

Mutants d'*Escherichia coli* K 12 affectés pour leur croissance sur méthyl- β -D-glucuronide : Localisation du gène de structure de la β -D-glucuronidase (*uid A*)

Georges Novel* et Madeleine Novel

Service de Microbiologie de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon,
Villeurbanne, France

Reçu le 9 novembre 1972

Mutants of *E. coli* K 12 Unable to Grow on Methyl- β -D-Glucuronide:
Map Location of *uid A*. Locus of the Structural Gene of β -D-Glucuronidase

Summary. Mutants of *E. coli* K 12 unable to grow on a β -D-glucuronide (methyl- β -D-glucuronide) and yet able to grow on hexuronates have been isolated; they are deficient for the enzyme: β -D-glucuronidase. By conjugation and transduction experiments, these mutations have been mapped in a locus *uid A* between *man* and *aro D*. No or weak cotransduction is found between *aro* and *man*: *man* is shifted from its precedent location to 30.5 minute very close to *uid A* (linked by 83 to 97% of cotransduction). The order of loci in this region appears to be: ...*phe S...pps...aro D...uid A...man*.... Some of these mutations can reverse to wild type with a thermosensitive glucuronidase. These reverse mutations are found linked to this locus *uid A*; these results strongly suggest that *uid A* is the site of the structural gene of β -glucuronidase.

Introduction

La β -D-glucuronidase (β -D-glucuronide glucuronohydrolase, E.C. 3.2.1.31) est la première enzyme de la chaîne de dégradation des hexuronides et hexuronates (Fig. 1). Elle est capable d'hydrolyser les galacturonides comme les glucuronides en alimentant les enzymes suivantes respectivement en galacturonate et glucuronate. Le méthyl- β -D-galacturonide (MGalU) ne peut pas servir de source de carbone pour la croissance d'*Escherichia coli*: ce substrat n'est probablement pas inducteur de la glucuronidase (Didier-Fichet et Stoeber, 1968). Par contre, le méthyl- β -D-glucuronide (MGlcU) est une source de carbone pour cette souche et un inducteur satisfaisant de cette enzyme. Ce substrat induit aussi les enzymes suivantes des deux rameaux de la voie dégradative des hexuronates; cette induction est séquentielle: elle n'a plus lieu chez un mutant dépourvu de glucuronidase (on ignore cependant si ce composé pénètre encore chez ce mutant). Les autres composés, substrats ou produits des autres enzymes de la chaîne (à l'exception du glucuronate faiblement inducteur) ne sont pas inducteurs de la glucuronidase chez la souche sauvage (Baudouy-Robert, Didier-Fichet, Jimeno-Abendano, Novel, Portalier et Stoeber, 1970).

Ces résultats suggèrent que la glucuronidase appartient à un groupe de régulation distinct de ceux des autres enzymes. Divers mutants incapables de croître

* Ce mémoire sera inclus dans les travaux présentés pour l'obtention du grade de «Docteur-ès-Sciences» à l'Université Claude Bernard de Lyon.

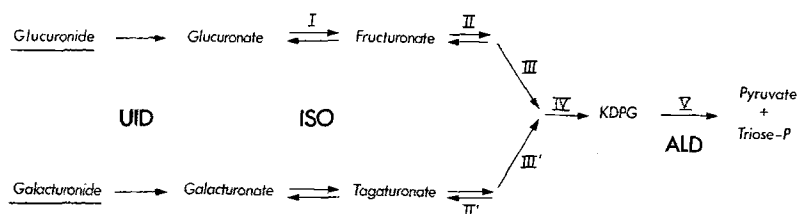


Fig. 1. Schéma métabolique de la dégradation des hexuronides et hexuronates chez *Escherichia coli* K12: *UID* = β -D-glucuronide glucuronohydrolase; *ISO* = D-glucuronate céto-isomérase; *ALD* = 2-céto-3-désoxy-6-P-gluconate aldolase

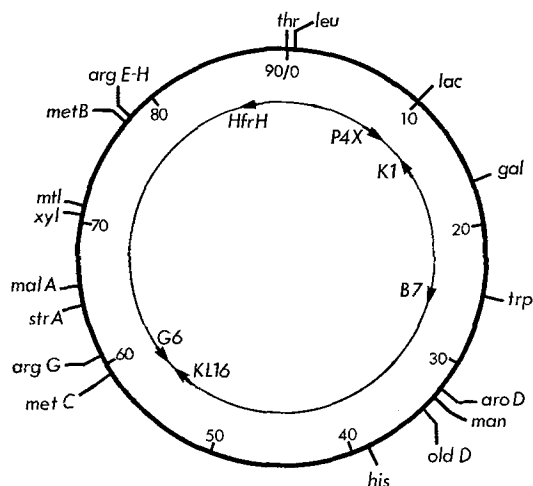


Fig. 2. Carte génétique d'*Escherichia coli* K12 selon Taylor (1970)

sur MGlcU ont été isolés et étudiés. Nous avons proposé provisoirement le sigle *gur* comme symbole génétique pour l'utilisation des hexuronides. Un certain nombre de mutations *gur* ont été localisées sur la carte chromosomique d'*Escherichia coli* K12 (Novel, Novel, Didier-Fichet et Stoeber, 1970); elles sont dispersées en quatre loci (Fig. 2):

gur B: site de mutations à effet simple ou pleiotrope pouvant affecter aussi le métabolisme d'un certain nombre d'autres substrats carbonés: ces mutations font l'objet d'une autre communication (Novel et Novel, à paraître). Le locus *gur B* est placé à la minute 64,5 entre *str A* et *aro B*.

gur C: une mutation affectant la croissance sur MGlcU et sur acétate: localisée près de *gal* (minute 17).

gur D: locus caractérisé par des mutations affectant la croissance sur MGlcU et parfois aussi l'activité isomérasique; situé à l'origine de l'Hfr G6 entre *met C* et *arg G* (Novel, résultats inédits).

gur A: situé de manière préliminaire dans la région: *his* (38^{ème} minute)...*trp* (25^{ème} minute)...*gal* (17^{ème} minute), ce locus défini par plusieurs mutations

affectant seulement la croissance sur MGlcU a été localisé par conjugaison et transduction : une note préliminaire a déjà été publiée sur ce sujet (Novel et Novel, 1971). L'obtention à partir de certaines de ces mutations *gur A* de mutants réverses chez qui la glucuronidase est devenue thermosensible suggère que ce locus contient le gène de structure de cette enzyme. Selon les recommandations de Demerec *et al.* (1966) nous proposons le nouveau sigle *uid A* pour le site de ces mutations.

Matériel et méthodes

Nomenclature

La nomenclature génétique est celle de Taylor (1970). Les marqueurs nouveaux sont *eda* : 2-céto-3-désoxy-6-P-gluconate aldolase (Pouysségur, 1971) et *uid A* gène de structure de la β -D-glucuronidase. Nous conservons provisoirement le sigle *gur* pour les mutations dont nous ignorons encore la relation physiologique exacte les liant au métabolisme des hexuronides. Gur^+ et Gur^- expriment la croissance ou la non-croissance sur MGlcU.

