5N1 et HD1 après 25 mn d'incubation.

2.8. Discussion

Par mutagénèse chimique à la nitrosoguanidine, nous avons isolé un mutant HD1 de *R. meliloti* M5N1 qui présente une faible activité G-6-P isomérase. D'autres enzymes sont présentes chez le mutant HD1 à des taux plus faibles comparativement à la souche sauvage.

La nature de la mutation n'a pas été déterminée de façon adéquate. Nous pouvons envisager, d'après les différences d'activités enzymatiques trouvées entre les 2 souches, que la mutation a touché un gène de régulation contrôlant les activités G-6-P isomérase, fructokinase, G-6-P déshydrogénase et 6-P-G déshydrogénase. D'autre part, nous n'avons pas pu isoler de révertants à partir du mutant HD1. Ceci suggère que la mutation a affecté outre le gène de structure de la G-6-P isomérase, un autre site.

Cette seconde hypothèse paraît plus raisonnable dans le sens où le mutant HD1 présente des propriétés de croissance similaires à celles observées chez le mutant G-6-P isomérase⁻ (UR1) de *R. meliloti* L5-30 préalablement étudié par ARIAS et coll. (1979). Ces auteurs mentionnent, à côté de la très faible activité G-6-P isomérase, des taux moins importants des activités glucokinase et G-6-P déshydrogénase chez le mutant UR1 relativement à la souche sauvage L5-30.

Le mutant HD1, comparé au mutant UR1, présente un autre aspect de régulation lors de l'utilisation du fructose par ces 2 souches. En effet, le mutant HD1 accumule à l'intérieur des cellules du fructose et du F-6-P, alors que la souche UR1 accumule uniquement le F-6-P.

Nous avons alors envisagé l'hypothèse d'une inhibition de la fructokinase par le F-6-P, responsable de l'accumulation du fructose chez le mutant HD1.

Le dosage de la fructokinase, *in vitro*, dans l'extrait cellulaire du mutant HD1 en présence de concentrations progressives de F-6-P, a permis de montrer une inhibition nette de cette activité.

La représentation de l'activité fructokinase résiduelle en fonction de la concentration en F-6-P suppose une inhibition de type allostérique. Cette étude peut être envisagée moyennant la purification de la fructokinase.

La présence d'activité fructokinase cytoplasmique ainsi que la forte accumulation du fructose à l'intérieur des cellules du mutant HD1 sont en faveur d'un transport actif du fructose par un système non-PTS.

L'étude des propriétés de croissance du mutant HD1, comparativement à la souche sauvage, nous permet de dire que :

- l'absence de croissance de la souche HD1 sur mannitol ou sorbitol indique que ces substrats sont métabolisés via le fructose respectivement pour le mannitol et le sorbitol déshydrogénases, en accord avec MARTINEZ-DRETS et ARIAS (1970) ;

- le mannose, le xylose et le ribose, dont les métabolismes passent via le F-6-P (ARIAS et coll., 1979 ; ARIAS et coll., 1982), ne permettent pas la croissance du mutant HD1 ;

- le glycérol, l'arabinose et le succinate, dont les métabolismes chez *R. meliloti* ne rejoignent pas le fructose ou le F-6-P (ARIAS et MARTINEZ-DRETS, 1976 ; DUNCAN et FRAENKEL, 1979 ; GARDIOL et coll., 1982), permettent une croissance normale du mutant HD1. Cependant, l'addition de fructose à ces cultures inhibe fortement leur croissance et il s'en suit une accumulation nette du fructose et du F-6-P.

Les quantités de fructose et de F-6-P, accumulées chez le mutant HD1 dans ces conditions, sont 10 à 20 fois supérieures à celles obtenues chez la souche sauvage.

BÖCK et NEIDHART (1966) puis FRAENKEL (1968) associent le phénomène d'inhibition de la croissance par les sucres, dont le métabolisme est bloqué, à l'accumulation des intermédiaires métaboliques au niveau du blocage.

L'ensemble de ces résultats combinés à ceux déjà publiés chez *R. meliloti* et aussi le fait que ni la souche sauvage ni le mutant HD1 n'utilisent la voie EMP, nous conduisent à établir les voies possibles de dégradation des substrats carbonés chez *R. meliloti* M5N1 (fig. 8).

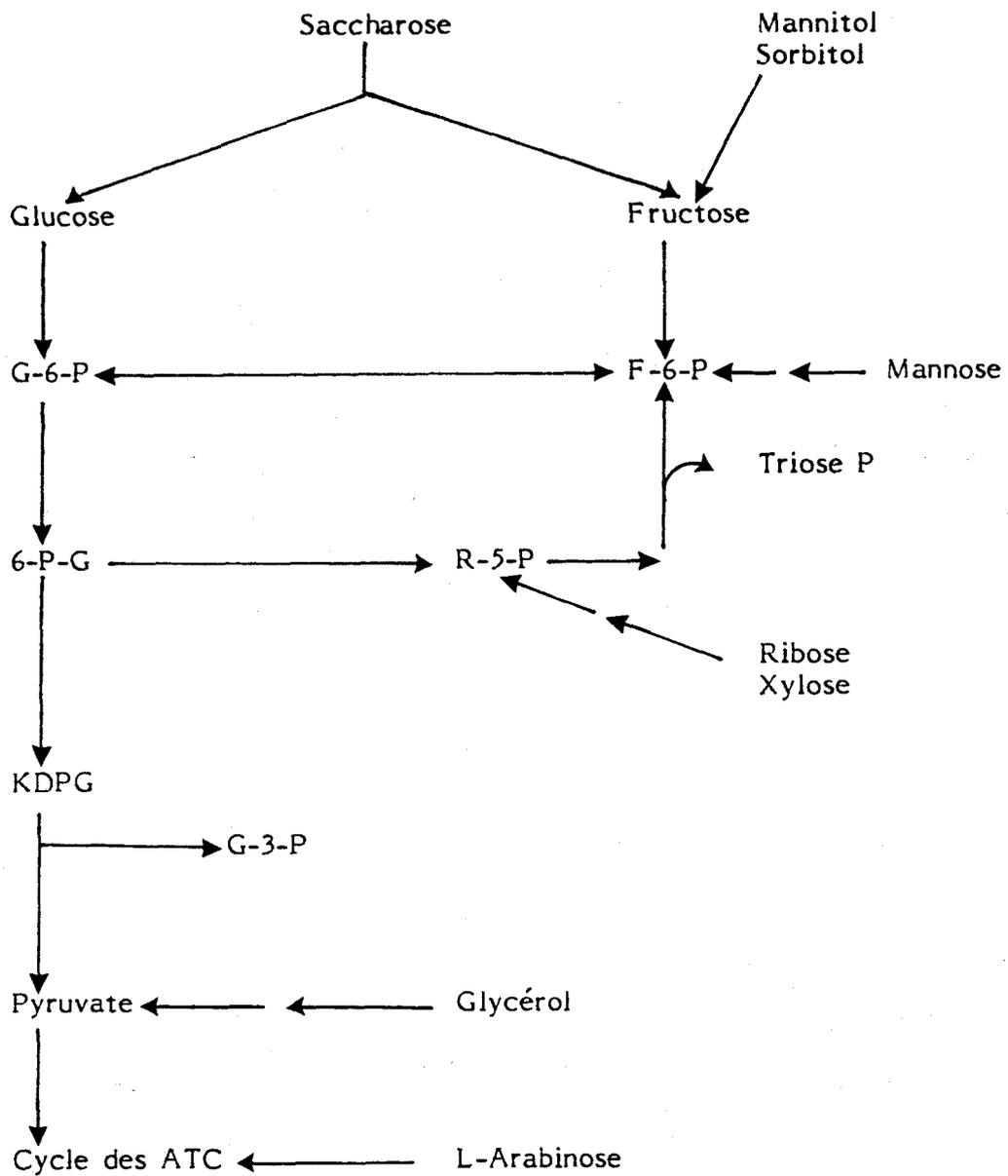


Figure 8 - Voies possibles d'utilisation des substrats carbonés chez R. meliloti.

III. - ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN MUTANT DE RHIZOBIUM MELILOTI INCAPABLE D'UTILISER LE SUCCINATE

Des études récentes ont montré que les acides dicarboxyliques en C_4 sont transportés et métabolisés par les bactéroïdes de *Rhizobium*, contrairement aux sucres dont le transport et l'oxydation ont lieu passivement.

L'étude de mutants, affectés au niveau du transport ou du métabolisme des acides dicarboxyliques en C_4 , s'avère donc intéressante pour élucider le rôle que peuvent jouer ces substrats en tant que support énergétique pour l'établissement d'une symbiose efficiente.

3.1. Isolement du mutant DCI

Pour la sélection d'un mutant incapable d'utiliser le succinate, nous nous sommes basés sur les propriétés de croissance de *R. meliloti* M5N1. Cette souche, cultivée sur milieu RHBI additionné de glucose et de succinate à 0,1 % (P/V) chacun, présente une croissance diauxique (fig. 9a) où la première phase correspond à l'utilisation du succinate, le glucose étant dégradé dans la seconde phase (HORNEZ et coll., 1984). En plus, à 0,1 % (P/V) en glucose, la croissance est limitée (fig. 9b).

Après mutagénèse chimique à la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine et enrichissement à la pénicilline (même procédure que 2.1.) sur milieu RHBI additionné de succinate à 1 %, les cellules viables (< 0,5 %) sont récoltées par centrifugation et étalées après dilution (10^{-5} et 10^{-6}) sur milieu RHBI gélosé additionné de glucose et de succinate à 0,1 et 0,5 % (P/V) respectivement.

Après 4 à 5 jours, les petites et micro-colonies (0,5 à 1 mm de diamètre) sont reprises dans le milieu TY et testées pour leur aptitude à croître sur succinate seul comme source de carbone.

Le mutant DCI se présente sur le milieu de sélection sous forme d'une colonie de 0,5 à 1 mm de diamètre, après 4 jours d'incubation à 30°C, alors que les colonies de la souche sauvage ont un diamètre de 2 à 2,5 mm.

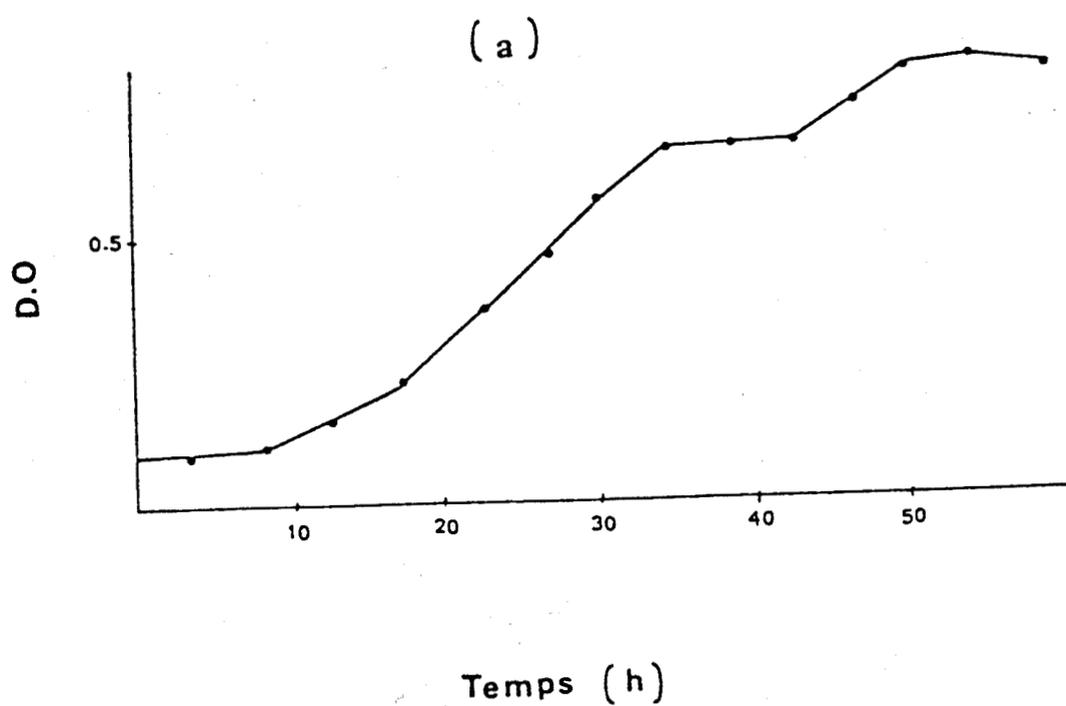
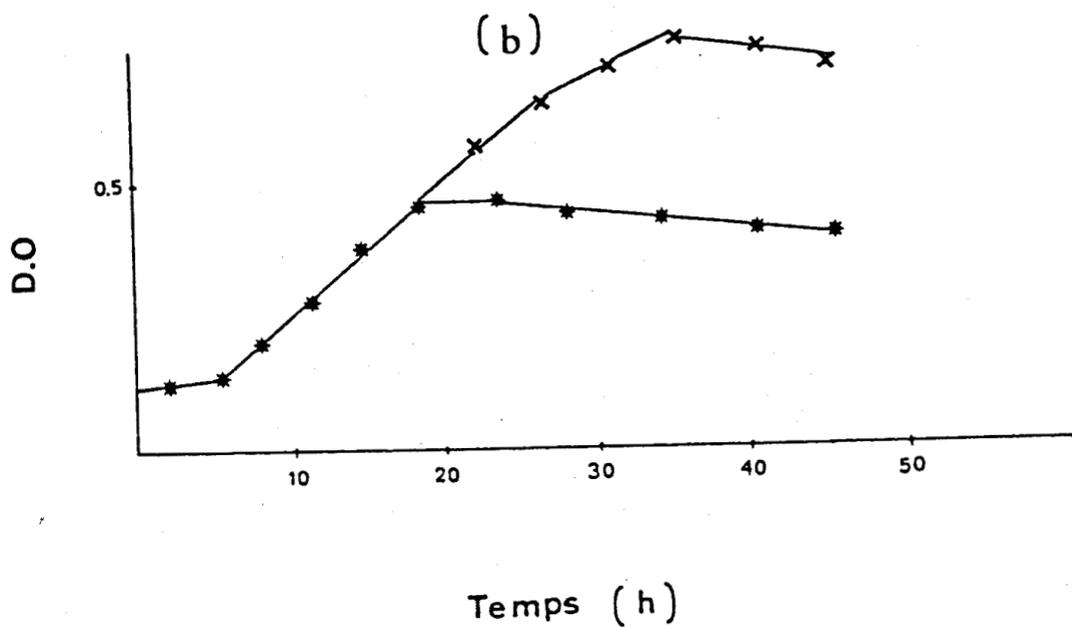


Figure 9 - Croissance de *R. meliloti* sur RHBI en présence de (a) succinate et glucose à 0,1 % chacun et (b) glucose à 0,1 % (*) ou glucose à 0,2 % (x).

