

## Mécanismes Régulateurs dans la Biosynthèse des Enzymes du Métabolisme du Galactose chez *Escherichia coli* K12

### II. Le Déterminisme Génétique de la Régulation

G. BUTTIN

*Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur, Paris, France*

(Received 10 April 1963)

Galactose metabolism in *E. coli* depends upon the activity of three inducible enzymes (galactokinase, transferase and epimerase); the genes controlling the individual activity of these enzymes constitute the chromosomal *Gal* segment. Mutants have been isolated which synthesize constitutively all three enzymes; three of these mutants have been more carefully investigated. In two cases, the mutation has been found to affect a *regulator gene*. The gene is not linked to the *Gal* segment and it maps near the classical "*lysine*" marker on the linkage group of *E. coli*. On the other hand, another constitutive mutation (*O<sup>g</sup>gal*) is cotransducible with the *Gal* segment by  $\lambda$  phage. Recombinational analysis between various *Gal*<sup>-</sup> mutants reveals that, as expected, the mutations which abolish the same enzymic activity map together. The relative order of the *Gal* genes is: kinase, transferase, epimerase. The *O<sup>g</sup>gal* mutation is closely linked to a mutation located in the terminal part of the epimerase gene. The measurement of galactokinase and transferase activities in transduced cells (heterogenetic for the *Gal* genes) clearly indicates that the pleiotropic effect of the *O<sup>g</sup>gal* mutation is limited to the structural determinants located in *cis* position. These results appear to identify the *O<sup>g</sup>gal* mutation as a *constitutive operator mutation* and the *Gal* segment as a typical *operon*. The conclusion is fortified by the observation that the galactokinase and transferase activities are quantitatively coordinated.

Preliminary results strongly support the view that the biosynthesis of the inducible galactose-permease is controlled by the same *regulator gene*, but that this *regulator gene* acts upon a distinct *operator*.

### 1. Introduction

Les trois enzymes qui, chez *E. coli*, gouvernent le métabolisme du galactose: galactokinase, galactose-1-phosphate uridylyltransférase (transférase) et uridine-diphosphoglucose 4-épimérase (épimérase), ainsi que la galactose-perméase, peuvent être induites simultanément par un composé non métabolisable (D-fucose). Cette situation, mise en évidence par les expériences de cinétique d'induction qui ont été décrites dans la première partie de cette étude (Buttin, 1963) suggère que l'inducteur commun agit au niveau d'une unique structure cellulaire stéréo-spécifique. Dans le modèle proposé par Jacob & Monod (1961a) pour interpréter la régulation des biosynthèses protéiques, cette hypothèse permet d'envisager qu'un même répresseur gouverne la synthèse des trois enzymes et de la perméase. L'étude du déterminisme génétique de la régulation est favorable à cette interprétation: nous montrerons que les biosynthèses de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase sont simultanément déréprimées par les mutations d'un même gène régulateur, qui élabore

très vraisemblablement le répresseur de ce système. Des observations préliminaires, que nous discuterons, suggèrent que la biosynthèse de la galactose-perméase est également influencée par l'activité de ce gène régulateur.

Les déterminants qui gouvernent individuellement les activités de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase sont liés: il est établi que la plupart des mutations qui suppriment l'aptitude à utiliser le galactose (mutations *Gal*<sup>-</sup>) affectent un court segment chromosomique (*segment Gal*) que transduit électivement le bactériophage  $\lambda$ . La transduction produit des clones diploïdes pour le segment *Gal* et relativement stables (Morse, Lederberg & Lederberg, 1956*a,b*). Cette propriété a permis de classer les mutants du segment *Gal* en quatre groupes de complémentation fonctionnelle (Lederberg, 1960). La caractérisation biochimique des phénotypes a révélé que trois de ces groupes correspondent respectivement à un défaut d'activité de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase, le quatrième groupe étant composé de mutants défectifs pour l'ensemble des trois activités enzymatiques (Kalckar, Kurahashi & Jordan, 1959; Soffer, 1961).

Des mutations *Gal*<sup>-</sup> extérieures au segment *Gal* sont connues; il a été découvert récemment qu'un certain nombre d'entre elles concernent l'activité de l'uridine-diphosphoglucosepyrophosphorylase.† Plusieurs de ces mutants présentent également une activité réduite ou nulle de la galactokinase: cette manifestation simultanée de deux lésions biochimiques différentes résulte, selon toute vraisemblance d'une mutation secondaire, sélectionnée en raison de la bactériostase que provoque la perte de l'uridine-diphosphoglucosepyrophosphorylase chez les cellules capables de phosphoryler le galactose, et cultivées en présence de ce sucre (Fukasawa, Jokura & Kurahashi, 1962; Sundararajan, Rapin & Kalckar, 1962). Il paraît donc peu douteux que le segment *Gal* contient l'ensemble de l'information génétique relative à la structure des trois protéines galactokinase, transférase et épimérase. Nous avons étudié une mutation de régulation localisée dans ce segment; nous rapportons ici les résultats de cette étude qui a fourni des indications très suggestives sur les conditions dans lesquelles s'effectue la transcription de l'information contenue dans les déterminants qui constituent cette séquence génétique.

## 2. Matériel et Méthodes

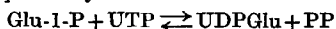
### (a) Souches bactériennes

Ces expériences ont mis en œuvre plusieurs souches à haute fréquence de recombinaison (Hfr): Hfr H (Hayes, 1953); Hfr2 et Hfr4 (Jacob & Wollman, 1957), AT13 (Taylor & Adelberg, 1960), AT11A (Reissig & Wollman, résultats non publiés), U127 (Calef & Licciardello, 1960); YA287 (Beckwith, Pardee, Austrian & Jacob, 1962), et des souches de type sexuel F<sup>-</sup>: *Gal*<sup>-1-2</sup> (Weigle, référence dans Arber, 1958), C600Sr, PA503, P678 (Wollman & Jacob, 1957, et résultats non publiés). Les caractères propres à chaque souche et utilisés comme marqueurs génétiques seront précisés ultérieurement, ainsi que le pedigree des clones que nous avons obtenus à partir de l'une ou l'autre d'entre elles par mutation ou par recombinaison génétique.

### (b) Milieux et conditions de culture

*Cultures en milieux liquides.* Les conditions de culture en milieu minéral synthétique 63 ont été décrites précédemment (Buttin, 1963). Les milieux complets suivants ont été

† L'activité de cette enzyme qui catalyse la réaction:



paraît indispensable à la production de la quantité d'UDPGlu nécessaire à l'amorçage de la réaction de transfert.

également utilisés: bouillon de viande (extrait de viande Liebig 5 g; peptone bactériologique 10 g; NaCl 5 g;  $H_2O$  q.s.p. 1000, pH 7.4 par NaOH). Milieu L: selon Lennox (1955).

*Cultures sur milieux solides.* Les souches étaient conservées sur milieu gélosé complet, à l'exception des mutants dépourvus d'épimérase qui ont été constamment cultivés sur milieu minéral synthétique glucosé. La composition de ces milieux, qui étaient utilisés également pour les étalements, est la suivante. Milieu complet: éléments du milieu liquide bouillon (1 l.) incorporés à 20 g de gélose. Milieu synthétique: éléments du milieu 63 (1 l.) incorporés à 15 g de Difco-agar, auxquels étaient ajoutés les sucres et facteurs de croissance désirés. L'identification rapide des clones aptes ou non à utiliser le galactose était effectuée sur milieu indicateur coloré à l'éosine-bleu de méthylène (milieu EMB-galactose).

#### (c) Détermination des activités enzymatiques

Selon les techniques décrites dans la première partie de cette étude. Pour chaque enzyme, l'unité d'activité adoptée (U) est l'activité qui réalise la conversion de  $1 \mu M$  de substrat spécifique (galactokinase: galactose; transférase: galactose-1-phosphate; épimérase: uridinediphosphogalactose) par heure.

#### (d) Techniques génétiques

*Mutagenèse.* Le rayonnement ultraviolet et l'acide nitreux (Kaudewitz, 1959) ont été utilisés comme agents mutagènes.

*Sélection de mutants auxotrophes.* Des mutants présentant des exigences nutritionnelles variées ont été isolés à partir de la souche constitutive B78A par une technique de contresélection à la pénicilline, adaptée de celle de Davis (1948).

*Isolément de mutants Gal<sup>-</sup>.* Un certain nombre de mutants Gal<sup>-</sup> (dépourvus de galactokinase ou de transférase) ont été isolés sans sélection préalable sur milieu indicateur à l'EMB-galactose, à partir de suspensions ayant subi un traitement mutagène. D'autres mutants Gal<sup>-</sup> ont été isolés en contresélectionnant la souche parentale pendant sa croissance en milieu galactosé, par addition de pénicilline. Les étalements étaient faits sur milieu minéral glucosé et les répliques simultanément sur milieux minéraux glucosé et galactosé, et sur milieu complet à l'EMB-galactose. Un certain nombre de colonies qui ne se développaient pas sur le milieu galactosé avaient également une croissance presque nulle sur le milieu indicateur, où leur présence ne se manifestait que par une empreinte mauve. Ces clones présentaient tous la propriété (caractéristique des mutants dépourvus d'épimérase) de se lyser lors de leur culture en milieu tryptoné galactosé (Yarmolinsky, Wiesmayer, Kalckar & Jordan, 1959; Fukasawa & Nikaido, 1961). La déficience en épimérase a été vérifiée pour deux d'entre eux par mesure directe de l'activité de cette enzyme.

La présence de galactose ( $10^{-2}$  M) inhibe complètement la croissance en milieu minéral glycérociné des mutants dépourvus de transférase lorsqu'ils ont conservé une galactokinase active (Kurahashi & Wahba, 1958); cette propriété a été utilisée pour la sélection secondaire de doubles mutants ne manifestant aucun de ces deux activités enzymatiques. Bien que cet effet bactériostatique du galactose soit très réduit en milieu complet, la sélection de doubles mutants, ne manifestant plus l'activité de la galactokinase, a été constatée dans deux cas au moins, à la suite de réisolements de mutants dépourvus de transférase sur milieu indicateur à l'EMB-galactose.

*Croisements.* Les croisements entre bactéries Hfr (environ  $5 \times 10^7$  bact./ml.) et F<sup>-</sup> ( $10^8$  à  $4 \times 10^8$  bact./ml.) provenant de cultures en phase exponentielle de croissance étaient effectués en milieu complet à 37°C. Dans les expériences où un dénombrement de recombinants était nécessaire, pour chacune des dilutions choisies, deux prélèvements de 0.1 ml. étaient incorporés chacun à un tube d'agar en surfusion (7 g de Bacto-agar Difco/l.) et le contenu du tube était étalé en nappe sur le milieu sélectif choisi. Chaque souche parentale était étalée isolément sur le même milieu afin de vérifier que sa contresélection était effective.