Souches bactériennes et phage

Les souches employées dans cette étude dérivent toutes d'*Escherichia coli* K 12 (Tableau 1). Elles proviennent des collections de J. Puig, E. Wollman, F. Jacob, K.B. Low, J.A. Pittard, H.L. Kornberg, P. Overath, A. Böck et B.J. Bachmann. L'origine et la polarité d'injection des Hfr ainsi que les principaux marqueurs utilisés sont représentés dans la Fig. 2. A l'origine, un stock de phage P 1 kc nous a été fourni par J. Puig. Au cours de ce travail, ce phage a éventuellement été réisolé à partir d'une plaque de lyse.

Milieux de culture

Le milieu minéral utilisé est le milieu 63 (Sistrom, 1968). La thiamine-HCl est ajoutée à la concentration de 0,5 μ g/ml, les acides aminés à 100 μ g/ml (forme L) l'adénine à 20 μ g/ml. Pour la souche *aro D* utilisée, les concentrations optimales sont : D-L phénylalanine (80 μ g/ml), L-tyrosine (8 μ g/ml) et acide shikimique (0,7 mg/ml). La streptomycine est utilisée à la concentration de 200 μ g/ml. Les sources de carbone sont employées aux concentrations suivantes : glucose (4—6 mg/ml), glycérol, mannose (2 mg/ml), MGlcU (1—2 mg/ml).

Le milieu complet est le milieu L (Lennox, 1955) avec 5 mg/ml de NaCl, solidifié par 12 mg/ml d'Agar Oxoid N° 3 ou 6—7 mg/ml (gélose molle). Le milieu de fermentation usuel est le milieu EMB (Eosine bleu de Méthylène) avec 10 mg/ml du sucre analysé.

Techniques génétiques

Les conjugaisons sont réalisées selon la méthode classique de Jacob et Wollman (1961) (1 Hfr pour 20 F^- , durée : 90 minutes à 37° C). Eventuellement le milieu de conjugaison est centrifugé et les bactéries remises en suspension en milieu minéral. *Les transductions* : les stocks de P 1 sont réalisés par lyse confluite (Swanstrom et Adams, 1951) sur milieu L + $CaCl_2$ ($5 \cdot 10^{-3}$ M). Lors des transductions (Lennox, 1955) la culture de la souche réceptrice ($5 \cdot 10^8$ bactéries/ml) reçoit $5 \cdot 10^{-3}$ M de $CaCl_2$ (20 minutes) avant d'être infectée par le phage à une multiplicité voisine de 1 (40 minutes à 20—25° C), le milieu de transduction est éliminé par centrifugation et les bactéries remises en suspension dans un milieu minéral avant d'être étalées sur milieu sélecteur. Pour l'obtention de clones *phe S*⁺ thermorésistants (Böck et Neidhardt, 1967), les cultures sur milieu sélecteur sont préincubées plusieurs heures à 32° avant d'être placées définitivement à 42° C. *Analyse génétique des recombinants* : après réisolement sur le même milieu un clone de chaque recombinant est testé par la méthode des répliques pour les divers caractères transmissibles. La lecture des croissances sur MGlcU est faite après 48 heures (37° C). *Croisements avec des F'* : la souche F' est récoltée en phase exponentielle et mise en contact avec une suspension de F^- dans le rapport de 1 F' pour 10 F^- . Le croisement est interrompu au bout de 10 ou 20 minutes.

Tableau 1. Description des souches utilisées

Souche	Sexe	Marqueurs génétiques	Origine
HfrH	Hfr	<i>str-s</i>	E. Wollman (J. Puig)
P4X	Hfr	<i>str-s, met B, (λ)⁺</i>	E. Wollman (J. Puig)
K1	Hfr	<i>str-s, thr</i>	E. Wollman (J. Puig)
KL16	Hfr	<i>str-s</i>	F. Jacob
G6	Hfr	<i>str-s</i>	Institut Pasteur (Paris)
PA601	F ⁻	<i>thr, leu, his, arg (EH), pro</i> (<i>A</i> ou <i>B</i>), <i>ade (pur E), lac, gal b,</i> <i>mal A, xyl, mtl, str-r</i>	E. Wollman (J. Puig)
PA309	F ⁻	<i>thr, leu, his, arg (EH), trp, lac,</i> <i>gal, mal, xyl, mtl, str-r</i>	E. Wollman (J. Puig)
AB3302	F ⁻	<i>aro D, his, arg (EH), lac, gal,</i> <i>xyl, mtl, str-r, Gur⁻</i>	J. A. Pittard (Huang et Pittard, 1967)
GM146	F ⁻	(<i>idem</i> AB3302) <i>Gur⁺</i>	recombinant <i>Gur⁺</i> : AB3302 × P1 (HfrH)
K63	F ⁻	<i>his, old D, man, gal, Str-r</i>	P. Overath (J. Pouysségur)
K6-1	F ⁻	<i>pro A, aro D, arg A, thi, pps,</i> <i>str-r, Gur⁻</i>	H.L. Kornberg
GM157	F ⁻	<i>aro D, arg A, (thi ?), pps, str-s,</i> <i>Gur⁺</i>	recombinant <i>pro⁺ (his⁺)</i> : Hfr G6 × K6-1
NP37	Hfr (K10)	<i>thi, RC (relaxed), phe S 5, str-s</i>	A. Böck
KLF48/ KL159	F [']	F148: <i>his</i> → <i>che A-aro D</i> - Chrom: <i>thi, his, aro D, pro A,</i> <i>rec A, xyl</i>	K. B. Low (B. J. Bachmann)
KLF23/ KL181	F [']	F123: ←(<i>rac</i>)-(pyr F)- <i>trp</i> - Chrom: <i>pyr D, rec A, his, trp,</i> <i>thi, mtl, xyl, mal A, gal, str-r</i>	K. B. Low (B. J. Bachmann)
58.161 Sr	F ⁻	<i>met B, str-r</i>	F. Jacob
A314	Hfr	(type P4X) <i>eda-2</i>	mutant NTG de P4X (J. Jimeno <i>et al.</i> résultats inédits; J. Pouysségur, 1971)
GM241	F ⁻	(comme PA601) <i>uid A2</i>	mutant NTG de PA601 (Novel <i>et al.</i> , 1970)
GM291	Hfr	(type P4X) <i>uid A-1</i>	mutant HNO ₂ de P4X
TR73	Hfr	(type P4X) <i>uid A-4</i>	origine: A314; mutant spontané résistant à l'empoisonnement (voir matériel et méthodes); transduit <i>eda⁺</i> par P1 (P4X)
TR88	Hfr	(type P4X) <i>uid A-6</i>	autre mutant indépendant obtenu comme résistant: transduit <i>idem</i> .
AJ5	(Hfr)	<i>Mal, uid A-5, «Galacturonate⁻»,</i> <i>str-s</i>	mutant NTG (J. Jimeno, 1968) du K12 S3000 (HfrH)
MD11	F ⁻	<i>met B, uid A-3, str-r</i>	mutant NTG de la 58.161 Sr (M.L. Didier-Fichet, résultats inédits)