3.2. Propriétés de croissance du mutant DCI

Le tableau 11 résume les propriétés de croissance du mutant DCI comparativement à la souche sauvage. Les vitesses de croissance sont du même ordre de grandeur pour les 2 souches cultivées sur glucose, fructose, L-arabinose, L-glutamate, acétate ou pyruvate. En plus du succinate, ni le fumarate ni le malate ne permettent une croissance du mutant DCI.

FINAN et coll. (1981) ont montré chez *R. leguminosarum* que ces 3 acides dicarboxyliques possèdent le même système de transport et le fait que le mutant DCI n'utilise aucun des 3 acides dicarboxyliques suggère un système de transport déficient.

Source de carbone	Temps de génération (h)	
	M5N1	DCI
Glucose	4,5	4,5
Fructose	4	4
Arabinose	6	6
Glutamate	5	5
Pyruvate	5,2	5,2
Succinate	3,5	- ^a
Fumarate	4	-
Malate	4	-

Tableau 11 - Croissance de *R. meliloti* M5N1 et DCI sur différentes sources de carbone.

Les cellules sont cultivées sur milieu minimum RHBI additionné de la source de carbone à 0,2 %.

a : pas de croissance

3.3. Transport du succinate

La figure 10 montre l'accumulation du succinate par les cellules de *R. meliloti* M5N1 et DC1 cultivées sur RHBI glucosé.

Les vitesses initiales d'accumulation sont respectivement de 20 et 6 nmoles/mn.mg protéines.

Après 60 mn d'incubation, l'activité succinate perméasique est de 6,5 nmoles/mn.mg protéines, ce qui suggère que la mutation a lieu au niveau du système de transport du succinate.

3.4. Spécificité du système perméasique chez *R. meliloti* M5N1

3.4.1. Action des analogues structuraux

La spécificité du transport du succinate est examinée en présence de divers analogues. A cet effet, les cellules de *R. meliloti* M5N1, préalablement cultivées sur RHBI additionné de succinate, sont pré-incubées avec les compétiteurs à 20 mM, 30 sec avant l'addition du succinate 0,1 mM.

Le tableau 12 regroupe les résultats obtenus après 5 mn d'incorporation du succinate et sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle relativement à un témoin sans inhibiteur.

L'inhibition la plus importante est observée avec le fumarate et le malate, qui en plus de leur analogie structurale avec le succinate, sont utilisés par *R. meliloti* contrairement aux autres compétiteurs (maléate, dihydroxyfumarate, oxalate et citrate). Notons que chez le mutant DC1, préalablement cultivé sur RHBI glucosé, tous les analogues testés n'ont pas d'action sur le transport du succinate. Par ailleurs, en présence de succinate à 20 mM, nous retrouvons 175 % d'activité résiduelle (tab. 12). Ceci suggère que l'incorporation du succinate chez le mutant a lieu passivement.

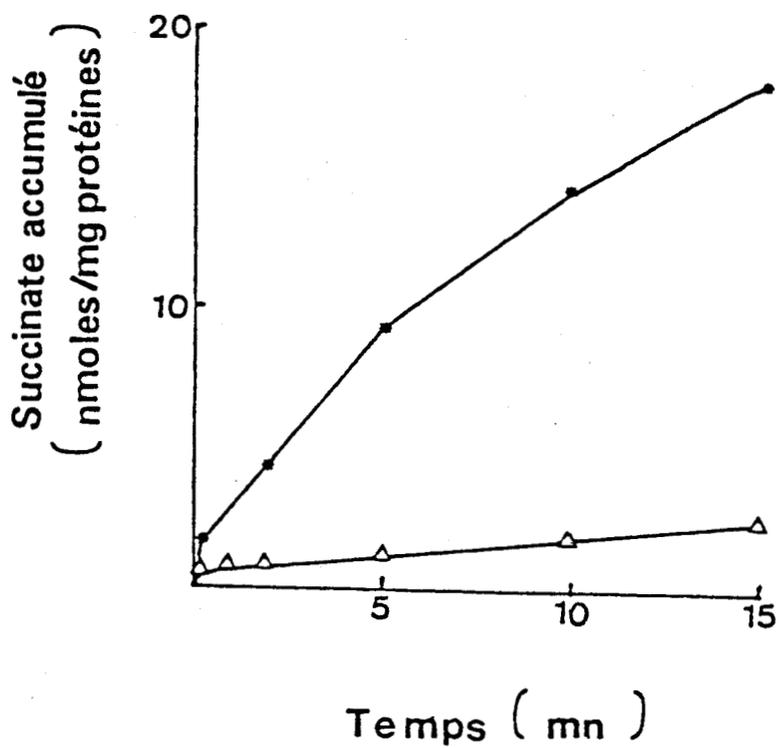


Figure 10 - Accumulation du succinate 0,1 mM par les cellules de *R. meliloti* M5N1 (•) et DC1 (Δ) préalablement cultivées sur RHBI additionné de glucose.



Inhibiteur (20 mM)	Pourcentage d'activité	
	M5N1	DC1
Témoin	100 ^a	100 ^b
Succinate	40	175
Fumarate	11	95
Malate	31	93
Dihydroxyfumarate	31	98
Maléate	17	97
Citrate	95	95
Oxalate	79	98

Tableau 12 - Action des analogues structuraux sur le transport du succinate chez R. meliloti M5N1 et DC1.

Les cellules de R. meliloti M5N1 et DC1 sont cultivées respectivement sur milieu minimum RHBI additionné de succinate et glucose à 0,2 %.

a : 100 % d'activité correspond à 85 nmoles/mn.mg de protéines
 b : 100 % d'activité correspond à 13 nmoles/mn.mg de protéines

3.4.2. Nature de l'inhibition du transport du succinate par le fumarate

Le fumarate présente une forte affinité pour la perméase au succinate. Nous avons alors envisagé de déterminer la nature de l'inhibition de l'accumulation du succinate chez *R. meliloti* M5N1, préalablement cultivé sur RHBI succinate, par le fumarate à 10 et 20 μM .

Les cinétiques d'accumulation du succinate (fig. 11) obtenues suggèrent une inhibition compétitive. En effet, le V_{max} (79 nmoles/mn.mg protéines) reste inchangé et la valeur de la constante d'inhibition (K_I) est comprise entre 3 et 6 μM . La constante d'affinité (K_m) étant de 2,86 μM .

Les valeurs de K_I et K_m sont du même ordre de grandeur, ce qui suggère que le fumarate et le succinate sont transportés à des vitesses comparables.

3.4.3. Etude de la nature du système de transport

La nature inductible ou constitutive du système de transport du succinate est étudiée en mesurant les vitesses initiales d'accumulation du succinate par les cellules de *R. meliloti* M5N1 préalablement cultivées sur diverses sources de carbone.

Les activités les plus élevées sont obtenues lorsque l'un ou l'autre des 3 acides dicarboxyliques est le substrat de croissance (tab. 13). Toutefois, les variations de la vitesse d'accumulation mesurées sont plutôt en faveur d'un système de transport constitutif, si on les compare aux variations élevées, reportées par d'autres auteurs.

Source de carbone	Vitesse initiale d'accumulation (nmoles/mn.mg prot.)
Glucose	20
Arabinose	28
Succinate	75
Fumarate	70
Malate	82

Tableau 13 - Régulation du transport du succinate chez *R. meliloti* M5N1.

Les cellules sont cultivées sur milieu minimum RHBI additionné de la source de carbone indiquée.

Les activités sont déterminées après 1 mn d'incubation en présence de ^{14}C -succinate 0.1 mM.

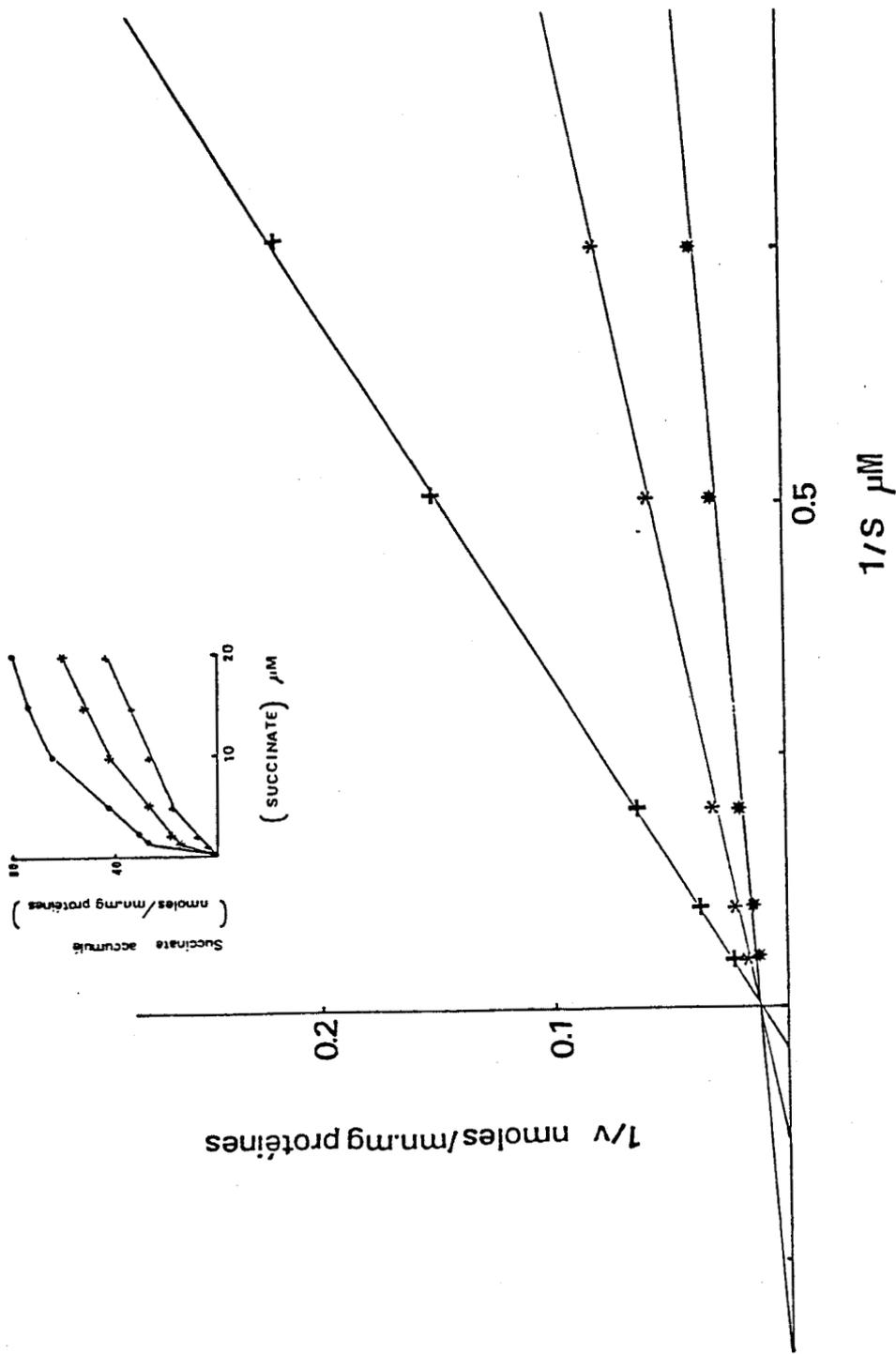


Figure 11 - Inhibition de l'accumulation du succinate par le fumarate chez *R. meliloti* MSN1.