*Isolément de clones hétérologotes.* Les lysats du phage  $\lambda$  transduisant à basse fréquence les caractères Gal<sup>+</sup> ont été obtenus en induisant par les rayons u.v. (Weigle & Delbrück, 1951) le développement de ce prophage dans des souches sauvages préalablement lysogénisées. Ces lysats ont été utilisés pour la transduction de souches Gal<sup>-</sup>. A cette fin, une

goutte de lysat était déposée sur une nappe de bactéries *Gal*<sup>-</sup> étalées à la surface d'une boîte de Petri contenant du milieu EMB-galactose; les clones *Gal*<sup>+</sup> qui se développaient—aisément identifiables sur le milieu indicateur coloré—étaient réisolés trois fois selon la technique décrite par Morse *et al.* (1956a); leur caractère hétérogénote était vérifié par l'observation que ces colonies *Gal*<sup>+</sup> ségrégeaient des clones *Gal*<sup>-</sup>. Deux lysats à haute fréquence de transduction (Morse *et al.*, 1956a) ont été préparés par irradiation de deux clones hétérogénotes; l'un résultait de la transduction de la souche *Gal*<sup>-</sup>(112-21) par un lysat de la souche Hfr H ( $\lambda$ ); l'autre, de la transduction de la souche *Gal*<sup>-</sup>114 par un lysat de la souche H81-2( $\lambda$ ); dans l'un et l'autre cas, les souches réceptrices et les prophages transducteurs sont homogénotes pour un allèle (*O*<sup>+</sup>*gal* ou *O*<sup>-</sup>*gal*) du déterminant transductible *Ogal* (voir texte); toutes les particules transductrices de chaque lysat étaient donc elles-mêmes homogénotes soit pour le caractère *O*<sup>+</sup>*gal*, soit pour le caractère *O*<sup>-</sup>*gal*.

Outre la notation classique: souche X ( $\lambda$ ), désignant une souche lysogénisée par le prophage  $\lambda$ , les notations suivantes seront utilisées:  $\lambda$ *Gal*, particule déficiente du phage  $\lambda$ , transductrice des caractères *Gal*; souche X ( $\lambda$ *Gal*), souche X lysogénisée par le prophage  $\lambda$ *Gal*. Nous conviendrons, dans ces expériences, de désigner par cette dernière notation les clones hétérogénotes utilisés qui, résultant d'une transduction effectuée à haute multiplicité d'infection, étaient en réalité doublement lysogènes, de type ( $\lambda$ ) ( $\lambda$ *Gal*<sup>+</sup>) (Arber, 1958).

### 3. Résultats

#### (a) Isolement et caractérisation de mutants de régulation

Nous avons cherché à créer des conditions expérimentales favorisant la croissance des mutants qui synthétisaient constitutivement l'enzyme ou les enzymes, limitant (s) pour l'utilisation du galactose. Chaque fois que de telles conditions ont été réalisées, il s'est avéré possible d'isoler des mutants synthétisant constitutivement la galactokinase. Comme nous le montrerons, la biosynthèse des autres enzymes spécifiquement impliqués dans le métabolisme de ce sucre était également déréprimée chez ces mutants.

#### Méthodes permettant l'isolement et l'identification de clones "constitutifs"

(i) *Cultures alternées en milieux glucosé et galactosé.* Cette technique exploite l'avantage que représente la suppression de la latence de "diauxie" introduite dans la croissance des souches inductibles sauvages par le transfert des cellules d'un milieu glucosé à un milieu galactosé (Monod, 1942; Cohen-Bazire & Jolit, 1953). Des mutants constitutifs ont été isolés à partir de diverses souches. Les cultures provenant d'un inoculum soumis à un traitement mutagène étaient diluées matin et soir au 1/40e en milieu synthétique alternativement galactosé ou glucosé. L'activité de la galactokinase dans les suspensions en milieu glucosé était mesurée de dix en dix passages environ. Les cultures dans lesquelles cette activité était largement supérieure à celle d'une culture-témoin en même milieu étaient étalées sur milieu gélosé solide et l'activité de l'enzyme était déterminée dans quelques clones. Appliquée à des souches à haute fréquence de recombinaison, ou à des souches multiplement "marquées" par des exigences nutritionnelles, une telle technique ne permet que très exceptionnellement la perpétuation de ces caractères contre-sélectionnés.

(ii) *Cultures en présence d'un inhibiteur de l'induction.* La propriété (décrite dans la première partie de cette étude) que manifeste le TMG<sup>†</sup> d'inhiber l'induction des

<sup>†</sup> Abréviations: TMG = thiométhyl  $\beta$ -D-galactoside. Les abréviations conventionnelles relatives aux caractères utilisés comme marqueurs génétiques sont rappelées en légende du Tableau 2.

enzymes d'utilisation du galactose, sans être utilisable en tant que source énergétique, a été mise à profit pour l'isolement de mutants constitutifs.

Dans ces expériences, un inoculum de 0.1 ml. d'une suspension de bactéries préalablement exposées à l'acide nitreux naissant était ensemencé dans 10 ml. de milieu minéral galactosé (1 g/l.) contenant du TMG ( $10^{-2}$  M) et les facteurs de croissance indispensables; le galactose était renouvelé une ou deux fois après épuisement; la suspension diluée était alors étalée sur milieu gélosé synthétique contenant du galactose (4 g/l.) et du TMG ( $2 \times 10^{-2}$  M). Deux types morphologiques de colonies se développent habituellement dans ces conditions: des colonies de taille réduite, correspondant à la fraction inductible de la population et des colonies de taille très nettement supérieure chez lesquelles la détermination directe de l'activité de la galactokinase a régulièrement révélé une synthèse constitutive de cette enzyme.

(iii) *Test physiologique de discrimination entre colonies inductibles et constitutives.* L'observation d'une différence morphologique entre les colonies formées par les cellules inductibles et celles qui correspondaient aux mutants constitutifs a suggéré qu'un test simple de croissance sur milieu solide pourrait, moyennant certaines précautions, aider à suivre la ségrégation du gène muté au cours de croisements entre souches sauvages et constitutives. Ceci suppose que la signification du test ne soit pas altérée lorsque tous les recombinants d'un même croisement ne sont pas isogéniques pour certains caractères utilisés comme "marqueurs". Comme on peut le prévoir, la présence des "marqueurs" correspondant à des exigences nutritionnelles (satisfaites par l'adjonction au milieu des facteurs de croissance correspondants) n'affecte pratiquement pas l'inhibition par le TMG des souches inductibles. Par contre le défaut d'activité de la  $\beta$ -galactoside-perméase (symbole génétique:  $y^-$ ) est susceptible de brouiller les résultats du test physiologique de croissance: il est apparu en effet que le TMG inhibe la croissance d'une classe de recombinants constitutifs (correspondant à la mutation *O<sub>2</sub>gal*) lorsqu'ils sont de caractère  $y^-$ . Ce phénomène sera discuté au paragraphe (d), Déterminisme génétique de la biosynthèse de galactose-perméase. Pour cette raison, les recombinants soumis au test de croissance étaient en général de caractère  $y^+$ , soit parce que les souches parentales étaient isogéniques pour ce caractère, soit parce que la sélection choisie éliminait les recombinants  $y^-$ . La validité du test de croissance était constamment vérifiée par la détermination directe de l'activité de la galactokinase dans une fraction des colonies. L'incorporation de TMG  $2 \times 10^{-2}$  M à un milieu galactosé (4 g/l.) a permis une discrimination sans ambiguïté entre recombinants inductibles et constitutifs. Les colonies testées étaient repiquées, à partir d'un milieu glucosé, assurant la répression maximale des enzymes inductibles, sur un milieu de cette composition et, à titre de témoin sur le même milieu galactosé, ne contenant pas de TMG. La croissance était comparée après 20 heures d'incubation à 37°C. Dans ces conditions, la croissance sur milieu "TMG-galactose" des colonies inductibles, pourvues ou non de  $\beta$ -galactoside-perméase, est très réduite alors que la croissance des colonies constitutives  $y^+$  est équivalente ou supérieure à celle que manifestent ces cellules sur le milieu galactosé.

*Propriétés communes aux souches constitutives étudiées (B78 A, 112-1, H81-2)*

(i) Les mutants de régulation que nous avons isolés ont tous été caractérisés initialement par une activité basale élevée de la galactokinase. Les synthèses de transférase et d'épimérase sont également dérégimées dans ces cellules: chaque fois qu'elles ont été déterminées, chez des mutants sélectionnés par l'une ou l'autre des

techniques précédemment décrites, les activités de la transférase et de l'épimérase sont apparues de 10 à 25 fois plus élevées que chez la souche inductible parentale, ce qui représente un accroissement d'activité semblable à celui de la galactokinase elle-même.

(ii) L'adjonction d'inducteur n'élève que faiblement le taux de synthèse de la galactokinase chez ces mutants. Au terme de plusieurs doublements effectués en sa présence, l'inducteur le plus efficace (D-fucose) accroît l'activité de l'enzyme de 20% à 40% selon la souche constitutive (Tableau 1). Chez aucun des 7 mutants

TABLEAU 1

*Activité des enzymes du métabolisme du galactose chez une souche inductible (Hfr H) et chez différents mutants constitutifs*

Souche	Parent	Activité galactokinase† (U/mg)			Activité† transférase (U/mg)	Activité† épimérase (U/mg)
		Glycérol	+ Fucose (10 <sup>-3</sup> M)	+ TMG (2 × 10 <sup>-3</sup> M)	Glycérol	Glycérol
Hfr H	—	0.9	13.6	—	0.6	5.8
H81-2	Hfr H	19.0	22.0	14.0	12.2	90.0
B78A	C600Sr	12.6	16.4	10.5	9.2	48.0
112-1	AT13	7.8	13.2	7.0	5.9	—

† Activités de suspensions en croissance en milieu minéral au glycérol (*Glycérol*). L'inducteur (D-fucose) et l'inhibiteur de l'induction (TMG) étaient présents pendant au moins 5 doublements précédant le prélèvement.

constitutifs que nous avons étudiés de ce point de vue, l'activité maximale de la galactokinase n'était plus de 30 fois supérieure à l'activité de base de la souche parentale.

(iii) La synthèse de galactokinase, chez les mutants constitutifs, présente une sensibilité très réduite à l'égard des inhibiteurs de l'induction. Cette propriété, vérifiée par les déterminations d'activité de la galactokinase effectuées dans des cellules précultivées en présence de TMG (Tableau 1), est évidemment prévisible dans le cas des souches constitutives H81-2 et 112-1 qui ont été isolées en présence de ce composé. Elle se révèle commune aux différentes souches isolées par la technique des cultures alternées, dont la croissance s'effectue normalement sur milieu "TMG-galactose" dans les conditions précédemment décrites.

Les propriétés physiologiques qui ont permis la sélection de ces diverses souches traduisent donc l'aptitude à synthétiser constitutivement les trois enzymes galactokinase, transférase et épimérase. La localisation des mutations correspondantes révèle que ce phénotype commun peut résulter d'une altération génétique au niveau de l'un ou de l'autre de deux loci chromosomiques distincts.

#### (b) Localisation et caractérisation d'un gène régulateur extérieur au segment Gal

Les mutations qui rendent constitutives les souches F<sup>-</sup> B78 A et Hfr112-1 concernent un gène à effet régulateur pléiotrope, distinct des déterminants structuraux des trois enzymes. Ce déterminant que nous noterons *Rgal* a été localisé sur le chromosome bactérien.

(i) *Analyse des produits des croisements entre bactéries  $F^-$  constitutives et bactéries Hfr portant l'allèle sauvage du gène régulateur.*

(a) Nous avons isolé un mutant (B106-1) dépourvu de galactokinase ( $K^-$ ) à partir de la souche constitutive streptomycino-résistante ( $Sm^r$ )  $F^-$  B78 A. La localisation de la mutation  $K^-$  au niveau du segment *Gal* a été vérifiée par l'aptitude que présente la souche B106-1 à être complétée pour l'utilisation du galactose par les particules transductrices d'un lysat du phage  $\lambda$ , issus d'une souche lysogène sauvage  $Gal^+$  (particules  $\lambda Gal^+$ ). Ce mutant a été croisé avec la souche Hfr H, streptomycinosensible ( $Sm^s$ ). Le déterminant  $K^+$  du parent inductible est transféré à haute fréquence dans ce croisement. L'activité de la galactokinase a été mesurée chez six recombinants  $K^+ Sm^r$  ayant reçu le caractère  $K^+$  de la souche parentale inductible: tous synthétisaient constitutivement cette enzyme. Ce résultat suffit à exclure la possibilité d'une liaison étroite entre les déterminants du segment *Gal* et le gène *Rgal*.