Tableau 1 (suite)

Souche	Sexe	Marqueurs génétiques	Origine
AJ 8	(Hfr)	<i>uid A 7</i> , «Galacturonate ⁻ », «Glucuronate ⁻ », <i>str-s</i>	mutant NTG (idem. AJ 5)
AJ 8RU3 AJ 8RU2	(Hfr) (Hfr)	<i>uid A</i> , <i>str-s</i> , (réverses Galacturonate ⁺ et Glucuronate ⁺)	mutants réverses obtenus sur glucu- ronate (M. L. Didier-Fichet)
S236	F ⁻	<i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>arg</i> (<i>EH</i>), <i>his</i> , <i>uid A-1</i> , <i>trp</i> , <i>lac</i> , <i>mal</i> , <i>xyl</i> , <i>mtl</i> , <i>str-r</i>	recombinant <i>gal</i> ⁺ (<i>str-r</i>): PA309 × GM291 (<i>uid A-1</i>).
GM290	F ⁻	<i>aro D</i> , <i>arg</i> (<i>EH</i>), <i>uid A-1</i> , <i>gal</i> , <i>lac</i> , <i>str-r</i>	recombinant <i>his</i> ⁺ (<i>met B</i> ⁺) de la souche GM146 × GM291 (<i>uid A-1</i>)
S343	F ⁻	<i>aro D</i> , <i>arg</i> (<i>EH</i>), <i>man</i> , <i>Gur</i> ⁺ , <i>gal</i> , <i>lac</i>	recombinant <i>Gur</i> ⁺ : GM290 (<i>uid A-1</i>) × P1 (K63: <i>man</i>)
S407	F ⁻	<i>man</i> , <i>uid A-1</i> , <i>str-s</i>	recombinant <i>aro</i> ⁺ (<i>met B</i> ⁺): S343 × GM291 (<i>uid A-1</i>)
GM230	Hfr	(type Hfr H) <i>str-s</i> , MGalU ⁺	mutant de l'Hfr H (M.L. Didier-Fichet et G. Novel, résultats inédits)
AJ 5R1	(Hfr)	Mal, <i>uid A 5</i> — réverse <i>Gur</i> ⁺ , «Galacturonate ⁻ », <i>str-s</i>	mutant réverse obtenu sur MGlU (M.L. Didier-Fichet)
RN183	Hfr	(type P4X) <i>uid A1</i> — réverse <i>Gur</i> ⁺	mutant NTG de GM 291 (<i>uid A1</i>)
RS143	Hfr	(type P4X) <i>uid A4</i> — réverse <i>Gur</i> ⁺	mutant spontané de TR 73 (<i>uid A4</i>)
RS141	Hfr	(type P4X) <i>uid A6</i> — réverse <i>Gur</i> ⁺	mutant spontané de TR 88 (<i>uid A6</i>)
S482	F ⁻	<i>uid A4</i> , <i>aro D</i>	recombinant <i>man</i> ⁺ : S343 × P1 (TR 73)
S428	F ⁻	<i>uid A6</i> , <i>aro D</i>	recombinant <i>man</i> ⁺ : de S343 × P1 (TR 88) ⁺

Les mutagenèses

A la nitrosoguanidine (NTG) (Adelberg, Mandel et Chen, 1965): décrite ailleurs (Novel *et al.*, 1970). *A l'acide nitreux* (HNO₂) (Schwartz et Beckwith, 1969). Une culture de la nuit sur milieu L (2 · 10⁹ bactéries/ml) est remise en suspension en tampon Acétate (pH 4,6—0,1 M) en présence de NaNO₂ (3 · 10⁻³ M) pendant 20 minutes à 37° sans agitation. La réaction est arrêtée par un excès de Tris-HCl (pH 8,5—5 · 10⁻² M) et le milieu éliminé. Les bactéries survivantes sont cultivées une nuit en milieu 63 plus glucose puis transférées sur 63 + MGlU. Après 1,5 doublements, la pénicilline (1000 U.I./ml) est ajoutée (Gorini et Kaufman, 1960) et l'agitation maintenue 45 minutes. La pénicilline est éliminée par lavages, les bactéries diluées convenablement (survie inférieure à 1 %) et étalées sur milieu L. Les clones sont répliqués sur milieux gélosés: glucose et MGlU. Les clones: glucose⁺, MGlU⁻ sont réisolés et analysés.

Obtention de mutants résistant à l'inhibition de croissance sur milieu: glycérol + MGlU

La croissance d'une souche portant la mutation *eda* (Pouysségur, 1971) est inhibée dans un milieu contenant une source carbonée (glycérol) et un hexuronate ou le gluconate. Des mutants

interrompus dans le métabolisme amont de l'aldolase ne sont plus empoisonnés par l'accumulation de KDPG (2-céto-3-désoxy-6-P-gluconate) (Pouysségur, 1971). L'inhibition de croissance a lieu aussi sur le milieu: glycérol + MGlcU. Des cultures indépendantes de la souche A 314 (*eda*) préinduites ou non par le MGlcU sont étalées sur milieu glycérol + MGlcU, et incubées à 42° C. Les clones résistants apparus sont analysés à 42° et 33° C pour leur croissance sur: glycérol + MGlcU, glycérol + glucuronate et glycérol + galacturonate. Seuls sont conservés pour notre étude les clones résistants à l'empoisonnement en présence de MGlcU et donc susceptibles de n'être affectés que pour l'utilisation (perméation, hydrolyse ou régulation) de ce substrat. Aucun de ces mutants réisolés n'a montré de phénotype: Gur⁻ thermosensible. Ces mutants demeurés *eda* (et donc incapables de croître sur MGlcU) sont, avant toute étude génétique, transduits *eda*⁺ à l'aide d'un P1 sauvage pour cette enzyme.

Caractérisation des mutants Gur⁻

Les mutants Gur⁻ sont caractérisés par: — l'absence de croissance sur milieu minéral solide et liquide, additionné de MGlcU et une croissance normale dans les mêmes conditions sur glucose, glucuronate ou galacturonate (seuls certains mutants Gur B⁻ peuvent ne pas croître sur glucuronate et galacturonate: Novel, résultats inédits).

— l'absence ou la très faible présence de glucuronidase dans les extraits toluénisés de cellules induites par un ou deux passages sur MGlcU en présence de glycérol dans des conditions où la souche originelle sauvage montre une activité spécifique optimale.