- (*) sans inhibiteur
- (*) fumarate à 10 μM
- (+) fumarate à 20 μM

3.5. Action des inhibiteurs métaboliques

L'introduction d'inhibiteurs métaboliques lors de l'accumulation du succinate rend compte de la nature du transport par le biais des besoins énergétiques des cellules à réaliser ce processus, et, d'autre part du mode d'énergisation.

A cet effet, les cellules de *R. meliloti* M5N1 sont pré-incubées 30 sec en présence de l'inhibiteur à différentes concentrations avant l'addition du succinate à 0,1 mM. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle relativement à un témoin sans inhibiteur après 5 mn d'accumulation du substrat (fig. 12).

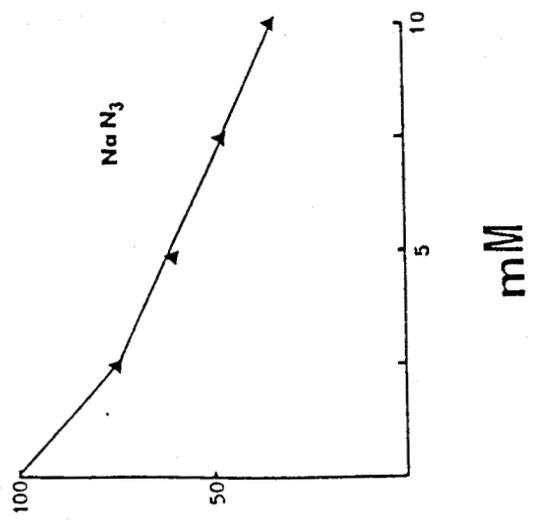
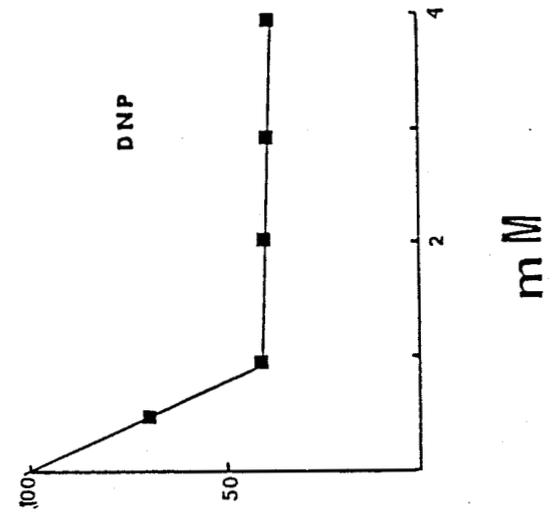
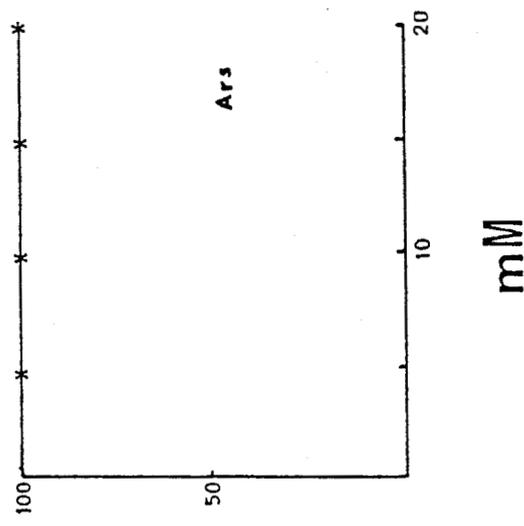
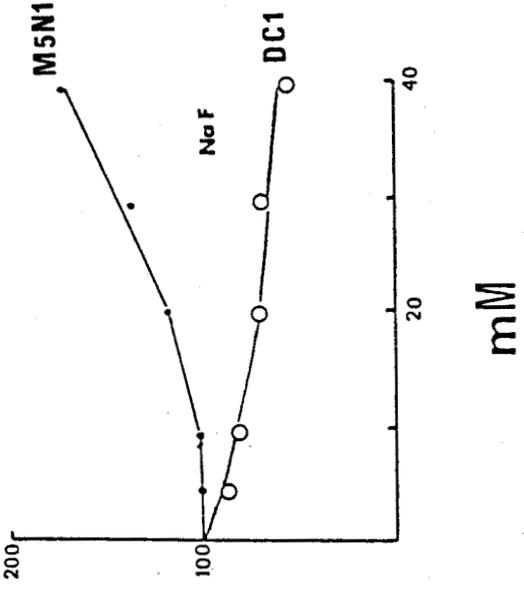
L'arséniate à 20 mM n'a pas d'action sur le transport du succinate. L'accumulation du succinate est fortement inhibée en présence de découplants énergétiques tels que le 2,4 dinitrophénol (DNP) et l'azide de sodium (NaN_3) respectivement à 4 et 10 mM.

Ces résultats suggèrent que le transport du succinate chez *R. meliloti* M5N1 est réalisé par un mécanisme actif nécessitant l'énergisation de la membrane cytoplasmique. L'action du fluorure de sodium sur le transport du succinate est différemment ressentie par *R. meliloti* M5N1 et DC1 (fig. 12). En effet, le fluorure de sodium joue plutôt le rôle d'activateur du système de transport actif chez la souche sauvage, alors que l'accumulation passive du succinate est légèrement inhibée par le NaF chez le mutant DC1.

3.6. Isolement de révertants et propriétés symbiotiques

L'étalement de suspensions cellulaires du mutant DC1 sur boîtes contenant le milieu RHB_1 additionné de succinate à 1 %, fait apparaître des révertants à une fréquence de l'ordre de $8 \cdot 10^{-6}$. Le fumarate et le malate permettent la croissance de ces souches. Deux révertants ont été choisis pour l'étude des propriétés symbiotiques.

Le tableau 14 représente le dosage de l'activité nitrogénasique chez le mutant DC1, chez la souche sauvage M5N1 et chez les 2 révertants DC2 et DC3. Le mutant DC1 présente une activité très faible et les nodules issus de l'inoculation des plantules de Luzerne par DC1 sont blanchâtres comparés aux nodules rosâtres observés lors de l'inoculation par la souche sauvage. Les révertants DC2 et DC3 présentent une activité nitrogénasique comparable à celle de la souche sauvage (tab. 14).



Activité résiduelle

Figure 12 - Action des inhibiteurs métaboliques sur le transport du succinate chez R. meliloti M5N1.

La haute fréquence de réversion ainsi que l'aptitude des souches révertantes à utiliser le fumarate et le malate suggèrent une simple mutation chez la souche DC1. Cette mutation serait responsable à la fois de la déficience au niveau du transport des acides dicarboxyliques et de la perte de la capacité de fixation d'azote.

Souche	Nodulation	Activité nitrogénase nmoles C ₂ H ₄ /plante.h
M5N1	+	29 ^a
DC1	+	3
DC2	+	28
DC3	+	25

Tableau 14 - Propriétés symbiotiques de R. meliloti M5N1, du mutant DC1 et des révertants DC2 et DC3.

a : les activités obtenues sont corrigées par rapport à un témoin non inoculé

3.7. Ultrastructure des nodules

L'examen macroscopique des racines des plantules de Luzerne inoculées par les souches de R. meliloti M5N1 et DC1 montre, dans le premier cas, que les nodules sont rosâtres et caractéristiques d'une symbiose efficace alors que dans le cas du mutant DC1, les nodules sont blanchâtres et dépourvus de lég'hémoglobine.

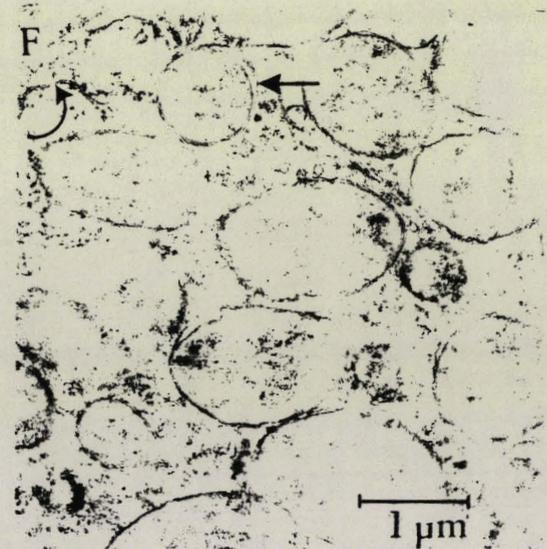
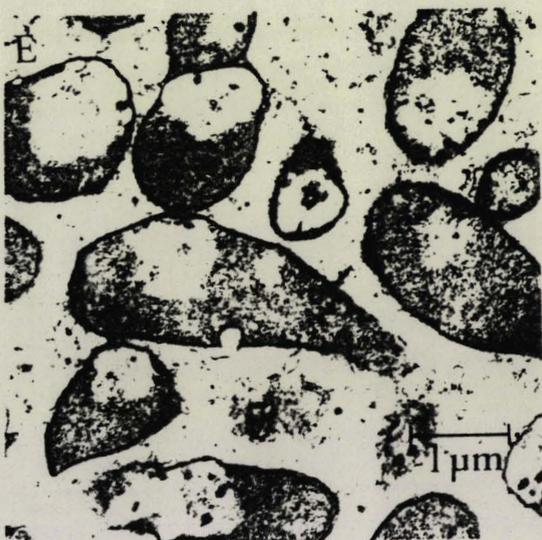
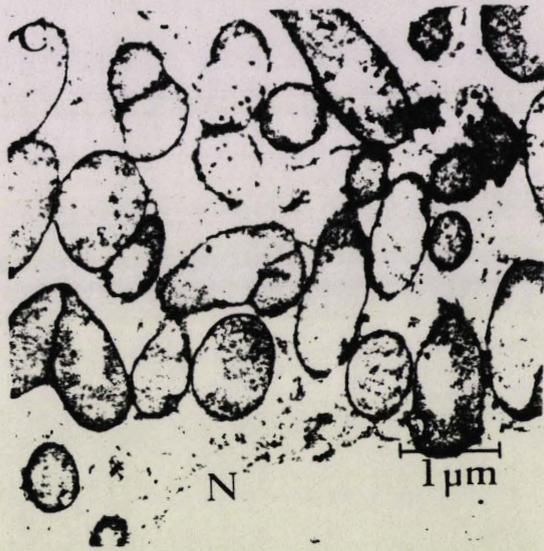
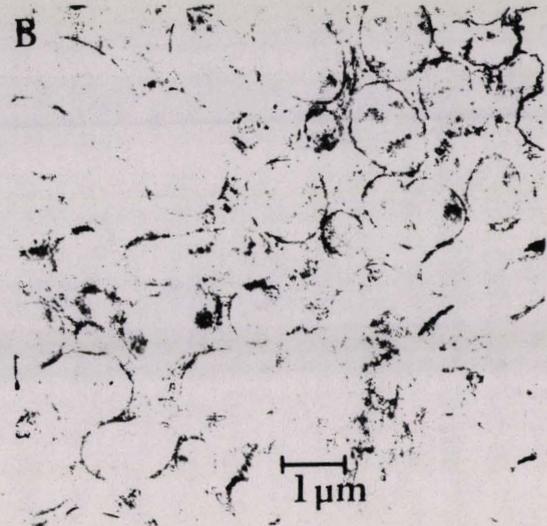
Des coupes nodulaires ont été examinées en microscopie électronique (pl. I). Nous remarquons à cet effet que :

- les bactéroïdes présents dans les cellules hôtes des nodules induits par la souche M5N1 sont plus vacuolés que ceux du mutant DC1 (photos A et B) ;
- le réticulum endoplasmique granulaire est présent dans diverses régions du cytoplasme des cellules végétales infectées par le mutant DC1 (photos D et F) ;
- la membrane de séquestration est largement décollée de la paroi chez les bactéroïdes du mutant DC1 (photo F).

PLANCHE I

Ultrastructure des batéroïdes de *R. meliloti* M5N1 (A,C,E) et DC 1

(B,D,F)



- ↪ : Réticulum endoplasmique granulaire
- : Membrane de séquestration
- N : Noyau
- v : Vacuole

3.8. Discussion

Deux volets se dégagent de cette étude : d'une part, l'isolement et la caractérisation du mutant DC1 ; ensuite, l'étude du transport du succinate chez *R. meliloti*.

3.8.1. Transport du succinate chez *R. meliloti*

Le transport du succinate chez *R. meliloti* M5N1 peut être considéré comme étant constitutif. En effet, les vitesses initiales d'accumulation du succinate, lorsque les cellules sont préalablement cultivées sur l'un des 3 acides dicarboxyliques, sont 3 à 4 fois supérieures à celles observées lorsque le glucose est le substrat de croissance. GLENN et coll. (1980) trouvent, chez *R. leguminosarum* WU235, des rapports d'activité inférieurs à 3 et suggèrent un système de transport constitutif. FINAN et coll. (1981) mentionnent, chez la souche GF160 de *R. leguminosarum*, des rapports de l'ordre de 25 et concluent que le système de transport du succinate est de nature inductible.

Les études cinétiques de transport chez *R. meliloti* M5N1 ont montré que la perméase au succinate fonctionne comme une enzyme Michaelienne avec une très forte affinité pour le substrat ($K_m = 2,86 \mu\text{M}$).

Le fumarate inhibe compétitivement le transport du succinate. La constante d'inhibition est du même ordre de grandeur que la constante d'affinité, ce qui suggère un transport commun de ces deux acides dicarboxyliques.