(b) La ségrégation du caractère *Rgal* a été suivie au cours de plusieurs séries de croisements réalisées entre différentes souches Hfr  $R^+gal$ , capables chacune de transférer à haute fréquence un segment particulier du matériel génétique (Fig. 1),

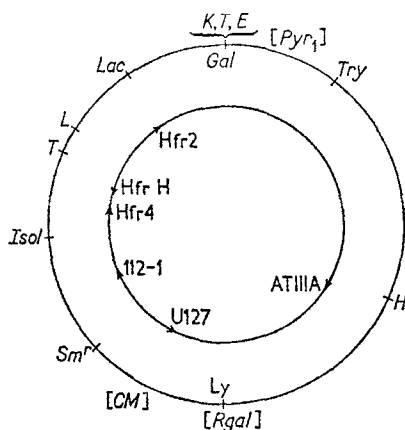


FIG. 1. Représentation schématique du "chromosome" d'*E. coli* K12 (d'après Jacob & Wollman, 1961). Les flèches indiquent la polarité du transfert ainsi que l'origine des segments génétiques transférés par les différentes souches Hfr. Abréviations:  $K$  = galactokinase;  $T$  = transférase;  $E$  = épimérase. Autres abréviations: voir légende du Tableau 2.

et des souches  $R^-gal$  de type sexuel  $F^-$ , toutes issues de B78 A et caractérisées par des exigences nutritionnelles différentes (voir Matériel et Méthodes), correspondant elles-mêmes à des mutations localisées en des points variés du chromosome d'*E. coli*. Au terme des croisements, les bactéries étaient étalées sur un milieu synthétique gélosé de composition telle que soient sélectionnés les seuls recombinants ayant reçu du mâle un caractère déterminé. Si, à l'occasion d'une des sélections opérées, l'allèle  $R^+gal$  est très fortement lié au caractère sélectionné transmis par le parent Hfr, il sera lui-même transféré à la quasi-totalité des recombinants; il ne sera au contraire transféré qu'à une fréquence moyenne si sa liaison est faible, et pratiquement jamais si le déterminant qui lui correspond est localisé sur un segment du chromosome qui n'est lui-même transmis qu'exceptionnellement par cette souche Hfr. La mise en

TABLEAU 2

Croisements entre souches *Hfr*  $R^{+}gal$  et  $F^{-}$   $R^{-}gal$ 

190

<i>Hfr</i> $R^{+}gal$	$F^{-}$ $R^{-}gal$ †	Milieu sélectif‡	Caractères sélectionnés		Durée du croisement (min)	Recombinants		% de recombinants $R^{+}gal$
			<i>Hfr</i>	$F^{-}$		Etudiés	$R^{+}gal$	
<i>Hfr</i> 4 ( $T^{-}L^{-}Lac^{-1}Sm^{s}$ )§	179-17 ( $\lambda$ ) ( $Ly-Sm^{r}$ )	<i>LacSm</i>	<i>Ly</i> <sup>+</sup>		110	64	63	> 98
	179-23 ( $\lambda$ ) ( $H-Sm^{r}$ )		<i>H</i> <sup>+</sup>			64	9	14
	179-58 ( $\lambda$ )¶ ( $CM-Sm^{r}$ )		<i>CM</i> <sup>+</sup>	$Lac^{+}T^{+}L^{+}Sm^{r}$		64	42	66
	176-66 ( $\lambda$ ) ( <i>Isol</i> - $Sm^{r}$ )		<i>Isol</i> <sup>+</sup>			64	1	< 2
U127 ( $P^{-}$ )	B78 A-66 ( $Isol-L^{-}Lac^{-1}Sm^{r}$ )	<i>GL</i>	<i>Isol</i> <sup>+</sup>	<i>P</i> <sup>+</sup>	50	60	0	< 2
AT111A	B78 A-23 ( $H^{-}L^{-}Lac^{-1}Sm^{r}$ )	<i>GLSm</i>	<i>H</i> <sup>+</sup>	<i>Sm</i> <sup>r</sup>	90	62	0	< 2
<i>Hfr</i> 2 ( $M^{-}$ )	B78 A ( $\lambda$ ) ( $Lac^{-1}L^{-}Sm^{r}$ )	<i>GMSm</i>	<i>L</i> <sup>+</sup>	<i>Sm</i> <sup>r</sup>	80	60	0	< 2
	B170 A ( $\lambda$ ) ( $Lac^{-1}L^{-}Gal-Sm^{r}$ )	<i>GalSmTLM</i>	<i>Gal</i> <sup>+</sup>	<i>Sm</i> <sup>r</sup>	120	62	3	5
<i>Hfr</i> H	B78 A ( $Lac^{-1}L^{-}Sm^{r}$ )	<i>GSm</i>	<i>L</i> <sup>+</sup>	<i>Sm</i> <sup>r</sup>	65	152	0	< 1

G. BUTTIN

† Les souches B78 A-66, B78 A-23 sont des mutants auxotrophes de la souche B78 A ( $R^{-}galL^{-}Lac^{-1}Sm^{r}$ ). Les souches de la série 179 (179-66, 179-23, 179-17, 179-58) sont des recombinants  $L^{+}Lac^{+}Sm^{r}$  issus de croisements entre *Hfr* H et les mutants auxotrophes de la série précédente. Ces souches ont été lysogénisées par le prophage  $\lambda$  afin que leur croisement avec des *Hfr* lysogènes ne provoque pas d'induction zygotique (Wollman & Jacob, 1957). La souche B170 A est un double mutant  $K^{-}T^{-}$  isolé en deux étapes à partir de B78 A.

‡ De la thiamine, indispensable à la croissance des souches utilisées, était incorporée systématiquement à tous les milieux synthétiques.

§ Le marqueur  $Lac^{-1}$  correspond au caractère  $y^{-}$ .

|| Abréviations: *T* = thréonine; *L* = leucine; *M* = méthionine; *Ly* = lysine; *H* = histidine; *CM* = cystéine ou méthionine; *Isol* = isoleucine; *P* = proline; *Arg* = arginine; *Try* = tryptophane; *Pyr* = pyrimidines; *G* = glucose; *Gal* = galactose; *Lac* = lactose; *Sm* = streptomycine. Dans la définition du génotype d'une souche les mêmes abréviations désignent l'aptitude (+) ou l'inaptitude (−) à synthétiser le métabolite ou à utiliser le sucre correspondant. La sensibilité et la résistance à la streptomycine sont notées respectivement:  $Sm^{s}$  et  $Sm^{r}$ . Dans les milieux sélectifs, les aminoacides étaient incorporés à raison de 0.1 g/l., les sucres à raison de 6 g/l. et la streptomycine à raison de 0.5 g/l. de sulfate de streptomycine.

¶ La localisation du marqueur  $C_M$  est incertaine.



évidence d'une forte liaison entre l'allèle  $R^+gal$  et l'un des "marqueurs" utilisés dans ces sélections peut donc conduire à la localisation du déterminant  $Rgal$  sur le chromosome bactérien.

Les résultats (Tableau 2) les plus significatifs sont ceux qu'a fourni le croisement entre Hfr4, de génotype  $Lac^{-1}T^{-}L^{-}R^+gal\ Ly^+Sm^s$  et la souche  $F^{-}179-17(\lambda)$  de génotype  $Lac^{+}T^{+}L^{+}R^{-}gal\ Ly^{-}Sm^r$ . Les recombinants étaient sélectionnés par leur aptitude à se développer sur milieu lactosé en présence de streptomycine. Sur 60 recombinants ayant le caractère  $Ly^{+}$ , 59 étaient inductibles. Il existe donc une liaison très forte entre le déterminant  $Rgal$  et le locus  $Ly$ . La localisation du gène  $Rgal$  sur cette partie du chromosome bactérien est confirmée par les résultats négatifs concordants des divers croisements mettant en œuvre soit ce même Hfr et des souches  $F^{-}$  différemment marquées, soit d'autres souches Hfr.

(ii) *Identité du déterminant muté chez les souches B78 A et 112-1*

Les mutations qui dérèpriment la synthèse des trois enzymes chez les souches B78A et 112-1 affectent le même déterminant génétique  $Rgal$ . Cette conclusion paraît imposée par le résultat des expériences suivantes.

TABLEAU 3

*Croisements entre Hfr 112-1 et souches  $F^{-}R^{-}gal$  et  $F^{-}R^{+}gal$*

Souche $F^{-}\dagger$	Génotype	Milieu sélectif	Caractères sélectionnés†		Recombinants		% constitutifs
			Hfr	$F^{-}$	Etudiés	Constitutifs	
179-23 ( $\lambda$ )	$H^{-}Sm^rR^{-}gal$	$GalSm$	$H^{+}$	$T^{+}L^{+}$	62	62	100
179-17 ( $\lambda$ )	$Ly^{-}Sm^rR^{-}gal$	$GalSm$	$Ly^{+}$	$T^{+}L^{+}$	62	62	100
82-A	$Arg^{-2}Ly^{-}H^{-}Sm^r(\lambda)R^{+}gal$	$LacSmArgH$	$Ly^{+}$	$T^{+}L^{+}Lac^{+}$	60	60	100
82-A		$LacSmArgLy$	$H^{+}$	$T^{+}L^{+}Lac^{+}$	56	22‡	39

† La souche Hfr 112-1 est un mutant constitutif isolé sur AT13 de génotype  $T^{-}L^{-}Lac^{-1}Sm^r(\lambda)$ . La souche 82-A est un recombinant  $P^{+}Gal^{+}Arg^{-2}Ly^{-}H^{-}Sm^r$  issu du croisement de Hfr H avec  $F^{-}PA503(P^{-}Gal^{-2}Arg^{-2}Ly^{-}H^{-}Sm^r)$ . L'origine des souches 179-23 ( $\lambda$ ) et 179-17 ( $\lambda$ ) est décrite en légende du Tableau 2.

‡ Les 22 recombinants constitutifs se dénombraient tous parmi les 25 recombinants (sur 56) ayant reçu simultanément le caractère  $Ly^{+}$ .

(a) Si l'on transfère le déterminant correspondant au caractère  $Ly^{+}$  de la souche constitutive Hfr112-1 à la souche constitutive  $F^{-}179-17(\lambda)$  de génotype  $Ly^{-}R^{-}gal$ , les recombinants sélectionnés pour le caractère  $Ly^{-}$  sont tous de type constitutif (Tableau 3). Or, comme nous venons de le montrer, en raison de la liaison des déterminants  $Rgal$  et  $Ly$ , la sélection du caractère  $Ly^{+}$  s'accompagne presque toujours de la substitution de l'allèle  $Rgal$  porté par le parent Hfr à l'allèle  $R^{-}gal$  de la souche réceptrice; si la mutation constitutive affectait chez 112-1 un déterminant  $rgal$  ayant une localisation différente de  $Rgal$  (génotype de 112-1:  $r^{-}gal\ R^{+}gal$ ; génotype de 179-17 ( $\lambda$ ):  $r^{+}gal\ R^{-}gal$ ) on devrait observer une ségrégation du caractère  $r^{-}gal$  parmi les recombinants de ce croisement qui seraient presque tous soit de génotype  $r^{-}gal\ R^{+}gal\ Ly^{+}$ , soit de génotype  $r^{+}gal\ R^{+}gal\ Ly^{+}$ . Des recombinants  $r^{+}gal\ R^{+}gal\ Ly^{+}$  ayant le génotype sauvage devraient être décelés comme clones inductibles. Le fait

que cette situation ne s'observe pas suggère que les déterminants *rgal* et *Rgal* sont identiques.