— le test coloré négatif de l'hydrolyse du p-nitrophényl-β-D-glucuronide (pNPGlcU) sur milieu solide: glycérol + MGlcU. Le pNPGlcU peut être hydrolysé par l'enzyme induite au niveau de chaque clone isolé et le p-nitrophénol libéré colore différemment les clones où l'enzyme est présente. Le pNPGlcU (10⁻² M) est ajouté en présence de chloramphénicol (50 µg/ml) directement ou après toluénisation des clones: selon les conditions, la coloration se développe instantanément ou en l'espace de quelques minutes.

Dosage de la β-glucuronidase

La glucuronidase est dosée en tampon phosphate 2·10⁻² M au pH 7,1 en présence de 2-mercaptoéthanol 0,1 M (activateur de l'enzyme: Stoeber, 1961; Didier-Fichet et Stoeber, 1968). La réaction consiste à suivre l'hydrolyse du pNPGlcU (10⁻³ M) à 30° à 405 nm.

Produits chimiques

Le méthyl β-D-glucuronide utilisé dans ce travail a été synthétisé dans ce laboratoire par Mlle G. Montagné selon la méthode décrite par Stoeber (1961). Les autres produits sont commerciaux.

Obtention et caractérisation de réverses Gur⁺

Des cultures indépendantes de souches porteuses d'une mutation *uid A* cultivées pendant la nuit sur milieu L sont centrifugées, lavées et concentrées en milieu 63. 0,1 à 0,2 ml de la suspension est étalé sur milieu minéral gélosé + MGlcU. Eventuellement, un cristal de NTG est ajouté dans la boîte. L'incubation des boîtes a lieu à 28°, 37° ou 42° C. L'apparition de clones est suivie jusqu'au douzième jour. Les clones Gur⁺ sont réisolés sur même milieu et à la même température. L'analyse de leur croissance sur MGlcU aux trois températures indiquées est faite par répliques. L'indice de constitutivité est donné par la coloration du pNPGlcU sur milieu minéral plus glycérol en l'absence du MGlcU inducteur. Pour certains de ces mutants réverses, l'analyse de la croissance est poursuivie en milieu liquide et le dosage de la glucuronidase réalisé après toluénisation de cellules induites ou non induites.

Extraction de la glucuronidase

Les souches utilisées sont induites pour la glucuronidase à 37° pour le P4X et à 28° C pour la souche réverse thermosensible: RN183. La récolte a lieu en fin de phase exponentielle: les cellules sont lavées par centrifugation et remises en suspension en tampon phosphate 2·10⁻² M (pH 7,1).

Les suspensions cellulaires dans ces essais contiennent environ 5 à 6 mg/ml de poids sec bactérien. Elles sont traitées à l'oscillateur sonique (modèle CRIC) pendant 10 minutes à 0° C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et les extraits stockés à +5° C avant utilisation.

Inactivation thermique de la glucuronidase

Au temps zéro, l'extrait est dilué 5 fois dans du tampon phosphate préincubé à la température choisie. L'inactivation est arrêtée par dilution (6 fois) d'une partie aliquote de l'extrait dans le même tampon maintenu à 0° C.

Résultats

I. Localisation génétique de la mutation uid A 1: mutant GM 291

Par mutagenèse à l'acide nitreux deux mutants *Gur*⁻ demeurés glucuronate⁺ et galacturonate⁺ ont été obtenus. L'activité spécifique de la glucuronidase chez ces deux souches induites par deux cultures successives sur glycérol plus MGlcU est inférieure à 1% de l'activité correspondante chez la souche sauvage (P4X). L'un de ceux-ci le GM291 a été étudié en détail.

Résultats de conjugaison. Des croisements préliminaires du mutant GM291 (Hfr: P4X, *met B*, *str-s*, *uid A 1*, lysogène pour le phage λ) avec des F⁻ marquées dans la région: *his...trp...gal...* et (λ)⁺ ont permis de placer cette mutation entre le locus *his* (38 ème minute) et *trp* (25 ème minute). Un croisement ultérieur de ce mutant avec la souche GM146 (*aro D*, *his*) montre une forte liaison entre *uid A* et *aro D* et suggère l'ordre: O (P4X)...*his...aro D...uid A* (Tableau 2).

La localisation par conjugaison interrompue des marqueurs *aro D* (Taylor et Thoman, 1964) et *man* (Taylor et Trotter, 1967; Markovitz, Sydiskis et Lieberman, 1967) à partir du locus *his* n'a pas défini l'ordre réel de ces loci. La construction d'une souche *aro D*, *man* (S343) nous a permis de déterminer la place exacte des marqueurs utilisés: du croisement de S343 avec deux Hfr de polarité opposée Hfr H et P4X (Tableau 3) nous déduisons l'ordre: O (P4X)...*his...aro D...man*.

La place d'*uid A* est donnée par le croisement entre le GM291 et S343: *uid A 1* est transmis chez 33% des *aro*⁺ et 90% des *man*⁺; les recombinants directs *man*⁺ *aro*⁺ sont presque tous *uid A*⁻ (97,5%); l'analyse des classes parmi les recombinants *aro*⁺ (Tableau 3) est conforme à l'ordre: O (P4X)...*his...aro D...uid A...man*.

Tableau 2. Ordre des marqueurs: *his*, *aro D*, *uid* déterminé par conjugaison

Souche donatrice (Hfr)	Souche réceptrice (F ⁻)	Marqueurs sélectionnés	Nombre analysé	Pourcentage de transmission des marqueurs non sélectionnés			
				<i>met B</i>	<i>his</i>	<i>aro D</i>	<i>uid</i>
GM291	GM146	<i>his</i> ⁺ (<i>met</i> ⁺)	54	—	—	28	33,5
<i>met B</i>	+	<i>his</i> ⁺ (<i>str-r</i>)	50	8	—	20	26
+	<i>his</i>						
+	<i>aro D</i>	<i>aro</i> ⁺ (<i>met</i> ⁺)	55	—	47	—	71
<i>uid A-1</i>	+	<i>aro</i> ⁺ (<i>str-r</i>)	48		46	—	58
<i>str-s</i>	<i>str-r</i>	{ <i>his</i> ⁺ <i>aro</i> ⁺ (<i>met</i> ⁺)	46	—	—	—	72

Tableau 3. Ordre des marqueurs de la région *his*, *aro D*, *uid*, *man*, obtenu par conjugaison

Souche donatrice (Hfr)	Souche réceptrice (F ⁻)	Marqueurs sélectionnés	Nombre	Pourcentage de transmission des marqueurs non sélectionnés		
				<i>aro</i>	<i>uid</i>	<i>man</i>
GM291 (P4X)	S343	<i>aro</i> ⁺ (<i>str-r</i>)	208	—	33	31
		<i>man</i> ⁺ (<i>str-r</i>)	129	73,5	90	—
HfrH	S343	<i>aro</i> ⁺ (<i>str-r</i>)	110	—		73

Analyse génétique des recombinants aro⁺, str-r (GM 291 × S343)

Nombre analysé	Classes =	<i>uid</i> , <i>man</i> ⁺	<i>uid</i> ⁺ , <i>man</i> ⁺	<i>uid</i> , <i>man</i>	<i>uid</i> ⁺ , <i>man</i>
125		47	3	6	69

Si l'ordre est: ...*aro D*...*uid A*...*man*, la classe la moins représentée (*uid*⁺, *man*⁺) exige pour sa formation un double crossing-over. La proximité des deux marqueurs *uid* et *man* et en conséquence la faible probabilité d'apparition d'un crossing-over entre eux, explique la faiblesse relative de la classe (*uid*, *man*).