Chez *R. leguminosarum*, le fumarate et le malate inhibent compétitivement le transport du succinate (FINAN et coll., 1981) et les valeurs des constantes cinétiques sont comparables à celles obtenues chez *R. meliloti* M5N1.

Le transport du succinate, chez *R. meliloti* M5N1, est réalisé par un mécanisme actif dépendant de l'énergisation de la membrane en vertu du comportement des différents inhibiteurs métaboliques. Nous remarquons à cet effet que :

- l'arséniate, inhibiteur de la synthèse d'ATP, n'a pas d'action sur le transport. SMART et coll. (1984) suggèrent que le manque d'inhibition par l'arséniate serait dû à l'impossibilité de ce composé à pénétrer dans le cytoplasme ;
- le fluorure de sodium, inhibiteur de la synthèse du PEP, active le transport du succinate chez *R. meliloti* M5N1. THEODOROPOULOS et coll. (1985) obtiennent une légère activation du transport du glucose par le NaF chez la même souche ;

- l'accumulation du succinate chez *R. meliloti* est fortement inhibée en présence de découplants énergétiques tels que l'azide de sodium ou le 2,4 dinitrophénol. Des résultats similaires ont été reportés chez *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1980 ; FINAN et coll., 1981), chez *R. cowpea* (SAROSO et coll., 1984 ; SAN FRANCISCO et JACOBSON, 1985) et chez *R. japonicum* (McALLISTER et LEPO, 1983 ; SAN FRANCISCO et JACOBSON, 1985).

3.8.2. Isolement et caractérisation du mutant DC1

Par mutagénèse chimique à la nitrosoguanidine et enrichissement à la pénicilline, nous avons isolé un mutant de *R. meliloti* M5N1 incapable de croître sur succinate, fumarate et malate comme sources de carbone.

RONSON et coll. (1981) puis FINAN et coll. (1981) ont montré respectivement, chez *R. trifolii* et *R. leguminosarum*, que ces 3 acides dicarboxyliques utilisent le même système de transport.

Les cinétiques d'accumulation ont montré que le mutant DC1 de *R. meliloti* est déficient au niveau du transport du succinate et la faible incorporation a lieu par diffusion facilitée. En effet, tous les analogues structuraux testés n'ont pas d'action sur le transport du succinate chez le mutant DC1, alors que le succinate augmente sa propre accumulation par augmentation du gradient de concentration.

L'arabinose, le glutamate, l'acétate et le pyruvate, dont les métabolismes chez *R. meliloti* ont lieu via le cycle des acides tricarboxyliques (GARDIOL et coll., 1982 ; DUNCAN et FRAENKEL, 1979), permettent une croissance du mutant DC1. Ceci suggère que le cycle ATC est fonctionnel chez la souche mutante.

Les essais de fixation d'azote ont révélé une symbiose inefficace lors de l'inoculation des plantules de Luzerne par le mutant DC1. Des résultats similaires ont été reportés chez différentes espèces de *Rhizobium* (GLENN et BREWIN, 1981 ; RONSON et coll., 1981 ; FINAN et coll., 1983 ; ARWAS et coll., 1985 ; BOTTON et coll., 1986).

Les révertants, isolés sur succinate, retrouvent la capacité de croître en présence de fumarate ou de malate et présentent une activité nitrogénasique comparable à celle observée chez la souche sauvage M5N1.

En plus, la haute fréquence de réversion (8.10^{-6}) indique qu'une simple mutation est à l'origine de la perte à la fois de l'activité succinate perméasique et du pouvoir des bactéroïdes à réduire l'azote atmosphérique.

L'examen ultrastructural des nodules formés par le mutant DC1 montre une différenciation des bactéroïdes comparable à celle observée chez la souche sauvage M5N1. Ceci suggère que le transport des acides dicarboxyliques a lieu lors des étapes finales de la maturation des bactéries en bactéroïdes. Toutefois, nous avons remarqué des différences d'ordre structural entre les 2 types de nodules, notamment :

- le décollement plus important de la membrane de séquestration entourant les bactéroïdes du mutant DC1.

Nous associons ce phénomène au fait que les bactéroïdes du mutant DC1 ne produisent pas ou peu la porphyrine en vertu de la mutation au niveau du système de transport du succinate. Ce dernier étant le précurseur de la biosynthèse de l'hème (AVISSAR et NADLER, 1978). Nous savons, par ailleurs, que la légghémoglobine est située entre la membrane de séquestration et la paroi des bactéroïdes ;

- la présence de réticulum endoplasmique granulaire dans diverses régions du cytoplasme des cellules hôtes infectées par le mutant DC1.

GARDIOL et coll. (1987) observent, dans les nodules induits par le mutant succinate déshydrogénase⁻ de *R. meliloti* L5-30, la présence dans le cytoplasme des cellules hôtes de bactéries dégénérées, du réticulum endoplasmique granulaire, des lysosomes et des granules associées aux bactéroïdes. Ils associent ces processus à une dégénérescence prématurée et suggèrent que la différenciation des bactéroïdes de ce mutant fix⁻ est bloquée au stade suivant la libération des bactéries par le cordon d'infection ;

- la vacuolisation plus importante des bactéroïdes de la souche M5N1. GARDIOL et coll. (1987) trouvent également une vacuolation plus importante des bactéroïdes de la souche sauvage L5-30 comparée à celle du mutant succinate déshydrogénase⁻.

L'ensemble de ces résultats suggère que le transport actif des acides dicarboxyliques en C₄ est essentiel pour l'établissement d'une symbiose efficiente.

Outre, la participation des acides dicarboxyliques en tant que support énergétique de l'activité nitrogénasique, ces substrats peuvent être les précurseurs de la synthèse de l'hème de la léghémoglobine. Il n'est donc pas étonnant que seuls les mutants déficients au niveau du transport ou du métabolisme des intermédiaires du cycle des ATC donnent des nodules inefficients. En effet, même si d'autres substrats sont susceptibles d'être transportés et métabolisés par les bactéroïdes de ces mutants, la régulation de l'activité nitrogénasique ne pourra avoir lieu par manque de léghémoglobine.

Cette protéine joue une double rôle, d'une part elle assure le transport de l'oxygène du cytosol des cellules hôtes aux bactéroïdes qui sont fortement dépendants du métabolisme oxydatif pour la production d'énergie et, d'autre part, elle protège la nitrogénase de l'inactivation par l'oxygène.

CONCLUSION GENERALE

et

PERSPECTIVES

Lors d'une symbiose **Rhizobium**-Légumineuse efficace, les produits de la photosynthèse constituent des sources d'énergie potentielle pour la réduction de l'azote atmosphérique par les bactéroïdes.

Les acides organiques sont les substrats les plus efficaces pour la stimulation de la respiration des bactéroïdes *in vitro*. Pourtant, dans le nodule, les acides organiques sont présents à une concentration beaucoup plus faible que le glucose et le fructose, issus de l'activité invertasique.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressé à l'étude de l'utilisation des substrats énergétiques fournis par les cellules hôtes aux bactéroïdes pour la réalisation d'une symbiose efficace.

Pour cela, nous avons isolé 2 mutants métaboliques de **R. meliloti** M5N1 qui présentent les particularités suivantes :

- le mutant HD1 est incapable de croître sur fructose, mannitol, sorbitol, mannose, xylose ou ribose ;
- le mutant DC1 est incapable de croître sur succinate, malate ou fumarate.

L'étude du mutant HD1 a permis de montrer que :

- la mutation est localisée au niveau de la glucose-6-phosphate isomérase ;
- le fructose et le F-6-P sont les produits d'accumulation chez le mutant HD1 et le dosage de la fructokinase, en présence de concentrations progressives en F-6-P, indique que nous avons à faire à une inhibition allostérique de la fructokinase par le F-6-P ;
- tous les substrats métabolisés via le fructose ou le F-6-P ne permettent pas la croissance du mutant HD1 ;
- l'addition du fructose aux cellules du mutant HD1 cultivées en présence de substrats permissifs (glycérol, arabinose ou succinate) provoque une inhibition de la croissance avec une accumulation nette du fructose et du F-6-P. Cette inhibition a été corrélée au blocage du métabolisme au niveau des F-6-P ;
- la forte accumulation du fructose à l'intérieur des cellules du mutant HD1 est en faveur d'un transport actif du fructose par un système non-PTS ;
- le mutant HD1 est capable d'induire la formation de nodules efficaces. Ceci suggère que les substrats non permissifs tels que les hexitols (mannitol, sorbitol), les hexoses (fructose, mannose) ou les pentoses (xylose, ribose) ne constituent pas des sources d'énergie pour l'activité nitrogénasique.

Le mutant DC1, déficient au niveau du transport du succinate, est incapable de cultiver sur l'un ou l'autre des 3 acides dicarboxyliques du cycle des ATC.

Les tests de fixation d'azote ont montré l'absence d'une telle activité chez la souche DC1.

En plus, la capacité des révertants DC2 et DC3 à croître sur ces 3 acides dicarboxyliques ainsi qu'à réduire l'azote atmosphérique suppose que ces 3 substrats utilisent le même système de transport et rend compte de l'intérêt d'un tel système pour la réalisation d'une symbiose efficiente.

L'analyse des coupes nodulaires a permis de montrer une différenciation comparable des bactéroïdes du mutant DC1 par rapport à la souche sauvage M5N1. Néanmoins, l'inefficience des nodules induits par la souche DC1 et illustrée par l'apigmentation de ces nodules, pourrait être due au manque de succinate, principal inducteur de la biosynthèse de l'hème de la légghémoglobine.

Les bactéroïdes de ces nodules présentent un dégagement très marqué de la membrane de séquestration englobant l'hémoprotéine.

La réalisation d'une symbiose *R. meliloti*-Luzerne active est donc dépendante du fonctionnement du système de transport du succinate. Ceci nous a amené à étudier la nature de ce transport et sa régulation chez les cellules libres de *R. meliloti* M5N1. Nous remarquons à cet effet que :

- vu les faibles variations dans les vitesses initiales d'accumulation du succinate par les cellules de *R. meliloti* M5N1, préalablement cultivées sur diverses sources carbonées, le transport du succinate peut être considéré comme étant constitutif ;
- l'inhibition de l'accumulation du succinate par les découplants énergétiques (azide, DNP) suggère un transport actif du succinate par énergisation de la membrane ;
- le succinate, le fumarate et le malate utilisent le même système de transport. Ceci a pu être montré par le fait que :
 - la perméase au succinate est inhibée compétitivement par le fumarate et les constantes d'affinité et d'inhibition sont du même ordre de grandeur,
 - le mutant DC1 déficient au niveau du transport du succinate est incapable de cultiver sur fumarate ou malate,
 - les révertants DC2 et DC3 retrouvent la capacité de croître sur le fumarate et le malate.

En conclusion, l'étude de mutants métaboliques a permis d'affirmer le rôle des acides dicarboxyliques en tant que support énergétique de la fixation azotée.

Les hexoses, les pentoses ou les hexitols ne participent pas à cette régulation symbiotique.

A cet ensemble déjà réalisé, nous pouvons envisager des prolongements dont les orientations principales sont les suivantes :

- Les connaissances actuelles de l'utilisation des substrats carbonés par les bactéroïdes sont encore très insuffisantes, en raison de la difficulté d'obtention du matériel biologique. Dans des conditions de faible pression partielle en oxygène, les cellules libres de *Rhizobium* sont plutôt proches de l'état symbiotique. Il serait donc intéressant d'envisager l'étude du transport et du métabolisme des substrats énergétiques et leur régulation par les cellules libres de *R. meliloti* placées en conditions de microaérobiose.

Un des aspects du métabolisme a été traité par AVISSAR et NADLER (1978). Ils trouvent, chez les cellules libres de *R. japonicum* placées dans des conditions de pression partielle en O₂ limitée, une production 10 fois plus importante de l'hème, par rapport à la production obtenue par les cellules libres en aérobiose.

- Chez les cellules libres, le succinate est à l'origine de plusieurs régulations, notamment :
 - chez *R. meliloti* M5N1, la glucose perméase et la fructose perméase sont réprimées en présence de succinate (HORNEZ et coll., 1984) ;
 - les cellules de *R. meliloti* 2011, cultivées en présence de succinate et de lactose, présentent une croissance diauxique et l'activité β -galactosidase est réprimée durant la première phase correspondant à l'utilisation du succinate (UCKER et SIGNER, 1978) ;
 - chez *R. leguminosarum*, en croissance sur succinate, l'activité glucose perméase est réprimée (HUDMAN et GLENN, 1980) ;
 - chez *R. meliloti* L5-30, en croissance sur succinate seul, l'accumulation du mannose est réprimée (ARIAS et coll., 1982) ; d'autre part, GARDIOL et coll. (1987) observent dans ces conditions une déformation de ces cellules. Ils trouvent qu'en présence de succinate, la consommation de l'oxygène est très élevée et la microaérobiose résultante engendre un pléiomorphisme des cellules.

La présence de succinate dans le milieu de croissance est à l'origine de la suppression des activités mentionnées ci-dessus ainsi que de la déformation des cellules.

Ces caractéristiques sont rencontrées chez les bactéroïdes de **Rhizobium**, notamment le pléiomorphisme (HORNEZ et coll., 1974) et l'absence d'activité perméasique (HUDMAN et GLENN, 1980).