(b) Le degré de liaison entre le déterminant *rgal* muté chez la souche 112-1 et le marqueur *Ly* peut être estimé directement en effectuant le croisement: Hfr *r<sup>-</sup>gal Ly<sup>+</sup>* × F<sup>-</sup> *r<sup>+</sup>gal Ly<sup>-</sup>*, inverse de celui qui a permis la localisation de *Rgal* chez la souche B78A (Hfr *R<sup>+</sup>gal Ly<sup>+</sup>* × F<sup>-</sup> *R<sup>-</sup>gal Ly<sup>-</sup>*). Cette expérience a été réalisée en utilisant une souche F<sup>-</sup> inductible de génotype *Arg<sup>-2</sup> H<sup>-</sup>Ly<sup>-</sup>*. Les résultats rapportés dans le Tableau 3 indiquent que le déterminant dont la mutation rend la souche 112-1 constitutive est aussi lié au marqueur *Ly* que l'était le déterminant *Rgal* précédemment défini. Il est donc peu douteux que les mutations caractérisant les souches B78A et 112-1 affectent un même gène.

Ce gène distinct des déterminants qui gouvernent la structure des trois enzymes assurant la conversion du galactose a cependant un effet régulateur spécifique et simultané sur la biosynthèse de ces protéines. Son action suppose une médiation extrachromosomique:

(a) Elle réprime dans les cellules sauvages l'expression de déterminants structuraux qui ne sont pas contigus à ce gène.

(b) Dans des cellules partiellement diploïdes, elle est efficace sur des déterminants appartenant à la structure chromosomique située en position "trans", comme le montrent les résultats rapportés dans le Tableau 4. Dans l'expérience correspondante,

TABLEAU 4

*Expression du gène K<sup>+</sup> issu d'une souche inductible dans des bactéries hétérogénètes R<sup>+</sup>gal (B34-5) et R<sup>-</sup>gal (B106-1)*

Souche	Activité galactokinase (U/mg)		Taux d'induction
	Non induit	Induit (Fucose 10 <sup>-3</sup> M)	
B34-5 ( <i>λGal<sup>+</sup></i> )	1.0	14.0	14.0
B106-1 ( <i>λGal<sup>+</sup></i> )	8.0	11.2	1.4

les déterminants *Gal* issus d'une souche sauvage inductible ont été transduits simultanément chez un mutant *K<sup>-</sup>* (B106-1) de la souche constitutive B78 A et chez un mutant *K<sup>-</sup>* isolé à partir d'une souche inductible (B34-5). Il est clair que l'expression du déterminant *K* actif—intégré dans le génome viral, comme en témoignait la ségrégation de cellules *Gal<sup>-</sup>* par l'un et l'autre clone hétérogénète—est quantitativement gouvernée par la nature de l'allèle *Rgal* présent dans la souche réceptrice.

La situation ainsi mise en évidence suggère très fortement que le gène *Rgal* est le "gène régulateur"—au sens de Jacob & Monod (1961a)—dont l'allèle sauvage élabore le répresseur cytoplasmique spécifique qui gouverne la transcription de l'information contenue dans les déterminants constituant le segment *Gal*. Les propriétés reconnues ne permettent pas, il est vrai, d'exclure formellement l'hypothèse opposée selon laquelle ce gène déterminerait la biosynthèse d'une enzyme qui inactiverait un composé endogène doué de propriétés inductrices; l'inducteur interne s'accumulerait chez les mutants constitutifs. Toutefois cette hypothèse paraît très peu probable: lorsqu'un phénomène d'induction interne a été clairement mis en évidence chez certains mutants d'utilisation du galactose (mutants dépourvus de galactokinase) l'effet de cet inducteur, comme on devait s'y attendre, était annulé par l'addition

d'un inhibiteur spécifique de l'induction (Yarmolinsky, Jordan & Wiesmayer, 1961). Le fait que ce même inhibiteur (TMG) soit sans action chez les souches *R<sup>-</sup>gal* permet de penser que, chez ces mutants, la dérégulation des synthèses enzymatiques ne résulte pas d'une induction interne mais plus probablement d'une altération dans la structure d'un répresseur spécifique.

(c) *L'opéron "Galactose"*

(i) *Mise en évidence d'un opérateur de régulation spécifique du segment Gal*

La mutation constitutive définissant la souche Hfr H81-2 est distincte par certaines de ses propriétés comme par sa localisation des mutations constitutives précédentes.

TABLEAU 5

*Phénotype enzymatique de divers mutants Gal<sup>-</sup>*

Mutant	Parent	Activités enzymatiques† (U/mg)					
		Galactokinase		Transférase		Epimérase	
		Non induit	Induit	Non induit	Induit	Non induit	Induit
Hfr114	Hfr H81-2	<0.05	<0.05	13.4	12.0	95	-†
Hfr122-B		22.5	—	<0.1	<0.1	94	—
Hfr138-1	Hfr H	<0.1	<0.1	6.5	6.9	—	+
Hfr112-19		<0.05	<0.05	0.7	7.3	—	+
Hfr138-10		0.6	9.3	<0.1	<0.2	6	67
Hfr112-21		—	8.8	<0.1	<0.1	—	+
Hfr PL2		0.7	11.6	0.4	5.8	—	<1
Hfr PL5		—	6.2	—	8.0	—	<1

† Activités de suspensions en croissance en milieu au glycérol; inducteur éventuel: D-fucose ( $5 \times 10^{-4}$  M à  $10^{-3}$  M).

‡ Non mesuré: le signe + dans la colonne *activité de l'epimérase* indique que les souches correspondantes sont complémentables, pour l'utilisation du galactose, par les particules  $\lambda$ Gal- issues de la souche lysogène PL2 ( $\lambda$ ), dépourvue de l'activité de l'epimérase.

(a) Cette mutation, que nous noterons *O<sup>-</sup>gal* (la désignation sera justifiée ultérieurement), affecte un déterminant du segment *Gal*: lorsqu'on sélectionne les recombinants possédant les caractères *Gal<sup>+</sup>Sm<sup>r</sup>* issus d'un croisement entre la souche constitutive Hfr H81-2 de génotype *Gal<sup>+</sup>O<sup>-</sup>gal Sm<sup>s</sup>* et la souche inducible *F<sup>-</sup>Gal<sup>-1-2</sup>Sm<sup>r</sup>* de génotype *Gal<sup>-</sup>(K<sup>-</sup>T<sup>-</sup>)O<sup>+</sup>gal Sm<sup>r</sup>*, ceux-ci sont invariablement constitutifs (30/30 colonies analysées pour ce caractère).

La souche H81-2 a été lysogénisée par le prophage  $\lambda$  et un lysat préparé à partir d'un clone constitutif H81-2 ( $\lambda$ ) a été utilisé pour transduire divers mutants *K<sup>-</sup>(Gal<sup>-1-2</sup>Sm<sup>r</sup>, 112-19)*: la galactokinase est synthétisée constitutivement dans les souches hétérogénètes. La mutation est donc cotransductible avec le caractère *K<sup>+</sup>* par le phage  $\lambda$  et elle est dominante. Les expériences suivantes précisent cette notion.

(b) Plusieurs mutants *K<sup>-</sup>* et *T<sup>-</sup>* ont été isolés à partir de cette souche: celles des enzymes dont l'activité n'est pas spécifiquement supprimée par ces mutations demeurent constitutives (Tableau 5).

La transduction de ces mutants, et des mutants *Gal*<sup>-</sup> isolés à partir de la souche inductible parentale Hfr H (Tableau 5), par des particules transductrices  $\lambda$ *Gal*<sup>+</sup>*O*<sup>+</sup>*gal* et  $\lambda$ *Gal*<sup>+</sup>*O*<sup>c</sup>*gal* permet d'analyser les relations de dominance entre la mutation *O*<sup>c</sup>*gal* et son allèle sauvage *O*<sup>+</sup>*gal*. Les activités de la galactokinase et de la transférase ont été mesurées dans des clones hétérogénètes réalisant des combinaisons génétiques variées, cultivés en présence et en absence d'inducteur (Tableau 6).

TABLEAU 6  
*Activité de la galactokinase et de la transférase chez divers clones haploïdes et hétérogénètes*

Souches§	Génotype	Galactokinase†			Transférase††		
		Activité (U/mg)		Taux d'induction	Activité (U/mg)		Taux d'induction
		Non induit	Induit		Non induit	Induit	
Hfr H	<i>K</i> <sup>+</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>+</sup>	0.9	13.6	15.0	0.6	9.7	16.0
H81-2	<i>K</i> <sup>+</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>c</sup>	21.7	25.0	1.1	14.7	—	—
112-19	<i>K</i> <sup>-</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>+</sup>	< 0.05	< 0.05	—	0.7	7.3	10.0
114	<i>K</i> <sup>-</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>c</sup>	< 0.05	< 0.05	—	13.4	12.0	0.9
122-B	<i>K</i> <sup>+</sup> <i>T</i> <sup>-</sup> <i>O</i> <sup>c</sup>	22.5	—	—	< 0.1	< 0.1	—
112-19 ( $\lambda$ <i>Gal</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>c</sup> )	<i>K</i> <sup>+</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>c</sup> <i>K</i> <sup>-</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>+</sup>	22.4	21.0	0.9	9.4	23.5	2.5
122-B ( $\lambda$ <i>Gal</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>+</sup> )	<i>K</i> <sup>+</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>+</sup> <i>K</i> <sup>+</sup> <i>T</i> <sup>-</sup> <i>O</i> <sup>c</sup>	19.8	26.5	1.3	0.4	5.9	15.0
114 ( $\lambda$ <i>Gal</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>+</sup> )	<i>K</i> <sup>+</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>+</sup> <i>K</i> <sup>-</sup> <i>T</i> <sup>+</sup> <i>O</i> <sup>c</sup>	1.9	17.0	9.0	16.0	20.4	1.3

† Activités de suspensions en croissance en milieu au glycérol; les cultures induites ont effectué plus de 5 doublements en présence de D-fucose 10<sup>-3</sup> M. Les activités ont été mesurées après extraction par traitement sonique. Pour les clones diploïdes, elles sont exprimées en U/mg de bactéries de phénotype *Gal*<sup>+</sup> (les bactéries *Gal*<sup>-</sup> ségréguées, généralement peu nombreuses, étaient dénombrées sur milieu EMB-galactose).

‡ Les valeurs absolues de l'activité de cette enzyme, rapportées dans une précédente publication, étaient plus faibles en raison des conditions différentes du dosage (extraction, concentration des substrats).

§ En ce qui concerne les clones hétérogénètes, des déterminations analogues d'activité ont été faites chez 4 clones de chaque génotype avec des résultats semblables, à l'exception d'un clone 122-B ( $\lambda$  *Gal*<sup>+</sup>*O*<sup>+</sup>*gal*) chez qui la galactokinase a été trouvée entièrement inductible, et qui représente selon tout vraisemblance un recombinant homogénète pour le caractère *O*<sup>+</sup>*gal*.

Les déterminants *K*<sup>+</sup> et *T*<sup>+</sup> appartenant à une structure chromosomique affectée par la mutation *O*<sup>c</sup>*gal* s'expriment constitutivement (exemple: déterminant *K*, clone 122-B ( $\lambda$  *Gal*<sup>+</sup>*O*<sup>+</sup>*gal*)). Cette propriété, comme cela a déjà été mentionné, concerne les déterminants *Gal* intégrés dans le génome phagique au même titre que les déterminants *Gal* appartenant au génome de la souche réceptrice (exemple: déterminant *K*, clone 112-19 ( $\lambda$  *Gal*<sup>+</sup>*O*<sup>c</sup>*gal*)).