Résultats de transduction. Par transduction, nous avons réussi à relier *aro D* et *uid A1* (Tableau 4); mais le taux de cotransduction reste faible (entre 1 et 2%). Par contre, la transduction de l'allèle *man*⁺ à partir du P1 (GM291: *uid A1*) sur la souche K63 (*man*) montre que *uid A1* cotransduit très fortement avec ce marqueur (93% de cotransduction). La place d'*uid A* à l'intérieur du segment *aro D-man* est confirmée par le résultat suivant: dans la transduction de la souche GM290 (*aro D*, *uid A1*) par le P1 (K63: *man*) aucun recombinant *aro*⁺ devenu *uid*⁺ n'a acquis *man*⁺. Le Tableau 4 montre qu'à aucun moment nous n'avons réussi à cotransduire *aro D* et *man* (En fait, d'autres résultats rapportés plus loin montre que ces deux marqueurs sont cotransductibles mais à très faible fréquence: Tableau 6). Nous avons vérifié que conformément aux données de Brice et Kornberg (1967) les marqueurs *pps* et *aro D* sont fortement cotransductibles (Tableau 4). Par contre, *uid A1* ne cotransduit que faiblement avec *pps* (2% d'*uid*⁺ parmi les *pps*⁺). L'ordre des marqueurs *pps*...*aro D*...*uid A1*...est suggéré par l'analyse des recombinants *pps*⁺ (Tableau 5): la classe *pps*⁺ (*aro*, *uid A*) non représentée nécessiterait pour apparaître la probabilité d'un quadruple crossing-over. Chez les *aro*⁺, aucun quadruple crossing-over n'est exigé et les deux classes faiblement représentées correspondent à une faible cotransduction entre les marqueurs *aro D*, *pps* et *uid A*. Ceci est confirmé par l'absence de transmission de *aro D* et *pps* parmi 117 clones *man*⁺ et 147 *uid*⁺ obtenus dans la transduction de la souche S407 (*uid A1*, *man*) par le P1 (GM157, *aro D*, *pps*) (Tableau 4).

Très récemment, Russell et Pittard (1971) ont établi avec la souche K6-1 (*pps*) chez 3 mutants affectés de manière thermosensible pour l'activité phénylalaninyl-ARNt-synthétase la cotransduction de leur mutation (38—44 et 43%) avec le marqueur *aro D* et leur appartenance probable au locus *phe S* défini par Böck et Neidhardt (1967). Pour l'une de ces mutations, ils définissent l'ordre...*phe S*...*pps*...*aro D*. L'analyse des recombinants *phe S*⁺ (Tableau 4) obtenus lors de transductions de la souche NP37 (*phe S*) par le P1 (GM290: *aro D*, *uid A1*) ou

Tableau 4. Résultats des transductions concernant la mutation *uid A-1*

Souche donatrice (P1)	Souche réceptrice	Recombinants sélectionnés	Nombre	Pourcentage de transmission des caractères non sélectionnés				
				<i>phe S</i>	<i>pps</i>	<i>aro D</i>	<i>uid</i>	<i>man</i>
GM291 (<i>uid A-1</i>)	K 63 (<i>man</i>)	<i>man</i> ⁺	218				93	—
K 63 (<i>man</i>)	GM291 (<i>uid A-1</i>)	<i>uid</i> ⁺	116				—	86
GM291 (<i>uid A-1</i>)	GM146 (<i>aro D</i>)	<i>aro</i> ⁺	245			—	1,6	
GM146 (<i>aro D</i>)	GM291 (<i>uid A-1</i>)	<i>uid</i> ⁺	153			(<0,7) ^a	—	
GM157 (<i>aro D, pps</i>)	S407 (<i>man, uid A-1</i>)	<i>man</i> ⁺	117		(<0,9)	(<0,9)	89	—
	S407 (<i>man, uid A-1</i>)	<i>uid</i> ⁺	147		(<0,7)	(<0,7)	—	77
GM291 (<i>uid A-1</i>)	GM157 (<i>aro D, pps</i>)	<i>aro</i> ⁺	434		88	—	0,7	
	GM157 (<i>aro D, pps</i>)	<i>pps</i> ⁺	277		—	77	2	
K63 (<i>man</i>)	GM290 (<i>aro D, uid A-1</i>)	<i>aro</i> ⁺	165			—	2,5	(<0,6)
GM290 (<i>aro D, uid A-1</i>)	NP37 (<i>phe S</i>)	<i>phe</i> ⁺	97	—		37	(<1)	
S407 (<i>man, uid A-1</i>)	NP37 (<i>phe S</i>)	<i>phe</i> ⁺	43	—			(<2)	(<2)

^a Les pourcentages donnés entre parenthèses () n'ont qu'une valeur indicative: ils signifient que le marqueur concerné n'a pas été transmis parmi le nombre de recombinants sélectionnés.

Tableau 5. Ordre génétique des marqueurs ...*pps*, *aro D*, *uid*, déterminé par transduction

Souche donatrice (P1)	Souche réceptrice	Marqueurs sélectionnés	Nombre analysé	Marqueurs non sélectionnés			
				<i>pps</i> ⁺ , <i>uid</i> ⁺	<i>pps</i> ⁺ , <i>uid</i>	<i>pps</i> , <i>uid</i> ⁺	<i>pps</i> , <i>uid</i>
GM291 <i>uid</i> + +	GM157 + <i>aro D</i> <i>pps</i>	<i>aro</i> ⁺	434	381	0	50	3
				<i>aro</i> ⁺ , <i>uid</i> ⁺	<i>aro</i> ⁺ , <i>uid</i>	<i>aro</i> , <i>uid</i> ⁺	<i>aro</i> , <i>uid</i>
		<i>pps</i> ⁺	277	206	6	65	0

La classe non représentée (*aro*, *uid*) parmi les *pps*⁺ est conforme à l'ordre: *pps*...*aro*...*uid*, une telle classe nécessitant la formation d'un quadruple crossing-over. Une classe homologue ne peut exister parmi les *aro*⁺ selon l'ordre défini ci-dessus; la classe (*pps*, *uid*) serait compatible avec l'ordre: *aro* ... *pps* ... *uid*, mais l'absence des recombinants (*pps*⁺, *uid*) ne serait alors pas expliquée.