Dans cette perspective, on pourrait envisager l'étude du rapport utilisation du succinate et consommation de l'oxygène et étendre la régulation par le succinate à d'autres activités enzymatiques chez les cellules libres de **R. meliloti** M5N1.

A N N E X E I

TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONES CHEZ LES BACTERIES

- o O o -

L'acquisition de nutriments est une fonction primordiale pour tous les organismes vivants. L'aspect majeur de ce processus réside dans le transport de ces nutriments du milieu extérieur vers le cytoplasme. La membrane cytoplasmique sert de barrière cellulaire, non seulement pour l'incorporation sélective des nutriments désirés mais aussi pour l'excrétion de certains produits.

Cinq mécanismes de transport des substrats carbonés sont connus chez les bactéries (fig. 13). Ces systèmes peuvent être classés suivant la source d'énergie couplée au processus de transport. La diffusion facilitée est un processus non couplé à l'apport énergétique et le substrat diffuse à travers la membrane jusqu'à atteindre l'équilibre entre la concentration à l'intérieur des cellules et la concentration à l'extérieur des cellules. Le transport du glycérol a lieu selon ce mécanisme.

Les autres systèmes de transport sont actifs et l'accumulation des substrats a lieu contre un gradient de concentration.

I. - LA DIFFUSION FACILITEE

Le glycérol est le seul substrat carboné qui soit transporté par diffusion facilitée chez les bactéries. Chez *E. coli*, la capture du glycérol s'effectue par une protéine membranaire dépendante de l'activité glycérolkinase (HAYASHI et LIN, 1965). En effet, les mutants glycérolkinase⁻ sont incapables d'accumuler le glycérol alors que les mutants glycérol-phosphate déshydrogénase⁻ ayant l'activité glycérolkinase accumulent le glycérolphosphate. Le K_m de la glycérolkinase pour son substrat et celui des cellules pour le glycérol sont du même ordre de grandeur. Ceci indique que la capture du glycérol est réalisée par l'action de la glycérolkinase.

Les gènes codant pour la protéine de transport du glycérol et la glycérolkinase sont très proches (BERMAN-KURZ et RICHEY, 1971 ; BACHMANN et coll., 1976) alors que les gènes codant pour les autres enzymes de dégradation sont localisés dans d'autres régions du chromosome de *E. coli* (COZZARELLI et coll., 1968).

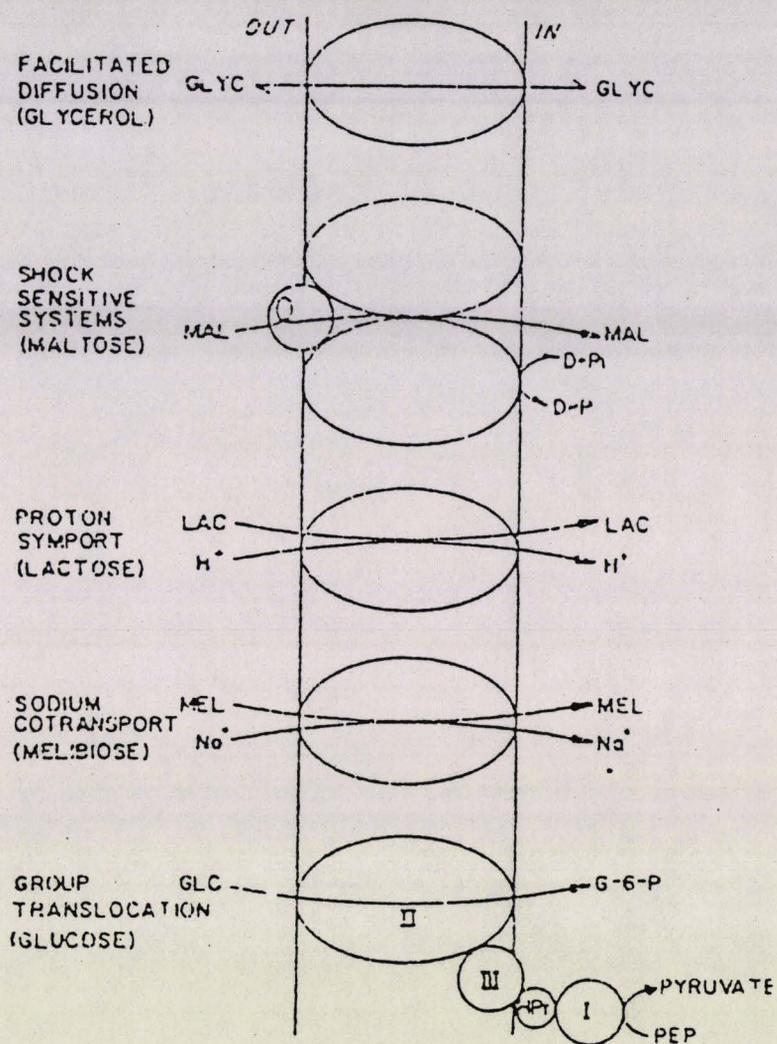


Figure 13 - Mécanismes de transport des substrats carbonés chez *E. coli* (d'après DILLS et coll., 1980).

II. - LE TRANSPORT ACTIF

Le transport actif des substrats carbonés chez les bactéries est réalisé par des perméases spécifiques. Ces enzymes subissent des modifications conformationnelles qui permettent l'incorporation des substrats dans le cytoplasme. On distingue 3 systèmes de transport actif.

2.1. Les systèmes à protéine périplasmique

Chez les bactéries à Gram négatif, ces systèmes sont sensibles au choc osmotique (NEU et HEPPEL, 1965). Il s'ensuit une perte de l'activité perméasique par libération de la protéine périplasmique.

Ces systèmes de transport font appel à des protéines de liaison (Binding Proteins) ayant des sites d'affinité pour le substrat transporté (fig. 14). Ils sont énergisés par l'ATP ou par un composé énergétique dont la synthèse dépend de l'ATP.

2.2. Les systèmes à transporteur mobile

Ces systèmes font appel à une seule protéine responsable à la fois de la reconnaissance et de la translocation des substrats. Ces derniers sont accumulés dans le cytoplasme à travers une membrane énergisée par un gradient de protons.

2.2.1. La lactose perméase

Cette protéine fonctionne différemment en fonction de la disponibilité de l'énergie dans la cellule. Ainsi, en absence d'énergie, on assiste à un transport passif du substrat.

Dans des conditions énergétiques favorables, résultant de la formation d'un gradient de pH à travers la membrane (HAROLD, 1972 ; KABACK, 1976), le substrat s'accumule (fig. 15). La protonation de la perméase change sa conformation et la rend plus active.

Le système de transport continue à fonctionner grâce à l'efflux actif des protons (fig. 15).

Le transport des substrats par ce système peut être inhibé par 3 types d'inhibiteurs :

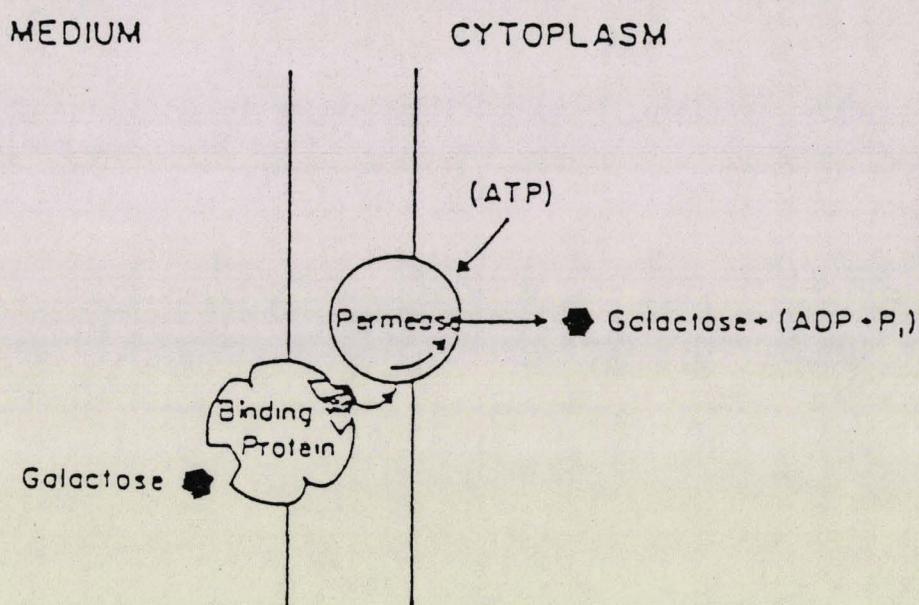


Figure 14 - Les systèmes à protéine périplasmique. Exemple de β -méthyl-galactoside perméase (d'après ANDREWS et LINN, 1976 modifié).

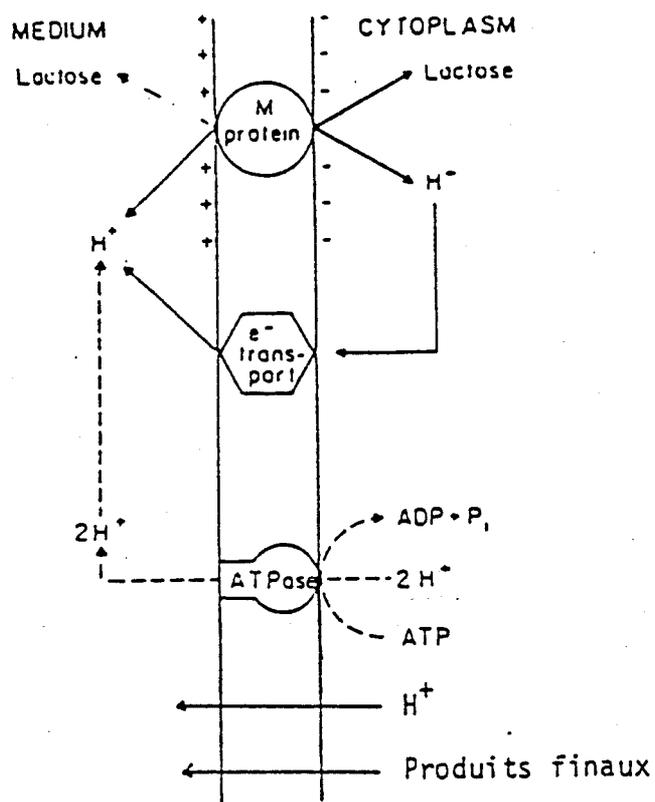


Figure 15 - La lactose perméase.

- par un substrat compétitif, qui agit en occupant le site de fixation du substrat ;
- par un découplant énergétique, qui dissipe l'énergie créée par le flux de protons ;
- par des agents chimiques complexants tels que le N-éthylmaléimide (NEM) qui agit directement sur la perméase au lactose en bloquant les fonctions -SH libres.

2.2.2. La mélibiose perméase

Ce système a été décrit pour la première fois chez *S. typhimurium* (STOCKS et ROSEMAN, 1971). Il diffère de la lactose perméase par le fait qu'il dépend de la présence d'ions Na^+ ou Li^+ lors de l'accumulation de thiométhylgalactoside (TMG). Chez *E. coli*, cette accumulation fortement inhibée par le NEM et le CCCP, indique d'une part que la perméase possède à son site actif des groupements -SH et d'autre part que le transport est énergisé par un gradient de protons (LOPILATO et coll., 1978).

BURSTEIN et KEPES (1985) ont montré, chez *E. coli*, que le système mélibiose perméase est dépendant du pH alors que celui du lactose présente un spectre plus large.

Le gradient de pH joue donc un rôle très important au niveau de la création du gradient d'ions Na^+ nécessaire au transport du TMG.

Le système ATPasique fournit l'essentiel de l'énergie pour l'efflux des protons (VAN THIENEN et coll., 1978). La sortie des protons est à l'origine de l'accumulation et de l'efflux des ions Na^+ .

2.3. Le système phosphotransférase (PTS)

Le transport des sucres par ce système fait intervenir plusieurs enzymes (fig. 16) qui catalysent le transfert du phosphate, à partir d'une molécule de phosphoénolpyruvate, au sucre. Seules les enzymes E II et E III du système PTS sont spécifiques de chaque substrat.

Le tableau 15 représente la distribution du système PTS chez les bactéries. Le système PTS est rencontré généralement chez les bactéries anaérobies à condition que le sucre accumulé soit métabolisé par la voie EMP qui fournit 2 molécules de PEP par molécule d'hexose utilisée.

Par contre, chez les bactéries aérobies, la voie ED est prédominante et l'énergie générée sous forme d'ATP ou de gradient de protons assure le transport des sucres.