L'expression complète des déterminants *K*<sup>+</sup> et *T*<sup>+</sup> qui appartiennent à une structure génétique ayant conservé l'allèle *O*<sup>+</sup>*gal* ne s'observe que sous l'effet d'un inducteur. Ceci apparaît nettement chaque fois que le déterminant homologue en liaison structurale avec l'allèle *O*<sup>c</sup>*gal* est déficient.

L'effet dominant de la mutation *Ogal* est donc restreint à l'expression des déterminants situés en position "cis" par rapport à celui qu'elle affecte. Elle n'exige de ce fait, semble-t-il, aucune médiation extrachromosomique. L'expression des gènes *Gal* appartenant à la même structure chromosomique est entièrement déréprimée dans des complexes génétiques où la présence du répresseur spécifique demeure perceptible; de tels effets ne paraissent imputables qu'à la mutation d'un "opérateur de régulation" commun aux déterminants structuraux des trois protéines. Cette interprétation suppose évidemment que les propriétés caractéristiques des mutants *Ogal* résultent d'une mutation unique. Il était très peu probable *a priori* que la technique de sélection utilisée ait permis l'isolement d'un clone ayant accumulé successivement trois mutations indépendantes, alors que, vraisemblablement, seule une activité constitutive de l'ensemble de la chaîne conférerait à un mutant un avantage physiologique important; cette interprétation a été vérifiée directement par la localisation de la mutation *Ogal* par rapport aux déterminants du segment *Gal*.

## (ii) Analyse génétique du segment *Gal*

Cette localisation a été possible au terme de l'étude de la ségrégation du caractère *Ogal* parmi les recombinants *Gal*<sup>+</sup> issus de croisements qui mettaient en œuvre deux à deux, divers mutants *Gal*<sup>-</sup> portant l'un la mutation *Ogal*, l'autre l'allèle inductible *O<sup>+</sup>gal*. L'ordre relatif des gènes de structure *K*, *T* et *E* a été au préalable établi; dans ce but, des mutants *Gal*-*O<sup>+</sup>gal* appartenant aux trois types structuraux ont été croisés entre eux: la confrontation des fréquences de recombinaison restaurant le phénotype *Gal*<sup>+</sup>, dénombrées au cours de ces croisements, a permis de construire une carte génétique très élémentaire du segment *Gal*.

(a) *Localisation des déterminants K, T, E*. Les mutants ont été isolés sur Hfr H. Leur phénotype biochimique était déterminé par mesure des activités enzymatiques (Tableau 5). Les souches F<sup>-</sup> *Gal*<sup>-</sup> étaient marquées par les caractères *Pyr*<sub>1</sub><sup>-</sup> et *Sm*<sup>r</sup>. Le déterminant *Pyr*<sub>1</sub> (gouvernant l'aptitude à synthétiser les bases pyrimidiques) est voisin de *Gal* et distal par rapport à celui-ci pour l'ordre de transfert génétique propre à l'Hfr H. Les souches F<sup>-</sup> de génotype *Gal*-*Pyr*<sub>1</sub><sup>-</sup>*Sm*<sup>r</sup> étaient obtenues à la suite du croisement de chaque mutant *Gal*<sup>-</sup> avec une souche (D140-1†) de génotype *Gal*<sup>+</sup>*Pyr*<sub>1</sub><sup>+</sup>*Sm*<sup>r</sup>. La disjonction des caractères *Pyr*<sub>1</sub> et *Gal*, et la ségrégation en tant que cellules isolées des recombinants portant les caractères négatifs *Pyr*<sub>1</sub><sup>-</sup>*Gal*<sup>-</sup> étaient obtenues en interrompant les croisements après 30 minutes de contact par dilution au 1/50e en même milieu, et en laissant se poursuivre les divisions pendant 120 minutes. Les bactéries étaient étalées sur milieu indicateur à l'EMB-galactose, additionné de streptomycine; un certain nombre de recombinants *Gal*-*Sm*<sup>r</sup> étaient alors testés par répliques pour le caractère *Pyr*<sub>1</sub><sup>-</sup>. Les bactéries dépourvues d'épimérase ne se développant pas sur le milieu indicateur, les produits des croisements mettant en œuvre ces mutants étaient étalés sur milieu glucosé additionné d'uracile et de streptomycine, et les caractères *Gal*<sup>-</sup> et *Pyr*<sub>1</sub><sup>-</sup> étaient testés par répliques simultanées d'un nombre suffisant de colonies sur milieu galactosé contenant de l'uracile et sur milieu glucosé dépourvu de ce facteur.

† La souche D140-1 avait été sélectionnée après croisement de l'Hfr YA287 avec la souche F<sup>-</sup>C600Sr (*T*<sup>-</sup>*L*<sup>-</sup>*Lac*<sup>-</sup>*Pyr*<sub>1</sub><sup>+</sup>*Sm*<sup>r</sup>) en tant que recombinant *T*<sup>+</sup>*L*<sup>+</sup>*Lac*<sup>+</sup>*Pyr*<sub>1</sub><sup>+</sup>*Sm*<sup>r</sup>. La souche Hfr H étant de caractère *Lac*<sup>+</sup>, les souches Hfr *Gal*<sup>-</sup> et F<sup>-</sup> *Gal*<sup>-</sup> étaient isogéniques pour les allèles sauvages des déterminants *Lac*, donc pour le caractère *y*<sup>+</sup>.

Les croisements entre souches  $Gal^-$  étaient poursuivis pendant 65 minutes-milieu L. Le nombre de cellules Hfr et  $F^-$  mises en œuvre était comparable. Au terme du croisement, les cellules étaient diluées à 0°C en milieu synthétique et étalées simultanément sur milieux solides synthétiques glucosé et galactosé contenant de la streptomycine. Les recombinants étaient dénombrés après 48 heures d'incubation à 37°C.

La fréquence des recombinaisons restaurant le caractère  $Gal^+$  a été déterminée pour chaque croisement dans la classe des recombinants  $Pyr_1^- Sm^r$  (recombinants  $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$ ); de ce fait se trouve annulée (Jacob & Wollman, 1961) l'influence qu'aurait pu avoir la polarité du transfert de matériel génétique sur la fréquence de transmission des différents déterminants  $Gal$  puisque la manifestation du caractère  $Pyr_1^+$  implique le transfert préalable de l'ensemble du segment  $Gal$  par Hfr H. Les recombinants  $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$  représentent eux-mêmes une fraction des recombinants  $Pyr_1^+ Sm^r$  issus du même croisement (recombinants dénombrés sur milieu glucosé). Des facteurs particuliers à chaque croisement, tels que le nombre des cellules des deux types sexuels mises en présence, affectent de façon semblable le rendement d'un croisement en recombinants de l'une et l'autre classe. L'influence de ces facteurs sera donc éliminée si l'on exprime le nombre des recombinants  $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$  par rapport à celui des recombinants  $Pyr_1^+ Sm^r$ . Il paraît alors permis de considérer que la valeur du rapport *nombre de recombinants  $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$  rapporté au nombre de recombinants  $Pyr_1^+ Sm^r$* , caractéristique de chaque croisement entre deux mutants distincts  $Gal^-x$  et  $Gal^-y$ , traduit essentiellement la probabilité qu'ont ces portions de génome de recombiner pour restaurer le génotype sauvage, et par conséquent mesure en première approximation la distance relative séparant les sites mutés. Les valeurs de ce rapport ( $\times 10^3$ ) correspondant à des croisements entre 6 mutants  $Gal-O^+gal$  ont été rapportés (Fig. 2).

Les résultats sont compatibles avec une disposition linéaire des sites mutés correspondant au seul ordre suivant: 138-1( $K^-$ ), 112-19( $K^-$ ), 138-10( $T^-$ ), 112-21( $T^-$ ), 122-B( $T^-$ ), PL5( $E^-$ ), PL2( $E^-$ ).

Les mutations affectant l'activité d'une même enzyme apparaissent groupées, comme on doit le prévoir si un déterminant distinct contient l'information structurale propre à chaque enzyme. L'ordre relatif de ces déterminants est:

kinase, transférase, épimérase

Si l'on compare la fréquence des recombinants  $Gal^+$  issus des deux croisements possibles entre deux mutants  $Gal^-x$  et  $Gal^-y$  (Hfr  $Gal^-x \times F^- Gal^-y$  et Hfr  $Gal^-y \times F^- Gal^-x$ ) on observe que, d'une façon très générale, le nombre des recombinants est sensiblement plus faible dans le croisement Hfr  $Gal^-x \times F^- Gal^-y$  que dans le croisement inverse, lorsque la mutation  $Gal^-x$  est située "à droite" de  $Gal^-y$  dans la représentation adoptée (Fig. 2).

Ceci suggère que, lorsque cette situation est réalisée, la mutation  $Gal^-x$  est plus proche du marqueur voisin  $Pyr_1$  que la mutation  $Gal^-y$ : le fait qu'une recombinaison supplémentaire soit alors indispensable entre  $Gal^-x$  et  $Pyr_1$  pour réaliser le génotype  $Gal^+ Pyr_1^+$  est en effet susceptible de rendre compte de l'élimination d'un certain nombre de recombinants. L'ordre absolu des déterminants sur le chromosome bactérien paraît donc être: *kinase, transférase épimérase, ...  $Pyr_1$ , ...  $Sm^r$* .

(b) *Localisation de la mutation  $O^+gal$* . Les mutants  $Gal-O^+gal$  ont été isolés sur Hfr H81-2 et les mutations correspondantes transférées dans la souche  $F^-$  D140-1

suivant la technique précédemment décrite. Il n'a pas été observé de cas de ségrégation du caractère *O<sup>c</sup>gal* par rapport au caractère *Gal<sup>-</sup>* lors de l'isolement des souches *F<sup>-</sup> Gal<sup>-</sup> Pyr<sup>+</sup> Sm<sup>r</sup>*. Les croisements entre souches *Gal<sup>-</sup> O<sup>c</sup>gal* et *Gal<sup>-</sup> O<sup>+</sup>gal*, ainsi que les sélections, ont été effectuées dans les mêmes conditions que les croisements entre deux souches *O<sup>+</sup>gal*. Pour chaque croisement les recombinants appartenant à 160 colonies distinctes ont été repiqués sur milieu solide galactosé en présence de streptomycine, puis sur milieu glucosé, avant d'être soumis au test de croissance sur milieu TMG-galactose.