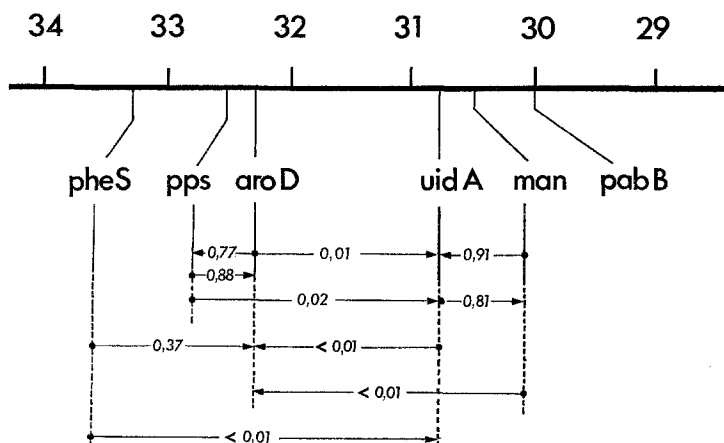


Fig. 3. Détail de la carte chromosomique d'*Escherichia coli* K12 (de la minute 29 à la minute 34). Les distances entre marqueurs sont exprimées en fréquences de cotransduction: l'extrémité fléchée indique le marqueur non sélectionné

par le P1 (S407: *man*, *uid A1*) confirme la cotransduction de *phe S* avec *aro D* (37% contre 33%: Böck et Neidhardt, 1967) mais ne montre aucun passage (0/97) d'*uid A1* ni de *man* (0/43). Ce résultat joint à ceux de Russell et Pittard confirme que le segment *phe S-pps* est à l'extérieur du segment *aro D-uid A-man*.

En résumé, nous avons localisé la mutation *uid A1* sur la carte chromosomique d'*Escherichia coli* K12: le locus *uid A* ainsi défini est fortement lié au locus *man* et faiblement lié à *aro D*. Par conjugaison et par transduction, nous avons montré que la position relative de *man* par rapport à *aro D* était incorrecte (Taylor, 1970). Le déplacement de *man* l'éloigne du marqueur *old D* (minute 34): ce que confirment les résultats de conjugaison obtenus avec ces deux marqueurs par Pouys-ségur (1971) et l'absence de cotransduction de ceux-ci (communication personnelle de P. Overath à J. Pouys-ségur). En prenant comme point de référence *aro D* (lui-même placé par conjugaison interrompue à la minute 32 à partir du locus *his*) et selon les données de Taylor et Trotter (1967), *uid A* et *man* doivent se situer à environ 1,5 minutes d'*aro D* soit vers la minute 30,5, l'ordre des marqueurs étant: (Fig. 3): *his...phe S...pps...aro D...uid A...man...trp*.

Résultats de F-duction. Deux épisomes obtenus par K. B. Low (1968) et couvrant en partie la région entre *his* et *trp* ont été croisés avec des souches porteuses des mutations *aro D*, *uid A1* et *man* pour l'obtention de clones sauvages pour ces marqueurs.

Dans un croisement entre le F148 et la souche GM290 (*aro D*, *uid A1*) seule l'obtention des *aro*⁺ est très facile, celle des *Gur*⁺ s'est avérée jusqu'à présent négative. Parmi 205 clones réisolés *aro*⁺, aucun n'a jamais montré de phénotype *Gur*⁺. De même, cet épisome croisé avec la souche S407 (*uid A1*, *man*) n'a pas permis d'obtenir de clones *man*⁺ ou *Gur*⁺.

Le F123 qui couvrirait les minutes 25 à 29 est capable de former de nombreux clones *trp*⁺ dans un croisement avec la souche S233 (*trp*, *uid A1*) mais est incapable de rendre *Gur*⁺ cette souche et *man*⁺ la souche S407 (*man*, *uid A1*).

Tableau 6. Localisation par transduction de diverses mutations *uid*: liaison avec *man* et *aro D*

Souche donatrice (P1)	Souche réceptrice	Marqueurs sélectionnés	Nombre analysé	Pourcentage de transmission des marqueurs non sélectionnés		
				<i>aro D</i>	<i>uid</i>	<i>man</i>
GM241 (a) (<i>uid A 2</i>) ^a	K 63	<i>man</i> ⁺	98		91	—
	S343	<i>man</i> ⁺	192	(<0,5) ^b	83	—
		<i>aro</i> ⁺	153	—	2	2
GM241 (f) (<i>uid A 2</i>) ^a	K 63	<i>man</i> ⁺	89		93	—
	S343	<i>man</i> ⁺	42	(<2,5)	93	—
		<i>aro</i> ⁺	48	—	(4)	(2)
MD11 (<i>uid A 3</i>)	K 63	<i>man</i> ⁺	93		97	—
	S343	<i>man</i> ⁺	12		(92)	—
		<i>aro</i> ⁺	47	—	(2)	(2)
TR73 (<i>uid A 4</i>)	S343	<i>man</i> ⁺	221	0,5	93,5	—
		<i>aro</i> ⁺	232	—	0,9	1
TR88 (<i>uid A 6</i>)	S343	<i>man</i> ⁺	96	(<1)	92	—
		<i>aro</i> ⁺	93	—	(<1)	(<1)
K 63	AJ5 (<i>uid A 5</i>)	<i>uid</i> ⁺	272		—	73
S343	AJ5 (<i>uid A 5</i>)	<i>uid</i> ⁺	171	(<0,6)	—	69,5
S343	AJ8RU3 (<i>uid A 7</i>)	<i>uid</i> ⁺	38		—	68,5
	AJ8RU2 (<i>uid A 7</i>)	<i>uid</i> ⁺	33		—	57,5
GM291 (<i>uid A 1</i>)	K 63	<i>man</i> ⁺	218		93	—
K 63	GM 291 (<i>uid A 1</i>)	<i>uid</i> ⁺	116		—	86
GM291 (<i>uid A 1</i>)	GM146	<i>aro</i> ⁺	245	—	1,6	
GM157	S407	<i>man</i> ⁺	117	(<0,9)	89	—
	(<i>uid A 1</i>)	<i>uid</i> ⁺	147	(<0,7)	—	77

Les caractères intéressants des souches *uid A*⁺ utilisées sont: K63 (*man*) et S343 (*man aro D*).

Les principaux résultats de transduction concernant la mutation de référence: *uid A 1* (Tableau 4) sont rappelés ici pour comparaison. En particulier, on note que la transduction réciproque avec sélection *uid*⁺ diminue le taux de cotransduction entre *man* et *uid A*.

^a GM241 (f) est un variant Mal⁺ apparu lors des repiquages successifs de la souche; GM241 (a) a le phénotype originel Mal⁻.