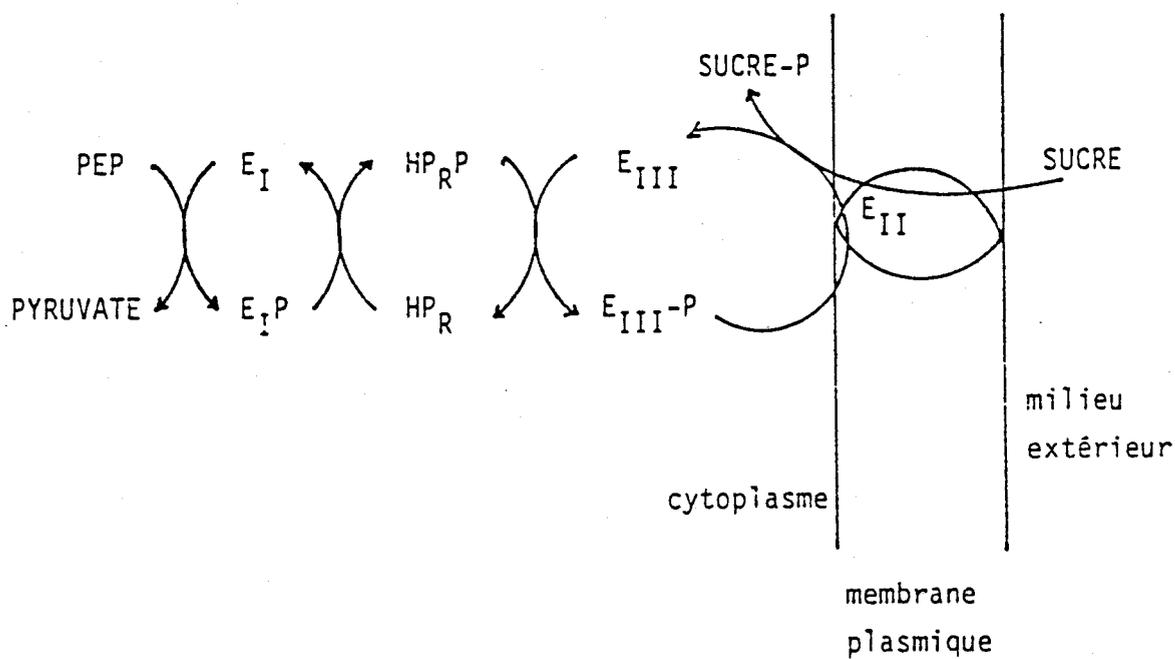


Figure 16 - Le système hexose-PTS chez E. coli et S. typhimurium (d'après DILLS et coll., 1980).

Genres	Réaction Gram	Substrats
Rhodopseudomonas	-	fructose
Rhodospirillum	-	fructose
Thiocapsa	-	fructose
Thiocystis	-	fructose
Ancalomicrobium	-	général
Spirochaeta	-	mannitol
Pseudomonas	-	fructose
Alcaligenes	-	fructose
Beneckea	-	général
Escherichia	-	général
Klebsiella	-	général
Photobacterium	-	général
Salmonella	-	général
Serratia	-	général
Fusobacterium	-	fructose
Megasphaera	-	glucose, fructose
Staphylococcus	+	général
Streptococcus	+	général
Bacillus	+	général
Clostridium	+	fructose, mannitol
Brochotrix	+	général
Lactobacillus	+	général
Arthrobacter	+	fructose, rhamnose
Mycoplasma	+	général

Tableau 15 - Distribution du système de transport PTS chez les Procaryotes (d'après DILLS et coll., 1980).

L'action des inhibiteurs métaboliques sur le transport des sucres par le système PTS est différente de celle décrite pour les autres systèmes de transport. Les découplants énergétiques stimulent l'accumulation des substrats (HAGUENAUER et KEPES, 1971 ; REIDER et coll., 1979) alors que le fluorure limite ce transport (HAGUENAUER et KEPES, 1972).

A N N E X E II

PRINCIPALES VOIES DE DEGRADATION DES HEXOSES
ET DES HEXITOLS CHEZ LES BACTERIES

- o O o -

La dégradation des hexoses et des hexitols suit des voies diverses selon les microorganismes en cause. Les figures 17, 18 et 19 représentent les principales voies d'utilisation de ces substrats.

I. - LA VOIE ENTNER-DOUDOROFF

Les enzymes caractérisant cette voie sont la 6-phosphogluconate déshydratase et la 2 céto-3-désoxy-6-phosphate aldolase. Le rendement énergétique de cette voie est très faible, puisqu'une seule mole d'ATP est récupérée par mole de substrat consommé. La voie ED est rencontrée généralement chez les bactéries aérobies strictes telles que *Azotobacter*, *Micrococcus* et *Mycobacterium* qui génèrent l'énergie sous forme d'ATP ou de gradient électrochimique de protons.

Ces formes d'énergie sont utilisées pour activer le transport des hexoses et des hexitols par un système non-PTS.

II. - LA VOIE EMBDEN-MEYERHOFF PARNAS OU VOIE GLYCOLYTIQUE

Les enzymes clefs de cette voie sont la phosphofructokinase et la fructose 1,6-disphosphate aldolase.

La dégradation des substrats par cette voie fournit 2 moles de PEP et le développement d'un système de transport PTS est mieux adapté dans ce cas.

La voie EMP est rencontrée chez la plupart des bactéries anaérobies et chez certaines anaérobies facultatives.

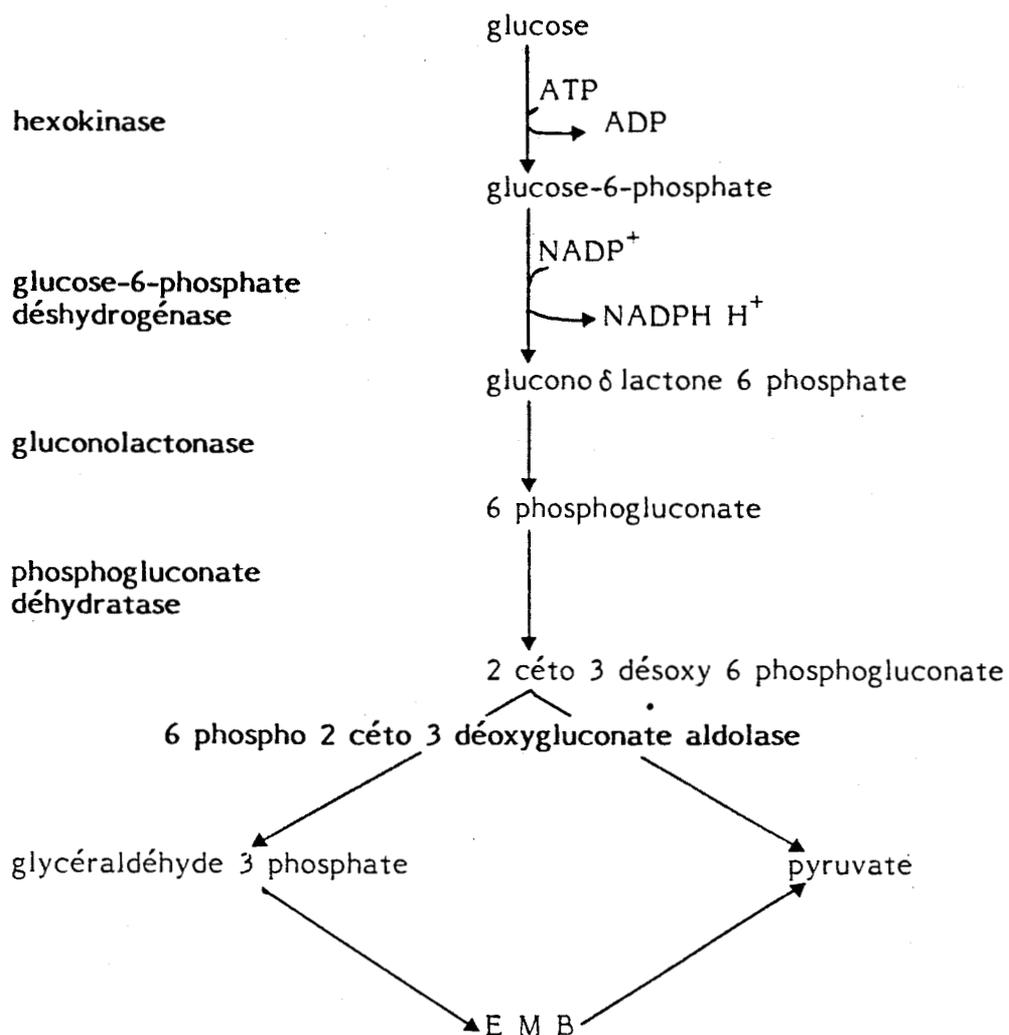


Figure 17 - Métabolisme du glucose par la voie d'Entner-Doudoroff (ED) ou voie du KDPG.

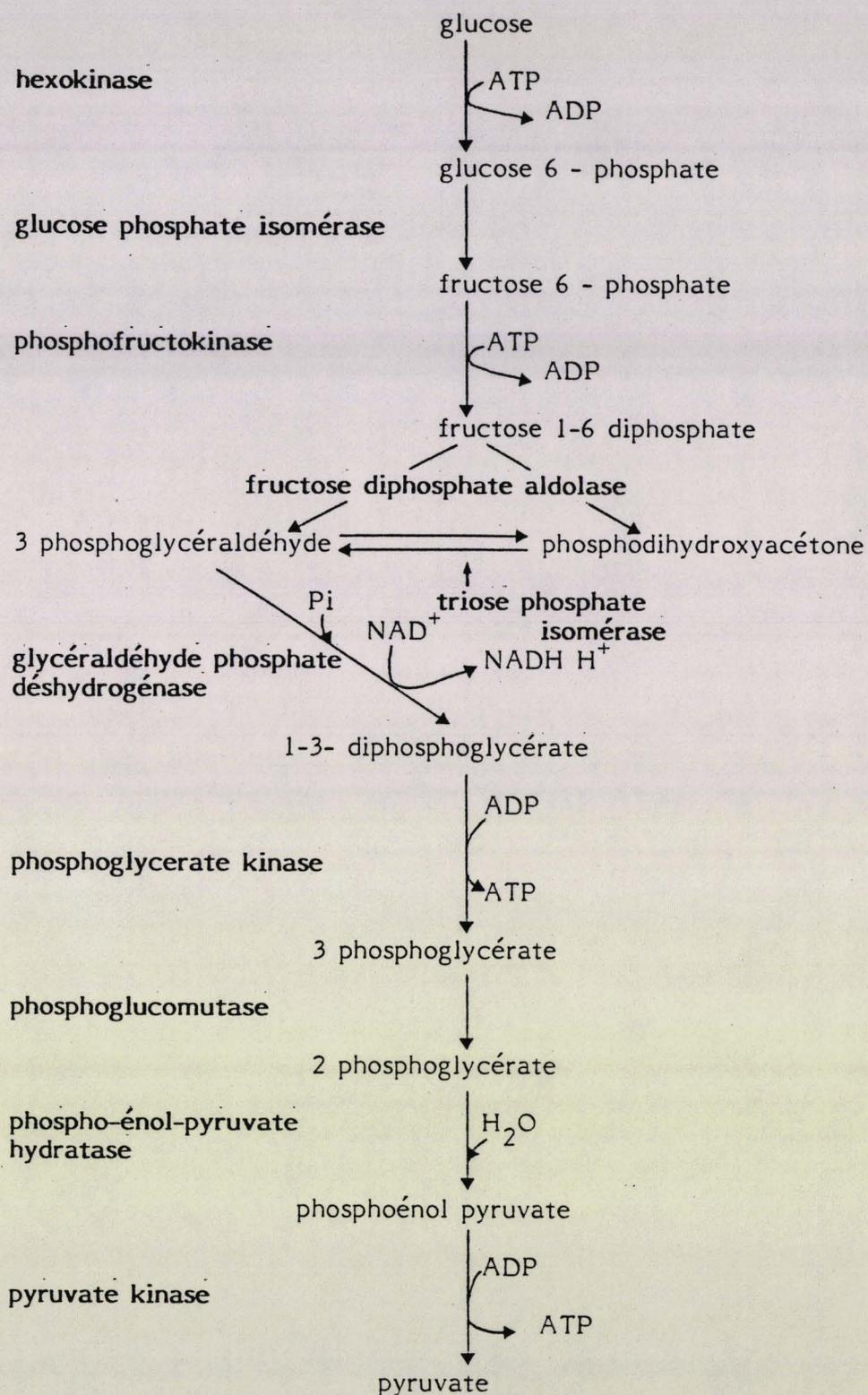


Figure 18 - Métabolisme du glucose par la voie de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) ou voie de la glycolyse.

III. - LA VOIE DES PENTOSES PHOSPHATES OU VOIE DICKENS-HORECKER

L'enzyme clef de cette voie est la gluconate-6-phosphate déshydrogénase à NADP qui permet la décarboxylation oxydative du gluconate-6-phosphate en ribulose-5-phosphate.

Ce dernier subit une série d'inter-conversions catalysées par la transcétolase et la transaldolase.

Pour chaque mole de triose-phosphate, trois moles de CO_2 et 6 moles de NADPH_2 sont obtenues.

Du point de vue énergétique, l'oxydation des moles de NADPH_2 fournit 36 moles d'ATP, et le bilan final serait de 35 moles d'ATP par mole de substrat consommé.

Le cycle des pentoses phosphates est suivi par un grand nombre d'espèces de bactéries (*Acetobacter*, *Pseudomonas*, *E. coli*). Il est caractérisé par la production de NADPH_2 nécessaire aux biosynthèses.