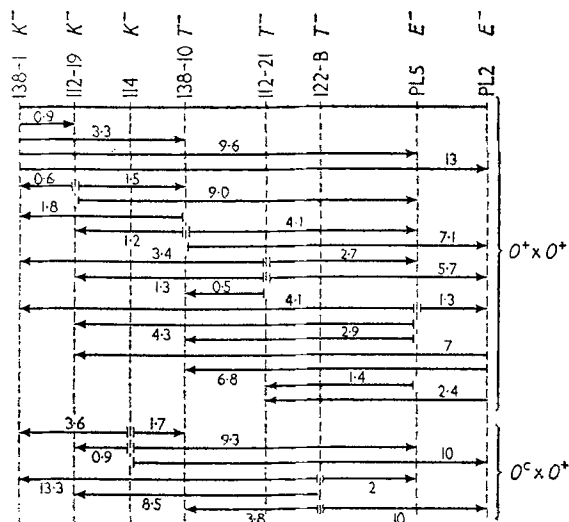


FIG. 2. Fréquences des recombinants *Gal<sup>+</sup>* issus de croisements entre deux souches *Gal<sup>-</sup>*. Les fréquences des recombinants *Gal<sup>+</sup>* sont exprimées par le nombre de recombinants *Gal<sup>+</sup> Pyr<sup>+</sup> Sm<sup>r</sup>* ( $\times 10^3$ ) rapporté au nombre des recombinants *Pyr<sup>+</sup> Sm<sup>r</sup>* pris pour unité. L'origine de chaque flèche désigne la mutation supportée par la souche Hfr et son extrémité la mutation affectant la souche réceptrice *F<sup>-</sup>* dans le même croisement. Il n'a pas été rapporté de valeurs pour les croisements entre souches *O<sup>+</sup>* mettant en œuvre la souche *F<sup>-</sup> 112-21*. Les fréquences de recombinaisons étaient anormalement basses quelle que soit la souche Hfr *Gal<sup>-</sup>* utilisée; la détermination des activités enzymatiques chez la souche *F<sup>-</sup> 112-21* a révélé que cette souche était en réalité un double mutant *K<sup>-</sup> T<sup>-</sup>*. Sa sélection à partir du clone *T<sup>-</sup>* s'est produite très probablement lors de l'isolement de la souche *F<sup>-</sup>* sur milieu "EMB-galactose" (voir texte).

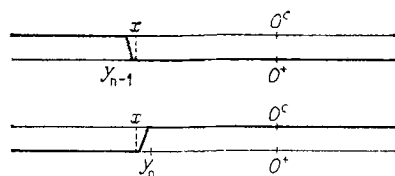


FIGURE 3

Lors d'un croisement du type *Hfr Gal<sup>-x</sup> O<sup>c</sup>gal*  $\times$  *F<sup>-</sup> Gal<sup>-y</sup> O<sup>+</sup>gal*, le locus *Ogal* peut être soit externe, soit interne par rapport à l'intervalle qui sépare les sites mutés *x* et *y*. Dans le premier cas (Fig. 3), en raison de la liaison de *Ogal* au segment *Gal*, les caractères *O<sup>+</sup>gal* et *O<sup>c</sup>gal* seront très inégalement répartis parmi les descendants *Gal<sup>+</sup>*, puisque la manifestation de l'un des deux types suppose qu'une recombinaison supplémentaire se produise entre la mutation *Gal<sup>-</sup>* la plus voisine et le locus *Ogal*;

si différentes mutations  $y_1, y_2 \dots y_n \dots$ , toutes situées du même côté que  $x$  par rapport à *Ogal*, sont mises en œuvre au cours de plusieurs croisements, on observera une brusque inversion du caractère ( $O^+gal$  ou  $O^-gal$ ) le plus fréquemment représenté, lorsque la proximité relative de  $x$  et de l'une de ces mutations par rapport à *Ogal* se trouvera elle-même inversée. Dans le second cas, au contraire, la répartition des caractères  $O^-gal$  et  $O^+gal$  pourra prendre une valeur quelconque, essentiellement déterminée par la distance relative qui sépare la mutation  $O^-gal$  des mutations  $x$  et  $y_n$ , et cette valeur variera de façon continue aussi longtemps que *Ogal* restera localisé entre  $x$  et  $y_n$ . Ces règles peuvent être appliquées à l'examen des résultats rapportés dans le Tableau 7.

TABLEAU 7

Nombre de recombinants  $O^-gal$  parmi 100 recombinants  $Gal^+Pyr_1^+Sm^r$  issus de divers croisements

Hfr $Gal^-O^-gal Pyr_1^+Sm^r \times F^- Gal^-O^+gal Pyr_1^-Sm^r$		Hfr $Gal^-O^+gal Pyr_1^+Sm^r \times F^- Gal^-O^-gal Pyr_1^-Sm^r$	
114 $\times$ PL2 : 98	122-B $\times$ PL2 : 96	PL2 $\times$ 114 : 90	PL2 $\times$ 122-B : 98
114 $\times$ PL5 : 91	122-B $\times$ PL5 : 94	PL5 $\times$ 114 : 91	PL5 $\times$ 122-B : 97
		112-21 $\times$ 114 : 88	112-21 $\times$ 122-B : 29
114 $\times$ 138-10 : 95	122-B $\times$ 138-10 : 7	138-10 $\times$ 114 : 64	138-10 $\times$ 122-B : 18
114 $\times$ 112-19 : 28	122-B $\times$ 112-19 : 12	112-19 $\times$ 114 : 33	112-19 $\times$ 122-B : 15
114 $\times$ 138-1 : 22	122-B $\times$ 138-1 : 12	138-1 $\times$ 114 : 24	138-1 $\times$ 122-B : 17

(Phénotype enzymatique des mutants: Tableau 5.)

La mutation  $Gal^{-114}$  est localisée entre les mutations  $Gal^{-(112-19)}$  et  $Gal^{-(138-10)}$  et la mutation  $Gal^{-(122-B)}$  entre les mutations  $Gal^{-(112-21)}$  et  $Gal^{-PL5}$ . Cette localisation est suggérée par les discontinuités qui caractérisent la ségrégation du caractère  $O^-gal$  dans les croisements correspondants et s'avère la seule compatible avec l'ensemble des résultats. Elle est en agrément avec le fait que la mutation 114 concerne spécifiquement l'activité de la galactokinase et la mutation 122-B l'activité de la transférase. Elle est également en accord avec la fréquence relative des recombinants  $Gal^+$  dénombrés dans les croisements  $O^+gal \times O^-gal$ .

La mutation  $O^-gal$ , extérieure aux deux gènes qui gouvernent l'activité de la galactokinase et de la transférase, se trouve par rapport à eux du même côté que le déterminant relatif à l'épimérase: lors des croisements  $K^-O^-gal \times E^-O^+gal$  ou  $T^-O^-gal \times E^-O^+gal$ , la plupart des recombinants sont en effet de type  $O^-gal$ ; et la mutation  $O^-gal$  paraît localisée à l'extrémité distale (Fig. 4) du déterminant qui gouverne l'activité de l'épimérase sans qu'il soit toutefois possible de préciser si le locus qu'elle affecte appartient ou non à ce déterminant: la liaison la plus forte s'observe en effet entre le locus *Ogal* et le locus qui supporte la plus distale des mutations étudiées du segment *Gal* (PL2).

(c) Conclusions. L'existence de trois déterminants gouvernant respectivement l'activité de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase se trouve vérifiée par la mise en évidence de segments de génome qu'affectent spécifiquement les mutations supprimant l'activité de chacune des enzymes. Bien que la démonstration directe n'en ait pas été apportée, il est peu douteux que ces trois gènes déterminent la structure des protéines correspondantes. La confrontation des résultats des croisements



entre souches *O<sup>c</sup>gal* et *O<sup>+</sup>gal* a permis de localiser la mutation *O<sup>c</sup>gal* avec une précision suffisante pour justifier l'interprétation selon laquelle le phénotype constitutif est déterminé dans cette souche par l'effet pleiotrope d'une unique mutation. L'effet de celle-ci ne s'exerce qu'en "cis" et sur l'expression de trois déterminants adjacents, ce qui suggère qu'il concerne très directement les modalités d'une transcription indivise de l'information génétique contenue dans l'ensemble de cette séquence nucléotidique.

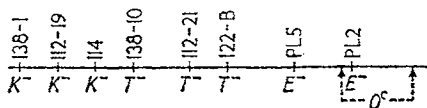


FIGURE 4

Le segment *Gal* représente donc un "opéron", dépendant d'un opérateur de régulation pleiotrope dont la structure est inscrite dans la séquence génétique qui constitue le locus *Ogal*. On doit alors prévoir que, si les conditions de la transcription sont modifiées par l'intervention du mécanisme régulateur spécifique, la transcription de l'information contenue dans chacun des déterminants de structure sera affectée au même degré: l'expression de ces gènes doit être non seulement qualitativement, mais quantitativement coordonnée (Jacob & Monod, 1961b; Ames & Garry, 1959); en d'autres termes, les activités enzymatiques correspondantes doivent varier de façon strictement parallèle et demeurer entre elles dans un rapport constant lorsqu'on les mesure chez des cellules sauvages à différents niveaux d'induction, ou chez divers mutants de régulation. A ce sujet, la coordination mise en évidence (Fig. 5) entre la

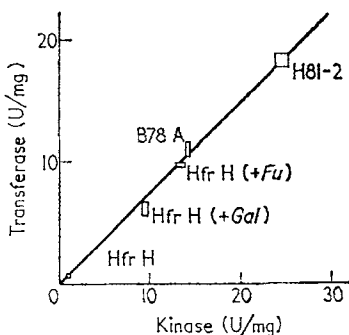


Fig. 5. Biosynthèse de la galactokinase et de la transférase. Les bactéries étaient en voie de croissance en milieu minéral 63 au glycérol en présence éventuellement de D-fucose  $10^{-3}$  M (+Fu) à l'exception de la culture notée (+Gal) qui était effectuée en milieu galactosé. Les suspensions ont été centrifugées et reprises en milieu 63 contenant les facteurs nécessaires à la protection de la galactokinase dans les extraits (Buttin, 1963). Pour chaque suspension, trois déterminations indépendantes de l'activité de l'une et l'autre enzyme ont été faites à partir d'un même extrait obtenu par traitement sonique des bactéries. Les valeurs extrêmes de ces déterminations ont été reportées sur la figure.

synthèse de la galactokinase et celle de la transférase paraît très significative: les deux activités enzymatiques demeurent proportionnelles dans des conditions où les valeurs absolues de ces activités varient elles-mêmes dans le rapport de 1 à 25 par

suite d'altérations génétiques du système de régulation ou de son inactivation par différents inducteurs. Les déterminations que nous avons effectuées de l'activité de l'épimérase sont elles-mêmes compatibles avec l'hypothèse d'une biosynthèse quantitativement coordonnée de cette enzyme et des deux autres protéines.

### (iii) *Le contrôle de la transcription primaire*

Ces observations situent l'action du répresseur au niveau d'une structure renfermant, non encore dissociée, l'ensemble de l'information contenue dans l'opéron *galactose*. La nature des structures cellulaires satisfaisant à cette condition a été discutée par Jacob & Monod (1961b) à propos de l'opéron *lactose*. L'opéron lui-même représente une solution possible évidente: la répression s'exercerait dans ce cas au niveau génétique et gouvernerait le taux auquel s'effectue la transcription, sous forme d'ARN-messager, de l'information contenue dans l'ADN correspondant.

TABLEAU 8

*Activité de la galactokinase et synthèse de l'ARN-messager spécifique Gal dans différentes conditions d'efficacité de la répression*

Souche	Source carbonée	Inducteur (D-fucose)	ARN messenger <i>Gal</i> † (% ARN messenger total)	Activité de la galactokinase (U/mg)
Hfr H	Glucose	0	0.1	0.19
Hfr H	Glycérol	10 <sup>-3</sup> M	1.1	6.3
H81-2	Glycérol	0	3.0	10.0

† Extrait de Attardi, Naono, Gros, Buttin & Jacob (1963).