^b Les valeurs entre parenthèses () ne sont données qu'à titre indicatif: négatives, elles signifient qu'aucun recombinant isolé n'a acquis le caractère cité; positives, que le nombre de recombinants réisolés est trop faible pour que la valeur calculée soit fortement significative

L'incapacité du F148 de rendre Gur⁺ ou *man*⁺ la souche S407 comme elle rend *aro*⁺ la souche GM290 n'est pas en contradiction avec la nouvelle localisation de *man* et d'*uid A*; on ne peut cependant pas exclure que ces caractères négatifs

Tableau 7. Localisation génétique par conjugaison de mutations réverses portées par des mutants originellement *uid A*. Comparaison avec la mutation *uid A 1*

Mutation primaire	Donneur Hfr (P4X)	Réceptrice	Recombinants sélectionnés	Nombre analysé	Pourcentage de transmission du marqueur <i>Gur</i> ⁺ non sélectionné
<i>uid A 1</i>	RN183 (<i>Gur</i> ⁺)	GM290 (<i>uid A 1</i> , <i>aro D</i>)	<i>aro</i> ⁺ (<i>met</i> ⁺ , <i>str-r</i>)	99	41
<i>uid A 4</i>	RS143 (<i>Gur</i> ⁺)	S482 (<i>uid A 4</i> , <i>aro D</i>)	<i>aro</i> ⁺ (<i>met</i> ⁺ , <i>str-r</i>)	44	48
<i>uid A 6</i>	RS141 (<i>Gur</i> ⁺)	S428 (<i>uid A 6</i> , <i>aro D</i>)	<i>aro</i> ⁺ (<i>met</i> ⁺ , <i>st-r</i>)	46	37
<i>uid A</i> ⁺	P4X	GM290 (<i>uid A 1</i> , <i>aro D</i>)	<i>aro</i> ⁺ (<i>met</i> ⁺ , <i>str-r</i>)	64	45

Le pourcentage faible de cotransmission obtenu entre *Gur*⁺ et *aro D* dans ces croisements n'est que le résultat de la double contre-sélection utilisée (*met*⁺, *str-r*), (comparer aux résultats des Tableaux 2 et 4) comme le montre le croisement témoin entre le P4X sauvage et une des mutations négatives originelles *uid A 1*.

résultent de délétions affectant certains gènes de l'épisome ou de propriétés particulières à cette mutation *man* (Markovitz *et al.*, 1967).

II. Localisation génétique d'autres mutations *uid A*

D'autres mutations indépendantes avaient été localisées de manière préliminaire (Didier-Fichet, Novel, résultats non publiés) dans la région maintenant définie par le locus *uid A*. La possibilité de relier ce locus au marqueur *man* par un taux élevé de cotransduction a rendu plus aisée la localisation précise de ces mutations. Un stock de phages P1 préparé sur chaque mutant a servi à transduire l'allèle *man*⁺ sur les souches K63 (*man*) ou S343 (*aro D*, *man*) (Tableau 6).

Ainsi fut vérifié pour 4 mutants indépendants (*uid A 2*, 3, 4 et 6) qu'ils appartenaient bien au locus *uid A*. Le taux de cotransduction de ces mutations avec *man*⁺ est très élevé (91—97%) et faible avec *aro D* (1—2%). Dans le cas des mutations *uid A 2*, 3 et 4, le marqueur *man* se révèle cotransductible à faible fréquence (1 à 2% maximum) avec le marqueur sélectionné *aro*⁺. Des 8 clones *aro*⁺ *man*⁺ obtenus lors de ces transductions, 7 ont reçu l'allèle *uid A* du donneur (l'unique *aro*⁺ *man*⁺ *uid A*⁺ est issu du donneur *uid A 4*). Ce résultat confirme la place d'*uid A* entre *aro D* et *man*.

Quant aux souches AJ5 et AJ8 (Jimeno-Abendano, 1968) la localisation de leur mutation en *uid A* n'a été possible que par sélection après transduction de l'allèle *uid*⁺ (Tableau 6). En effet, ces souches dérivées de l'Hfr H (K12 S3000 de l'Institut Pasteur de Paris) se sont révélées résistantes à tout transfert génétique et rebelles à l'infection lytique par le phage P1, probablement à la suite de l'acquisition d'un facteur colicinogène (M. Novel, résultats inédits).

III. Signification du locus *uid A*

a) *Les mutants réverses des souches AJ5 et AJ8.* Certains réverses Gur⁺ d'AJ5 et d'AJ8 possèdent une glucuronidase thermosensible (Didier-Fichet *et al.*, 1968). L'appartenance de ces deux mutations primaires au locus *uid A* est un premier indice sur la nature structurale du gène ainsi localisé. Cependant l'impossibilité d'une étude génétique approfondie de ces souches nous a conduit à abandonner leur étude et à rechercher des mutants réverses directement à partir des mutations primaires.

b) *Les mutants réverses à croissance thermosensible sur MglcU.* Nous avons obtenu des mutants réverses indépendants à partir des souches porteuses des mutations *uid A1*, 4 et 6: le taux apparent de réversion est dans tous les cas extrêmement faible (environ 1 pour 10¹⁰ bactéries). De manière inattendue, aucun mutant n'est apparu à faible température (28° C) mais seulement à 37° et 42° C. Contrairement aux réverses des souches AJ5 et AJ8 la biosynthèse de la glucuronidase chez ces souches n'est jamais constitutive. Seuls les réverses de la mutation *uid A1* bien qu'obtenus à température élevée montrent une croissance thermosensible en milieu solide sur MglcU.

La localisation génétique de certaines de ces mutations réverses révèle qu'elles se sont produites comme les mutations originelles au locus *uid A* défini ici par sa liaison — par conjugaison — avec le marqueur *aro D* (Tableau 7).

c) *Etude du mutant réverse RN183.* Ce mutant a été obtenu à 37° C à partir de la souche originelle GM291 (*uid A1*) en présence de NTG. Sur milieu solide, sa croissance sur MglcU étudiée par répliques est fortement affaiblie à 42° C comparée à 37° et 28° C. Sa croissance est normale et comparable à celle de la souche sauvage P4X sur Glucose aux trois températures. L'étude de la croissance en milieu liquide est malheureusement perturbée aux fortes températures par la thermosensibilité de la souche P4X (*met B*) et à toutes températures par la forte répressibilité de la glucuronidase chez les deux souches après croissance sur un milieu non inducteur.

La sensibilité thermique de la glucuronidase extraite de ce mutant est considérablement augmentée en comparaison de celle de l'enzyme de la souche homologue sauvage (P4X) induite dans les mêmes conditions par le MglcU. A 58° C, température où l'enzyme des souches sauvages montre une demi-vie d'environ 11 minutes (Didier-Fichet *et al.*, 1968; Novel, résultats inédits), la glucuronidase du RN183 est complètement inactivée au cours des 5 premières minutes d'exposition. A 35° et 37° C, l'activité de l'enzyme sauvage n'est pratiquement pas abaissée même après 50 minutes d'exposition: en comparaison, la glucuronidase du RN183 perd 60—65% d'activité en 5 minutes (Fig. 4).