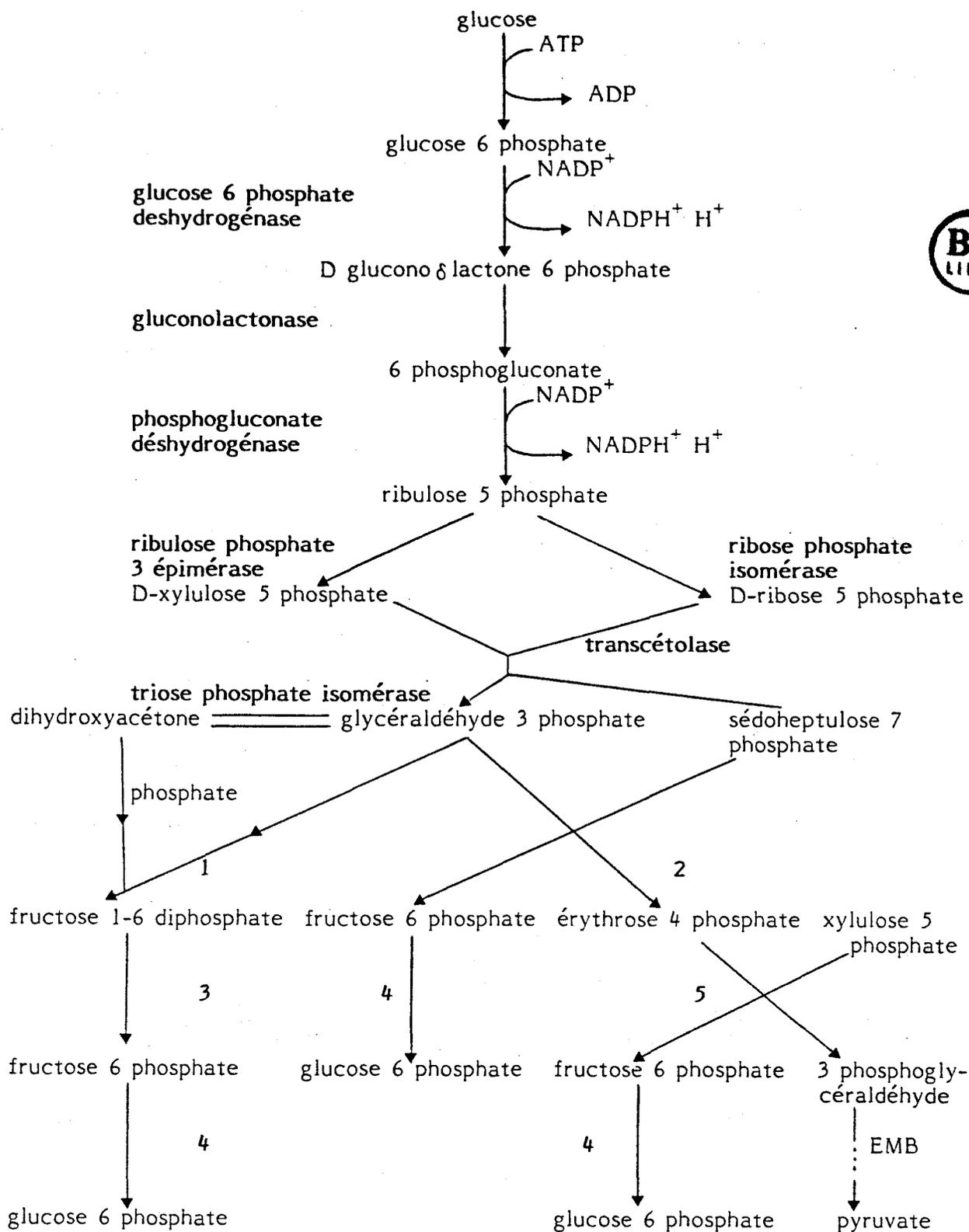


Figure 19 - Métabolisme du glucose par la voie de Dickens Horecker (DH) ou voie des pentoses

1 : fructose 1-6 diphosphate aldolase ; 2 : transaldolase ; 3 : hexose diphosphatase ; 4 : glucose phosphate isomérase ; 5 : transcétolase.

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

- ALLEN O.N. and I.L. BALDWIN, 1954.
Rhizobia-legume relationships.
Soil Sci., 78, 415-427.

- ANDREWS K.J. and E.C.C. LIN, 1976.
Selective advantages of various bacterial carbohydrate transport mechanisms.
Federation Proc., 35, 2185-2189.

- ANTONIW L.D. and J.J. SPRENT, 1978.
Primary metabolites of *Phaseolus vulgaris* nodules.
Phytochem., 17, 675-678.

- ARIAS A. and C. CERVENANSKY, 1986.
Galactose metabolism in *Rhizobium meliloti* L5-30.
J. Bacteriol., 167, 1092-1094.

- ARIAS A., C. CERVENANSKY, A. GARDIOL and G. MARTINEZ-DRETS, 1979.
Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 137, 409-414.

- ARIAS A., A. GARDIOL and G. MARTINEZ-DRETS, 1982.
Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 151, 1069-1072.

- ARIAS A. and G. MARTINEZ-DRETS, 1976.
Glycerol metabolism in *Rhizobium*.
Can. J. Microbiol., 22, 150-153.

- ARWAS R., A. MCKAY, F.R. ROWNEY, M.J. DILWORTH and A.R. GLENN, 1985.
Properties of organic acid utilization mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 300.
J. Gen. Microbiol., 131, 2059-2066.

- AVISSAR Y.J. and K.D. NADLER, 1978.
Stimulation of tetrapyrrole formation in *Rhizobium japonicum* by restricted aeration.
J. Bacteriol., 135, 782-789.

- BACHMAN B.J., K.B. LOW and A.L. TAYLOR, 1976.
Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K12.
Bacteriol. Rev., 40, 116-167.

- BERGERSEN F., 1977.
Physiological chemistry of dinitrogen fixation by legumes. In : **A treatise on dinitrogen fixation**, section III : Biology. Eds. HARDY R.W.F. and W. SILVER, New-York : Wiley-Interscience, 519-555.

- BERINGER J.E., 1974.
R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 84, 188-198.

- BERMAN-KURTZ M., E.C.C. LIN and D.P. RICHEY, 1971.
Promoter like mutant with increased expression of the glycerol kinase operon of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 106, 724-731.

- BÖCK A. and F.C. NEIDHART, 1966.
Properties of a mutant of *Escherichia coli* with a temperature sensitive fructose 1,6-diphosphate aldolase.
J. Bacteriol., 92, 470-476.

- BOLTON E., B. HIGGISSON, A. HARRINGTON and F. O'GARA, 1986.
Dicarboxylic acid transport in *Rhizobium meliloti* : isolation of mutants and cloning of dicarboxylic acid transport genes.
Arch. Microbiol., 144, 142-146.

- BURSTEIN C. and A. KEPES, 1985.
The melibiose permease system of *Escherichia coli* K12.
Biochimie, 67, 59-67.

- CERVENANSKY C. and A. ARIAS, 1984.
Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in pleiotropic carbohydrate-negative mutant strains of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 160, 1027-1030.

- COURTOIS B., J.P. HORNEZ et J.C. DERIEUX, 1983.
Mise en évidence d'une propriété métabolique de *Rhizobium meliloti* utilisable pour sa classification.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 134A, 141-147.

- COZZARELLI N.R., W.B. FREEDBERG and E.C.C. LIN, 1968.
Genetic control of the L- α -glycerolphosphate system in *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol., 31, 371-387.

- DE LEY J. and M. DOUDOROFF, 1957.
The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*.
J. Biol. Chem., 227, 745-757.

- DE LEY J. and A. RASSEL, 1965.
DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*.
J. Gen. Microbiol., 41, 85-91.

- DE VRIES G.E., A.A.N. VAN BRUSSEL and A. QUISPEL, 1982.
Mechanism and regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bacteriol., 149, 872-879.

- DILLS S.S., A. APPERSON, M.R. SCHMIDT and M.H. SAIER Jr., 1980.
Carbohydrate transport in bacteria.
Microbiol. Rev., 44, 385-418.

- DILWORTH M.J., R. ARWAS, I.A. MCKAY, S. SAROSO and A.R. GLENN, 1986.
Pentose metabolism in *Rhizobium leguminosarum* MNF 300 and in cowpea *Rhizobium* NGR 234.
J. Gen. Microbiol., 132, 2733-2742.

- DUNCAN M.J., 1979.
L-arabinose metabolism in *Rhizobium*.
J. Gen. Microbiol., 113, 177-179.

- DUNCAN M.J., 1981.
Properties of Tn5-induced carbohydrate mutants in *Rhizobium meliloti*.
J. Gen. Microbiol., 122, 61-67.

- DUNCAN M.J. and D.G. FRAENKEL, 1979.
 α -keto-glutarate dehydrogenase mutant of **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 137, 415-419.

- ELKAN G.H. and I. KWIK, 1968.
Nitrogen, energy and vitamin nutrition of **Rhizobium japonicum**.
J. Appl. Bact., 31, 399-404.

- FINAN T.M., J.M. WOOD and D.C. JORDAN, 1981.
Succinate transport in **Rhizobium leguminosarum**.
J. Bacteriol., 148, 193-202.

- FINAN T.M., J.M. WOOD and D.C. JORDAN, 1983.
Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of **Rhizobium leguminosarum**.
J. Bacteriol., 154, 1403-1413.

- FRAENKEL D.G., 1968.
The accumulation of glucose-6-phosphate from glucose and the effect in an **Escherichia coli** mutant lacking phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 243, 6451-6457.

- FRED E.B., I.L. BALDWIN and E. McCOY, 1932.
Root nodule bacteria and leguminous plants.
Madison Univ. Wisconsin Studies Sci., 5, 343.

- GARDIOL A., A. ARIAS, C. CERVENANSKY, C. GAGGERO and G. MARTINEZ-DRETS, 1980.
Biochemical characterization of a fructokinase mutant of **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 144, 12-16.

- GARDIOL A., A. ARIAS, C. CERVENANSKY and G. MARTINEZ-DRETS, 1982.
Succinate dehydrogenase mutant of **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 151, 1621-1623.

- GARDIOL A.E., G.L. TRUCHET and F.B. DAZZO, 1987.
Requirement of succinate dehydrogenase activity for symbiotic bacteroid differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules.
Appl. Environ. Microbiol., 53, 1947-1950.

- GLENN A.R., R. ARWAS, I.A. McKAY and M.J. DILWORTH, 1984a.
Fructose metabolism in wild-type, fructokinase negative and revertant strains of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 130, 231-237.

- GLENN A.R., R. ARWAS, I.A. McKAY and M.J. DILWORTH, 1984b.
Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 130, 239-245.

- GLENN A.R. and N.J. BREWIN, 1981.
Succinate resistant mutants of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 126, 237-241.

- GLENN A.R. and M.J. DILWORTH, 1981a.
Oxidation of substrates by isolated bacteroids and free-living cells of *Rhizobium leguminosarum* 3841.
J. Gen. Microbiol., 126, 243-247.

- GLENN A.R. and M.J. DILWORTH, 1981b.
The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast- and slow-growing species of *Rhizobium*.
Arch. Microbiol., 129, 233-239.

- GLENN A.R., P.S. POOLE and J.F. HUDMAN, 1980.
Succinate uptake by free living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 119, 267-271.

- HAGUENAUER R. and A. KEPES, 1971.
The cycle of renewal of intracellular α -methyl glucoside accumulated by the glucose permease of *Escherichia coli*.
Biochimie, 53, 99-105.

- HAGUENAUER R. and A. KEPES, 1972.
NaF inhibition of phosphorylation and dephosphorylation involved in α -methyl-D-glucoside transport in **Escherichia coli** K12. A pH dependent phenomenon sensitive to uncoupling agents.
Biochimie, 54, 505-512.

- HAROLD F.M., 1972.
Conservation and transformation of energy by bacterial membranes.
Bacteriol. Rev., 36, 172-230.

- HAYASHI S. and E.C.C. LIN, 1965.
Product induction of glycerol kinase in **Escherichia coli**.
J. Mol. Biol., 14, 515-521.

- HORNEZ J.P., 1987.
L'utilisation du glucose et du fructose chez **Rhizobium meliloti** : dégradation, transport et régulations.
Thèse de Doctorat d'Etat n°728, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

- HORNEZ J.P., B. COURTOIS, C. DEFIVES et J.C. DERIEUX, 1974.
Etude des membranes internes dans les bactéroïdes de **Rhizobium meliloti** au sein des nodules de Luzerne (**Medicago sativa**).
C. R. Acad. Sci. Paris, 278 (ser. D), 157-160.

- HORNEZ J.P., B. COURTOIS et J.C. DERIEUX, 1976.
Mise en évidence de voies de métabolisme différentes à partir du glucose ou du fructose chez **Rhizobium meliloti**.
C. R. Acad. Sci. Paris, 283 (ser. D), 1559-1562.

- HORNEZ J.P., A.P. THEODOROPOULOS, B. COURTOIS and J.C. DERIEUX, 1984.
Diauxic growth and catabolic repression in **Rhizobium meliloti**. In : **Advance in nitrogen fixation research**. Eds. VEEGE C. and W.E. NEWTON, Pudoc, Wageningen, p. 262.

- HUDMAN J.F. and A.R. GLENN, 1980.
Glucose uptake by free living and bacteroid forms of **Rhizobium leguminosarum**.
Arch. Microbiol., 128, 72-77.