Cette interprétation a été vérifiée dans le cas de l'opéron *galactose* par le résultat d'expériences récentes (Attardi, Naono, Gros, Brenner & Jacob, 1962; Attardi, Naono, Gros, Buttin & Jacob, 1963). Les quantités d'ARN-messager spécifique de cet opéron ont été déterminées chez la souche Hfr H dans des conditions correspondant à une plus ou moins grande efficacité de la répression, et chez le mutant *O<sub>gal</sub>* H-81-2. L'ARN-messager spécifiquement hybridable avec les gènes de l'opéron *galactose*† représente, parmi l'ARN-messager total, une fraction dont l'importance croît parallèlement, semble-t-il, à l'activité de la galactokinase mesurée chez les mêmes souches, placées dans des conditions de culture semblables (Tableau 8). Cette conclusion situe l'action du mécanisme régulateur au niveau de la transcription primaire, identifiant de ce fait l'opérateur de régulation au locus *Ogal*.

Les résultats ne préjugent pas de la nature du processus par lequel s'effectue cette transcription. Selon l'hypothèse formulée par Jacob & Monod (1961b), la transcription de l'information contenue dans un opéron serait un processus séquentiel polarisé dont le répresseur serait susceptible de suspendre l'initiation. Faisant suite à la localisation liminaire de l'opérateur *lactose*, la localisation de l'opérateur *galactose* à une extrémité de l'opéron correspondant donne un crédit supplémentaire à cette

† L'ARN-messager spécifique de l'opéron *galactose* était estimé en mesurant l'ARN-messager d'*E. coli* capable de s'hybrider avec l'ADN d'un phage transducteur, déduction faite de la faible quantité de cet ARN qui s'hybride avec le génome du phage  $\lambda$  de type sauvage.

interprétation; celle-ci paraît également justifiée par les propriétés récemment découvertes d'une délétion de l'extrémité du segment constitué par les gènes de structure des enzymes de biosynthèse du tryptophane: l'expression des déterminants de structure situés en "cis" est apparue déréprimée (Matsuhira, Kida, Ito, Sato & Imamoto, 1962). Plusieurs observations relatives au système *lactose* ont été mentionnées à l'appui de ce modèle. Des mutations récessives (mutations  $O^0$ ), qui sont localisées au voisinage immédiat des mutations  $O^c$ , abolissent simultanément l'activité des enzymes de cet opéron, et ne permettent pas la complémentation des mutants correspondants par les mutants affectés au niveau d'un gène de structure; ceci a suggéré que les mutations  $O^0$  (*mutations négatives d'opérateur*) suspendraient—ou brouilleraient—à son début la lecture, par l'enzyme de transcription, de l'information contenue dans l'opéron. Une interprétation analogue a été proposée à différentes reprises de l'effet négatif pléiotrope exercé sur l'activité d'enzymes fonctionnellement liées dont les déterminants sont contigus, par des mutations localisées à une extrémité de la séquence génétique (Ames, Garry & Herzenberg, 1960; Englesberg, 1961).

Chez une autre classe de mutants du système *lactose* (*mutants polaires*) des mutations au niveau de l'un ou l'autre des déterminants structuraux réduisent l'activité non seulement de l'enzyme correspondante mais de l'enzyme (ou des enzymes) dont l'information structurale serait lue postérieurement, dans l'hypothèse d'une transcription polarisée débutant au niveau de l'opérateur. Plusieurs mutants triplement défectifs pour les enzymes de métabolisme du galactose ont été isolés chez *E. coli* (Kalekar *et al.*, 1959; Lederberg, 1960). Ils ne complémentent aucun des mutants déficients en une seule des activités enzymatique et ne sont complémentés par aucun d'eux (Lederberg, 1960; et communication en référence dans Adler & Kaiser, 1963). La localisation des mutations correspondantes, entreprise indépendamment par différents auteurs, n'a pas encore abouti à des conclusions définitives (Morse, 1962; Adler & Kaiser, 1963). S'il paraît peu probable que les mutations étudiées soient localisées à l'extrémité de l'opéron, il est possible qu'elles concernent des sites intérieurs au gène gouvernant l'activité de l'épimérase, ce qui suggère qu'il pourrait s'agir de mutations de type polaire. Dans l'état actuel des données expérimentales relatives au phénotype triplement défectif du système *galactose*, il ne semble pas que les propriétés de ces mutants puissent être utilement avancées comme argument pour ou contre l'hypothèse d'une transcription polarisée continue d'une extrémité à l'autre de l'opéron.

#### (d) *Déterminisme génétique de la biosynthèse de galactose-perméase*

Nous avons montré dans la première partie de cette étude (Buttin, 1963) que la galactose-perméase est inductible par le galactose et le fucose, ce qui suggère que, dans certaines conditions, elle peut devenir limitante pour l'utilisation du galactose. La question se pose donc de savoir si la synthèse de la perméase est gouvernée par le même circuit de régulation que celle des autres protéines de la chaîne métabolique du galactose. L'étude directe du taux de synthèse de la galactose-perméase est considérablement compliquée par le fait qu'elle ne peut être abordée avec précision que chez des mutants dépourvus de galactokinase, chez lesquels cette perte de fonction détermine l'induction par voie interne du système de perméation. Certaines observations indirectes apportent cependant des indications très significatives, semble-t-il, sur le contrôle génétique de la biosynthèse de la perméase. Ces indications sont les suivantes:

(1) l'existence d'un déterminant qui gouverne spécifiquement l'activité de la perméase a été reconnue (Buttin, 1963); ce gène (*Pgal*), dans lequel il paraît *a priori* raisonnable de voir le déterminant de structure de la protéine, n'appartient pas à l'opéron *galactose*. En effet le défaut d'activité de la perméase (caractère *P<sup>-</sup>gal*) a été mis en évidence chez une souche 20SO isolée comme recombinant *Gal<sup>+</sup>Sm<sup>r</sup>* d'un croisement entre Hfr 30SO (*Gal<sup>+</sup>Sm<sup>s</sup>*) et F<sup>-</sup> P678 (*Gal<sup>-b</sup>Sm<sup>r</sup>*). La mutation *P<sup>-</sup>gal* affectait la lignée parentale F<sup>-</sup>: la souche P678 étant de phénotype *K<sup>-</sup>*, il a été vérifié par la technique isotopique directe qu'elle n'accumule pas de galactose. La souche Hfr 30SO, pleinement inductible par le D-fucose  $10^{-3}$  M, manifeste le phénotype sauvage pour ce caractère. La souche 30SO a reçu le segment *Gal* du parent Hfr puisque la mutation *Gal<sup>-b</sup>* concerne ce segment (Wollman & Jacob, 1957) et conservé le caractère *P<sup>-</sup>gal* de la souche F<sup>-</sup>: le déterminant *Pgal* n'apparaît donc pas lié au segment *Gal*; ceci est confirmé par l'observation que chez différents recombinants *Gal<sup>+</sup>* obtenus à partir de cette lignée F<sup>-</sup> *Gal<sup>-</sup>*, la galactokinase n'est que partiellement induite par une concentration de fucose ( $10^{-3}$  M) saturante pour les souches sauvages;

(2) sur milieu TMG-galactose, la croissance des clones *O<sup>c</sup>gal* n'est pas inhibée à condition qu'ils soient de caractère *y<sup>+</sup>* (capables de synthétiser la  $\beta$ -galactoside-perméase); la croissance des clones constitutifs de génotype *Gal<sup>+</sup>O<sup>c</sup>gal y<sup>-</sup>* est inhibée aussi fortement (ou presque, suivant les souches et recombinants étudiés) que la croissance des clones inductibles *Gal<sup>+</sup>O<sup>+</sup>gal y<sup>-</sup>*. La confusion qui peut en résulter lorsqu'on dénombre sur ce milieu les recombinants inductibles et constitutifs a été soulignée au début de cette étude. On remarque que l'intervention du déterminant *y* a un effet paradoxal puisque l'inhibition de croissance concerne les clones *y<sup>-</sup>*, qui accumulent le moins activement le TMG (Rickenberg, Cohen, Buttin & Monod, 1956); et

(3) l'inhibition de croissance des clones constitutifs *y<sup>-</sup>* n'a été observée chez aucun des mutants ou recombinants chez lesquels la synthèse constitutive des trois enzymes résulte de la mutation *R<sup>-</sup>gal* du gène régulateur (Planche I).

Une interprétation évidente de ces résultats est dictée par la remarque que le galactose, à la concentration à laquelle il est utilisé ( $2 \times 10^{-2}$  M) manifeste très vraisemblablement une affinité pour la  $\beta$ -galactoside-perméase suffisante pour que ce système participe à sa concentration dans les cellules. Il est clair que le déterminant *Pgal* extérieur à l'opéron *galactose* ne saurait être affecté par la mutation *O<sup>c</sup>gal*: de fait, il a été vérifié que la répression exercée par le TMG sur la synthèse de perméase est maintenue chez les mutants *O<sup>c</sup>gal*. Sur milieu TMG-galactose, la pénétration du galactose est donc susceptible de limiter le taux de croissance, l'expression du génotype *O<sup>c</sup>gal* ne devenant possible que lorsque l'activité conjuguée de deux perméases (*Pgal* et *y*) réalise une concentration intracellulaire de galactose suffisante.

Le fait que le caractère *R<sup>-</sup>gal* s'exprime librement, indépendamment de la présence ou de l'absence de l'allèle *y<sup>+</sup>* indique, semble-t-il, que la perméation du galactose n'est plus sensible chez les cellules *R<sup>-</sup>gal*, à l'effet des inhibiteurs de l'induction: cette situation peut *a priori* résulter soit de ce que la biosynthèse de la galactose-perméase dépend du gène régulateur *Rgal*, soit de ce que les mutants *R<sup>-</sup>gal* ont accumulé deux mutations dont l'une concerne spécifiquement la régulation de synthèse de la perméase. La seconde hypothèse est très improbable.

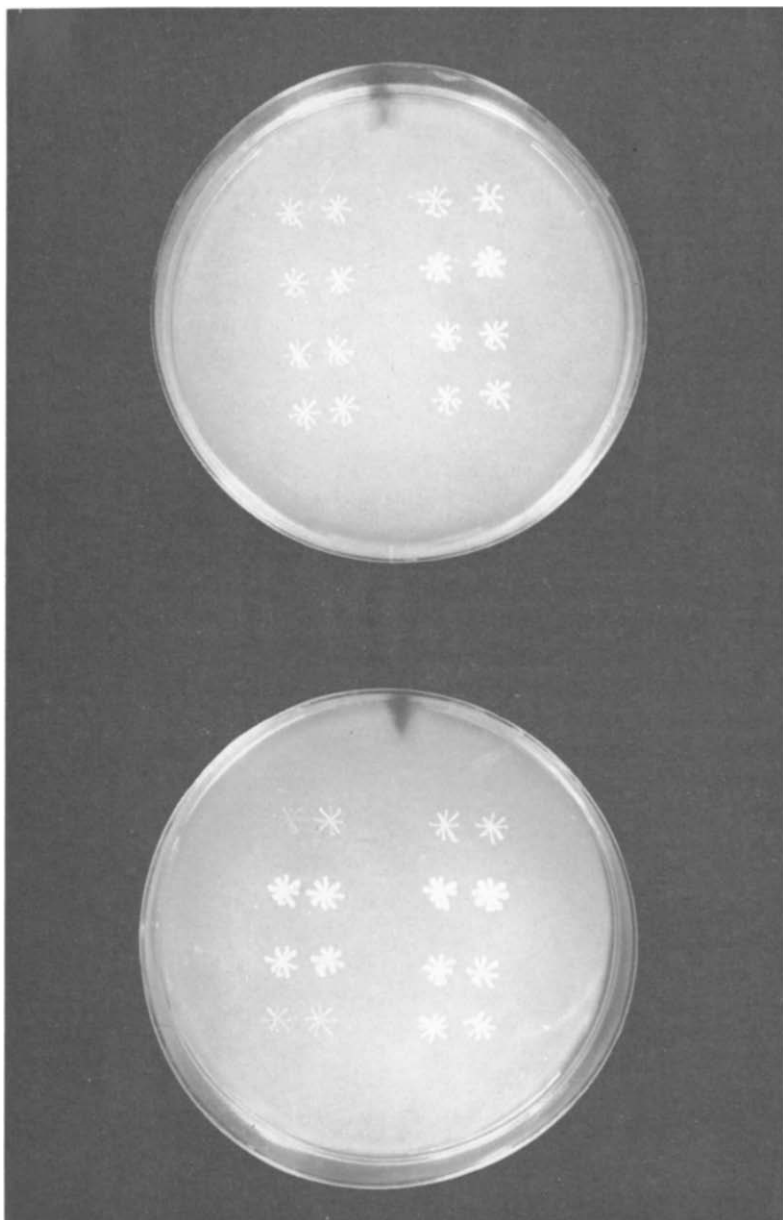


PLANCHE I. Croissance comparée sur milieu galactosé et sur milieu "TMG-galactose" de différents clones "inductibles" et "constitutifs". Deux colonies de chaque clone ont été repiquées côte à côte, "en étoile". De haut en bas, colonnes de gauche: Hfr H: *Gal*<sup>+</sup> *O*<sup>+</sup>*gal* *R*<sup>+</sup>*gal* *y*<sup>+</sup>; Hfr H81-2: *Gal*<sup>+</sup> *O*<sup>+</sup>*gal* *R*<sup>+</sup>*gal* *y*<sup>+</sup>; recombinant (Hfr H81-2 × F<sup>-</sup> B34-5): *Gal*<sup>+</sup> *O*<sup>+</sup>*gal* *R*<sup>+</sup>*gal* *y*<sup>+</sup>; recombinant *y*<sup>-</sup> du même croisement: *Gal*<sup>+</sup> *O*<sup>+</sup>*gal* *R*<sup>+</sup>*gal* *y*<sup>-</sup>.

Colonnes de droite: C600S<sub>r</sub>: *Gal*<sup>+</sup> *O*<sup>+</sup>*gal* *R*<sup>+</sup>*gal* *y*<sup>-</sup>; B78 A: *Gal*<sup>+</sup> *O*<sup>+</sup>*gal* *R*<sup>-</sup>*gal* *y*<sup>-</sup>; transduit de B106-1: *Gal*<sup>-</sup> *O*<sup>+</sup>*gal* *R*<sup>-</sup>*gal* *y*<sup>-</sup> ( $\lambda$ *Gal*<sup>+</sup> *O*<sup>+</sup>*gal*); transduit de B106-1: *Gal*<sup>-</sup> *O*<sup>+</sup>*gal* *R*<sup>-</sup>*gal* *y*<sup>-</sup> ( $\lambda$ *Gal*<sup>+</sup> *O*<sup>+</sup>*gal*).

(a) Les deux mutants *R-gal y<sup>-</sup>* étudiés (B78A et 112-1), sélectionnés par des techniques différentes, sont l'un et l'autre insensibles à l'inhibition par le TMG.

(b) De nombreux recombinants *y<sup>-</sup>* ont été obtenus au cours de certains croisements rapportés dans les Tableaux 2 et 3. La ségrégation de l'allèle sauvage d'un gène régulateur propre à la perméase aurait fait apparaître des recombinants *R-gal y<sup>-</sup>* synthétisant constitutivement la galactokinase mais dont la croissance aurait été inhibée sur milieu TMG-galactose au même titre que celle des recombinants *O<sup>c</sup>gal y<sup>-</sup>*: malgré de nombreux contrôles, de tels clones n'ont pas été décelés.

Il est donc très probable que le gène régulateur *Rgal* exerce son effet sur la biosynthèse de perméase comme sur celle des autres protéines de cette chaîne métabolique.

#### 4. Conclusions

Les conclusions précédentes peuvent être coordonnées dans le modèle très simple d'un circuit de régulation analogue à celui qui a été proposé pour le système *lactose*: un gène régulateur *Rgal* qui, dans ce cas, apparaît topologiquement indépendant de l'opéron qu'il gouverne, élabore très vraisemblablement le répresseur cytoplasmique de ce système; l'inactivation du répresseur par un inducteur déréprime simultanément la synthèse des trois enzymes galactokinase, transférase et épimérase; en absence d'inducteur, la combinaison du répresseur avec un opérateur spécifique suspend, ou plus précisément limite la transcription primaire de l'ensemble de l'information contenue dans l'opéron *galactose*. La biosynthèse de la galactose-perméase est très vraisemblablement gouvernée par le même gène régulateur, exerçant son effet au niveau d'un opérateur distinct.

Une partie importante de cette étude a été consacrée à l'analyse de l'opéron *galactose*, en raison des exigences très précises que comporte la caractérisation d'un opérateur de régulation: un opéron polycistronique peut être reconnu dans une certaine mesure en tant qu'*unité de transcription* par la mise en évidence de mutations négatives pléiotropes, de caractère récessif, ne permettant pas la complémentation par un segment homologue muté dans un gène de structure; cependant, comme le prouve l'existence de mutants polaires, la transcription peut être brouillée ou suspendue à un niveau quelconque de la séquence génétique; la localisation du défaut correspondant ne saurait constituer la localisation d'un opérateur de régulation stéréospécifique; un opéron, semble-t-il, ne peut être reconnu sans ambiguïté comme *unité de régulation* que dans la mesure où il a été vérifié que la régulation concernait simultanément et à un même degré l'expression des déterminants de structure qui le composent; et un opérateur de régulation ne peut être identifié comme tel que par la localisation de mutations de régulation, en l'occurrence des mutations constitutives à effet pléiotrope limité à une séquence génétique située en "cis" et contigüe. L'ensemble de ces propriétés n'avaient été établies, à notre connaissance, que pour l'opéron *lactose* et pour son opérateur; cette étude a confirmé toutes les prédictions du modèle de Jacob et Monod. Dans le système *lactose*, les mutations constitutives d'opérateur connues ne dérépriment que partiellement la biosynthèse des enzymes correspondantes; les propriétés du mutant *O<sup>c</sup>gal* que nous avons étudié montrent qu'en fait une mutation d'opérateur peut provoquer une dérépression aussi complète qu'une mutation du gène régulateur.

La subordination au même gène régulateur d'un second opéron auquel appartiendrait le déterminant de structure de la perméase est, nous l'avons montré, très probable. Le contrôle simultané par un même gène régulateur de plusieurs opérons a

été envisagé dans le cas des enzymes de biosynthèse de l'arginine (Vogel, 1961; Maas, 1961; Gorini, Gundersen & Burger, 1961) et plus récemment dans le cas des enzymes du métabolisme des pyrimidines (Beckwith *et al.*, 1962). La situation mise en évidence dans le système d'utilisation du galactose représente, semble-t-il, un degré d'évolution intermédiaire entre le groupement complet de tous les éléments du circuit de régulation, tel qu'il s'observe dans le système *lactose*, et le fractionnement en unités indépendantes des divers gènes de structure et du gène régulateur. La localisation du gène de structure de la perméase, pour lequel on ne saurait exclure *a priori* la possibilité d'une liaison avec le gène régulateur, devrait permettre de préciser dans une certaine mesure ce degré de "différenciation" fonctionnelle de la séquence enzymatique.

Cette étude, dont certaines conclusions ont fait l'objet de communications préliminaires (Buttin, 1961; Buttin, 1962) a bénéficié du soutien du "Jane Coffin Childs Memorial Fund", du "National Institutes of Health", du Commissariat à l'Energie atomique et de la Délégation générale à la Recherche scientifique.

L'auteur exprime sa profonde reconnaissance au Professeur J. Monod et à F. Jacob qui ont guidé ses recherches. Il remercie très sincèrement MM. F. Gros et E. L. Wollman pour l'intérêt qu'ils ont porté à son travail et pour les conseils qu'ils lui ont prodigués.

#### REFERENCES

- Adler, J. & Kaiser, A. D. (1963). *Virology*, **19**, 117.  
 Ames, B. N. & Garry, B. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1453.  
 Ames, B. N., Garry, B. & Herzenberg, L. A. (1960). *J. Gen. Microbiol.* **22**, 369.  
 Arber, W. (1958). *Arch. Sci., Genève*, **11**, 259.  
 Attardi, G., Naono, S., Gros, F., Brenner, S. & Jacob, F. (1962). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **255**, 2303.  
 Attardi, G., Naono, S., Gros, F., Buttin, G. & Jacob, F. (1963). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **256**, 805.  
 Beckwith, J. R., Pardee, A. B., Austrian, R. & Jacob, F. (1962). *J. Mol. Biol.* **5**, 618.  
 Buttin, G. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 213.  
 Buttin, G. (1962). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **255**, 1233.  
 Buttin, G. (1963). *J. Mol. Biol.* **7**, 164.  
 Calef, E. & Licciardello, G. (1960). *Virology*, **12**, 81.  
 Cohen-Bazire, G. & Joliet, M. (1953). *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 1.  
 Davis, B. D. (1948). *J. Amer. Chem. Soc.* **70**, 4267.  
 Englesberg, E. (1961). *J. Bact.* **81**, 996.  
 Fukasawa, T., Jokura, K. & Kurahashi, K. (1962). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 121.  
 Fukasawa, T. & Nikaido, H. (1961). *Biochim. biophys. Acta*, **48**, 470.  
 Gorini, L., Gundersen, W. & Burger, M. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 173.  
 Hayes, W. (1953). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **18**, 75.  
 Jacob, F. & Monod, J. (1961a). *J. Mol. Biol.* **3**, 318.  
 Jacob, F. & Monod, J. (1961b). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 193.  
 Jacob, F. & Wollman, E. L. (1957). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **245**, 1840.  
 Jacob, F. & Wollman, E. L. (1961). *Sexuality and the Genetics of Bacteria*. New York: Academic Press.  
 Kalckar, H. M., Kurahashi, K. & Jordan, E. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1776.  
 Kaudewitz, F. (1959). *Nature*, **183**, 1829.  
 Kurahashi, K. & Wahba, A. J. (1958). *Biochim. biophys. Acta*, **30**, 298.  
 Lederberg, E. M. (1960). In *Microbial Genetics*, p. 115. Cambridge: University Press.  
 Lennox, E. S. (1955). *Virology*, **1**, 190.  
 Maas, W. K. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 183.  
 Matsuhiro, A., Kida, S., Ito, J., Sato, K. & Imamoto, F. (1962). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 204.  
 Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Paris: Hermann.  
 Morse, M. L. (1962). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **48**, 1314.

- Morse, M. L., Lederberg, E. M. & Lederberg, J. (1956a). *Genetics*, **41**, 142.
- Morse, M. L., Lederberg, E. M. & Lederberg, J. (1956b). *Genetics*, **41**, 758.
- Rickenberg, H. V., Cohen, G. N., Buttin, G. & Monod, J. (1956). *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 829.
- Soffer, R. L. (1961). *J. Bact.* **82**, 471.
- Sundararajan, T. A., Rapin, A. M. C. & Kalekar, H. M. (1962). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **48**, 2187.
- Taylor, A. L. & Adelberg, E. A. (1960). *Genetics*, **45**, 1233.
- Vogel, H. J. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 163.
- Weigle, J. J. & Delbrück, M. (1951). *J. Bact.* **62**, 301.
- Wollman, E. L. & Jacob, F. (1957). *Ann. Inst. Pasteur*, **93**, 323.
- Yarmolinsky, M. B., Jordan, E. & Wiesmayer, H. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 217.
- Yarmolinsky, M. B., Wiesmayer, H., Kalekar, H. M. & Jordan, E. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1786.