- KABACK H.R., 1976.
Molecular biology and energetics of membrane transport.
J. Cell. Physiol., 89, 575-594.

- KARR D.B., J.K. WATERS, F. SUZUKI and D.W. EMERICH, 1984.
Enzymes of the poly β -hydroxybutyrate and citric acid cycles of **Rhizobium japonicum** bacteroids.
Plant Physiol., 75, 1158-1162.

- KATZNELSON H. and A.C. ZAGALLO, 1957.
Metabolism of Rhizobia in relation to effectiveness.
Can. J. Microbiol., 3, 879-884.

- KEELE B.B., P.B. HAMILTON and G.H. ELKAN, 1969.
Glucose catabolism in **Rhizobium japonicum**.
J. Bacteriol., 97, 1184-1191.

- KEELE B.B., P.B. HAMILTON and G.H. ELKAN, 1970.
Gluconate catabolism in **Rhizobium japonicum**.
J. Bacteriol., 101, 698-704.

- KRETOVICH W.L., V.I. ROMANOV, B.R. ABDULLAEVA, B.F. IVANOV, I.E. CHERMENSKAYA and N.G. FEDULOVA, 1985.
¹⁴C-glucose utilization by **Rhizobium lupini** bacteroids.
Plant Soil., 85, 211-217.

- KURZ W.G.W. and T.A. LA RUE, 1977.
Citric acid cycle enzymes and nitrogenase in nodule of **Pisum sativum**.
Can. J. Microbiol., 23, 1197-1200.

- KUYKENDALL L.D. and G.H. ELKAN, 1976.
Rhizobium japonicum derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization.
Appl. Environ. Microbiol., 32, 511-519.

- LAWRIE A.C. and C.T. WHEELER, 1975.
Nitrogen fixation in the root nodules of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon.
New Phytol., 74, 429-436.

- LEDERBERG J. and E.M. LEDERBERG, 1952.
Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.
J. Bacteriol., 63, 399-406.

- LESSIE T.G. and J.C. VANDER WYK, 1972.
Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase : difference in size, pyridine-nucleotide specificity and susceptibility to inhibition by adenosine-5'-triphosphate.
J. Bacteriol., 110, 1107-1117.

- LOPILATO J., T. TSUCHIYA and T.H. WILSON, 1978.
Role of Na⁺ and Li⁺ in thiomethylgalactoside transport by the melibiose transport system of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 134, 147-156.

- LOWRY O.H., N.J. ROSENROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, 1951.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

- LUFT J.H., 1961.
Improvements in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem., 9, 409.

- MARTINEZ-DRETS G. and A. ARIAS, 1970.
Metabolism of some polyols of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 103, 97-109.

- MARTINEZ-DRETS G. and A. ARIAS, 1972.
Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing groups.
J. Bacteriol., 109, 467-470.

- MARTINEZ-DRETS G., A. ARIAS and M. RORIVA DE CUTINELLA, 1974.
Fast and slow-growing rhizobia differences in sucrose utilization and invertase activity.
Can. J. Microbiol., 20, 605-609.
- McALLISTER C.F. and J.E. LEPO, 1983.
Succinate transport by free-living forms of *Rhizobium japonicum*.
J. Bacteriol., 153, 1155-1162.
- MAXWELL E.S., K. KURAHASHI and H.M. KALCKAR, 1962.
Enzymes of the Leloir pathway.
Methods Enzymol., 5, 174-189.
- MULONGOY K. and G.H. ELKAN, 1977a.
Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen-fixing efficiency.
J. Bacteriol., 131, 179-187.
- MULONGOY K. and G.H. ELKAN, 1977b.
The role of 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Rhizobium*.
Can. J. Microbiol., 23, 1293-1298.
- NEU H.C. and L.A. HEPPEL, 1965.
The release of enzymes from *Escherichia coli* during the formation of spheroplasts.
J. Biol. Chem., 240, 3685-3692.
- PEDROSA F.O. and G.T. ZANCAN, 1974.
L-arabinose metabolism in *Rhizobium japonicum*.
J. Bacteriol., 119, 336-338.
- REIBACH P.H. and J.G. STREETER, 1983.
Metabolism of ¹⁴C-labelled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules.
Plant Physiol., 72, 634-640.



- REIBACH P.H. and J.G. STREETER, 1984.
Evaluation of active versus passive uptake of metabolites by **Rhizobium japonicum** bacteroids.
J. Bacteriol., 159, 47-52.

- REIDER E., E.F. WAGNER and M. SCHWEIGER, 1979.
Control of phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase mediated sugar transport in **Escherichia coli** by energization of the cell membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5529-5533.

- REYNOLDS E.S., 1963.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol., 17, 208.

- ROMANO A.H., S.J. EBERHARD, S.L. DINGLE and S.D. McDOWELL, 1970.
Distribution of the phosphoenolpyruvate : glucose phosphotransferase system in bacteria.
J. Bacteriol., 104, 803-813.

- ROMANOV V.I., B.F. IVANOV, N.G. FEDULOVA, M.V. RAIKHINSHTEIN, I.E. CHERMENSKAYA, A.A. ZEMLYANVKHIN and W.L. KRETOVICH, 1980.
Glucose metabolism in isolated bacteroids of lupine nodules.
Biokhim., 45, 2130-2145.

- RONSON C.W., P. LYTTLETON and J.G. ROBERTSON, 1981.
C₄-dicarboxylate transport mutants of **Rhizobium trifolii** from ineffective nodules of **Trifolium repens**.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4284-4288.

- RONSON C.W. and S.B. PRIMROSE, 1979.
Carbohydrate metabolism in **Rhizobium trifolii** : identification and symbiotic properties of mutants.
J. Gen. Microbiol., 112, 77-88.

- SALMINEN S.O. and J.G. STREETER, 1986.
Enzyme of α , α -trehalose metabolism in soybean nodules.
Plant Physiol., 81, 538-541.

- SALMINEN S.O. and J.G. STREETER, 1987.
Uptake and metabolism of carbohydrates by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids.
Plant Physiol., 83, 535-540.

- SAN FRANCISCO M.J.D. and G.R. JACOBSON, 1985.
Uptake of succinate and malate in cultured cells and bacteroids of two slow-growing species of *Rhizobium*.
J. Gen. Microbiol., 131, 765-773.

- SAROSO S., A.R. GLENN and M.J. DILWORTH, 1984.
Carbon utilization by free-living and bacteroid forms of cowpea *Rhizobium* strain NGR234.
J. Gen. Microbiol., 130, 1809-1814.

- SMART J.B., M.J. DILWORTH and A.D. ROBSON, 1984.
Effect of phosphorus supply on phosphate uptake and alkaline phosphatase in *Rhizobia*.
Arch. Microbiol., 140, 281-286.

- SOLS A. and M.L. SALAS, 1966.
Phosphofructokinase III. Yeast. In : **Methods in Enzymology**. Ed. WOOD W.A., Academic Press Inc., New-York, vol. 9, 436-442.

- STOCK J. and S. ROSEMAN, 1971.
A sodium dependent sugar co-transport system in bacteria.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 132-138.

- STOVALL I. and M. COLE, 1978.
Organic acid metabolism by isolated *Rhizobium japonicum* bacteroids.
Plant Physiol., 61, 787-790.

- STOWERS M.D., 1985.
Carbon metabolism in *Rhizobium* species.
Ann. Rev. Microbiol., 39, 89-108.

- STOWERS M.D. and A.R.J. EAGLESHAM, 1984.
Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing **Rhizobium japonicum**.
Plant Soil, 77, 3-14.

- STOWERS M.D. and G.H. ELKAN, 1983.
The transport and metabolism of glucose in cowpea Rhizobia.
Can. J. Microbiol., 29, 398-406.

- STOWERS M.D. and G.H. ELKAN, 1984.
Gluconate catabolism in cowpea Rhizobia : evidence for a ketogluconate pathway.
Arch. Microbiol., 137, 3-9.

- TAJIMA S., H. SASAHARA, H. KOUCHI, T. YONEYAMA and J. ISHIZUKA, 1985.
Effects of oxygen concentration and leghemoglobin on organic acid degradation by isolated soybean nodule bacteroids.
Agric. Biol. Chem., 49, 3473-3479.

- THEODOROPOULOS P.A., 1986.
Le transport du glucose et sa régulation chez **Rhizobium meliloti**.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°31, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

- THEODOROPOULOS P.A., J.P. HORNEZ, B. COURTOIS and J.C. DERIEUX, 1985.
Evidence of an active glucose uptake in **Rhizobium meliloti**.
Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 136A, 261-269.

- TUZIMURA K. and H. MEGURO, 1960.
Respiration substrate of **Rhizobium** in the nodules.
J. Biochem., 47, 391-397.

- UCKER D.S. and E.R. SIGNER, 1978.
Catabolite repression-like phenomén in **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 136, 1197-1200.

- VAN THIENEN G.M., P.W. POSTMA and K. VAN DAM, 1978.
Na⁺-dependent methyl- β -thiogalactoside transport in **Salmonella typhimurium**.
Biochim. Biophys. Acta, 513, 395-400.

- VINCENT J.M. and B. HUMPHREY, 1970.
Somatic antigens of two stains of **Rhizobium trifolii**.
J. Gen. Microbiol., 63, 379-382.

- WITTENBERG J.B., 1974.
Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by
bacteroids isolated from soybean root nodules.
J. Biol. Chem., 249, 4057-4066.

R E S U M E

Le présent travail décrit l'isolement et la caractérisation de 2 mutants métaboliques de *R. meliloti*, en vue de montrer l'importance de l'utilisation des substrats carbonés par les bactéroïdes lors de la symbiose.

Après la présentation du genre *Rhizobium* et de la symbiose, une étude est présentée concernant les travaux préalablement entrepris sur le transport et le métabolisme des substrats carbonés et leur régulation chez les cellules libres et les bactéroïdes de *Rhizobium*.

L'examen du métabolisme énergétique des hexoses chez *R. meliloti* M5N1 montre :

- la prédominance de la voie Entner-Doudoroff ;
- la présence de la voie des pentoses phosphates, conformément à toutes les espèces de *Rhizobium* à croissance rapide ;
- l'absence de la voie Embden-Meyerhoff-Parnas.

Ces résultats ont été confirmés lors de l'isolement et de la caractérisation du mutant glucose-6-phosphate isomérase⁻. En effet, les faibles activités des enzymes clefs de la voie EMP ne permettent pas l'utilisation par le mutant HD1 du fructose ou des substrats métabolisés via ce dernier tels que le mannitol ou le sorbitol.

Les substrats, rejoignant le F-6-P tels que le mannose, le xylose ou le ribose, ne permettent pas la croissance du mutant HD1.

Les mêmes taux de croissance sont obtenus pour le mutant HD1 et la souche sauvage M5N1 cultivés sur arabinose, qui emprunte une voie de dégradation différente de celle des pentoses.

Les mécanismes biochimiques, régulant l'utilisation du fructose par le mutant HD1, ont permis de montrer que :

- l'addition du fructose aux cellules du mutant HD1, cultivées en présence de sources de carbone permissives, provoque une inhibition de la croissance ;

- le fructose et le F-6-P sont les produits d'accumulation à l'intérieur des cellules ;
- le F-6-P inhibe la fructokinase et provoque l'accumulation du fructose. Cette accumulation indique, en accord avec d'autres auteurs, que le transport du fructose chez *R. meliloti* est actif par un système non-PTS.

La capacité du mutant HD1 à induire la formation de nodules efficaces suggère que les substrats non permissifs précités ne participent pas à la réduction de l'azote par les bactéroïdes.

L'isolement et la caractérisation du mutant succinate perméase⁻ de *R. meliloti* a permis de mieux appréhender cette régulation symbiotique. Le mutant DC1, incapable de croître sur succinate, fumarate ou malate, donne des nodules inefficaces. Ces nodules sont dépourvus de légghémoglobine et l'analyse ultrastructurale révèle un décollement de la membrane de séquestration entourant le bactéroïde.

Les révertants DC2 et DC3, isolés sur succinate, retrouvent la capacité de croître sur fumarate ou malate. Ceci suggère un transport commun de ces 3 acides dicarboxyliques.

La haute fréquence de réversion ainsi que la capacité des souches DC2 et DC3 à induire la formation de nodules efficaces, suggèrent qu'une simple mutation est à l'origine à la fois de la perte d'activité perméasique et de la capacité des bactéroïdes à réduire l'azote atmosphérique.

La nature du transport du succinate et sa régulation ont été étudiées chez les cellules libres de *R. meliloti* M5N1. Ainsi, la mesure de l'effet des inhibiteurs métaboliques a permis de montrer que le transport du succinate est actif par énergisation de la membrane plasmique.

La perméase au succinate se comporte comme une enzyme Michaelienne, avec une forte affinité pour le substrat.

Le fumarate inhibe compétitivement l'accumulation du succinate et les constantes d'affinité et d'inhibition sont du même ordre de grandeur. Ce résultat confirme l'idée que les 3 acides dicarboxyliques empruntent le même système de transport chez *R. meliloti*.

L'ensemble des résultats permet, d'une part, de proposer les voies possibles de dégradation des substrats carbonés chez **R. meliloti** et, d'autre part, de préciser le rôle de chacun d'eux dans les mécanismes de réduction de l'azote atmosphérique par les bactéroïdes.