La cinétique d'inactivation de l'enzyme sauvage est exponentielle à 58° C jusqu'à 95% d'inactivation (Didier-Fichet *et al.*, 1968). Par contre, à 37° C l'enzyme du mutant est d'abord inactivée de manière extrêmement rapide pendant les 10 premières minutes, ensuite et jusqu'à 96% d'inactivation l'activité de l'enzyme décroît exponentiellement. A 35° C, cette phase exponentielle existe aussi mais la courbe devient biphasique quand l'activité résiduelle est inférieure à 10%.

L'apparition de telles courbes bi-(ou pluri-) phasiques dans les cinétiques d'inactivation thermique ne reflète pas obligatoirement l'existence de populations

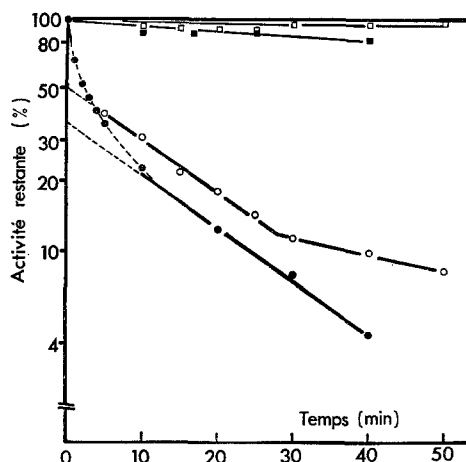


Fig. 4. Inactivation thermique de la β -D-glucuronidase. Cinétiques d'inactivation thermique comparée d'extraits glucuronidasiques induits par MGlcU: de RN183 (—○— à 35° C; —●— à 37° C) de P4X (—□— à 35° C; —■— à 37° C)

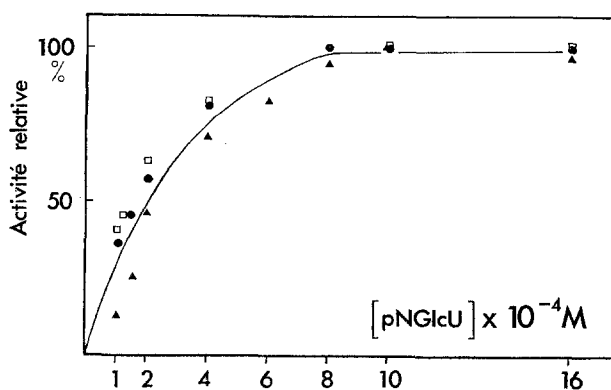


Fig. 5. Effet de la concentration en pNPGlcU sur l'activité de la glucuronidase. La glucuronidase est extraite de la souche RN183 (—●—), AJ5R1 (—□—) et GM230 (—▲—). L'activité mesurée pour chaque concentration de pNPGlcU est portée en pourcentage d'activité mesurée à la concentration standard de pNPGlcU (10^{-3} M)

moléculaires distinctes (Reiner, 1964; Jimeno-Abendano, 1968; Robert-Baudouy, 1971; Novel, résultats inédits). La protection des molécules enzymatiques par les protéines inactivées peut expliquer l'existence de telles phases. Dans la Fig. 4, le déplacement du seuil d'inactivation exponentielle quand la température est augmentée de 35° à 37° C est en faveur de l'existence d'un tel artefact.

La thermosensibilité si différente de l'enzyme restaurée et de l'enzyme sauvage pourrait laisser penser que la mutation réverse a permis l'expression d'une protéine douée d'une activité nouvelle glucuronidasique. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé certaines propriétés biochimiques de cette enzyme avec celles

Tableau 8. Constantes d'affinité de la glucuronidase pour le pNPGlcU et constantes d'inhibition de l'enzyme par le glucuronate en présence de pNPGlcU

Extrait glucuronidase de la souche	K _m (pNPGlcU)	K _i (glucuronate)
GM230	2,2 10 ⁻⁴ M (2)	0,8 10 ⁻² M (1)
AJ5R1	2,3 10 ⁻⁴ M (3)	0,5 10 ⁻² M (2)
RN183	2,8 10 ⁻⁴ M (2)	0,7 10 ⁻² M (1)

La glucuronidase est extraite de la souche inductible RN183 et des souches constitutives GM230 et AJ5R1. La détermination des K_m a été réalisée graphiquement selon les coordonnées de Lineweaver et Burk. L'échelle des concentrations de pNPGlcU employées va de 10⁻⁴ M à 10⁻³ M. La détermination des K_i a été faite directement selon le graphique de Dixon (1953). La gamme de concentrations de glucuronate utilisée va de 1 à 5 10⁻² M: celle du pNPGlcU de 1 à 4 10⁻⁴ M. Les K_m et les K_i sont définis dans les conditions standard du dosage. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre d'essais effectués pour obtenir la valeur donnée.

de la glucuronidase extraite — d'une part, d'une souche sauvage pour le gène *uid A* (GM230) — d'autre part, d'une souche réverse Gur⁺ de la mutation *uid A 5* (AJ5 R1). Chez ces deux dernières souches, au contraire du RN183, la biosynthèse de l'enzyme est devenue constitutive (Didier-Fichet *et al.*, 1968; Novel et Novel, à paraître).

La Fig. 5 montre que les courbes de saturation de ces enzymes par le pNPGlcU sont identiques; le Tableau 8 montre que les K_m pour ce substrat sont très comparables et que la constante d'inhibition de la glucuronidase par le glucuronate en présence de pNPGlcU est de même ordre de grandeur pour les trois extraits enzymatiques.

La similitude des propriétés des extraits glucuronidasiques de la souche RN183 et de deux autres souches différant entre elles en particulier par leur thermosensibilité rend peu probable l'hypothèse de la synthèse par réversion d'une protéine nouvelle dotée de cette activité. Enfin, la localisation de la mutation réverse du RN183 au même locus que la mutation primaire: en *uid A* (Tableau 7) permet d'affirmer que les mutations étudiées réverse et primaire définissent bien en ce locus le gène de structure de la glucuronidase.

Remerciements. Nous tenons à remercier vivement tous ceux qui ont mis si généreusement à notre disposition les souches utilisées au cours de ce travail et en particulier J. Puig qui nous a enseigné les techniques d'étude de la génétique bactérienne et n'a cessé de nous prodiguer ses conseils et ses encouragements.

Les études biochimiques ont été réalisées grâce à l'excellente collaboration technique de Melle G. Couchoux.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Biologie Moléculaire) et du Centre National de la Recherche Scientifique (Equipe de Recherche associée au CNRS n° 177). Pour une part, il a été réalisé au cours d'un stage au Laboratoire de Chimie Bactérienne de Marseille (C.N.R.S.).

Bibliographie

- Adelberg, E.A., Mandel, M., Chein-Ching-Chen, G.: Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. Biochem. biophys. Res. Commun. 18, 788—795 (1965).

- Baudouy-Robert, J., Didier-Fichet, M.L., Jimeno-Abendano, J., Novel, G., Portalier, R., Stoeber, F.: Modalités de l'induction des six premières enzymes dégradant les hexuronides et les hexuronates chez *Escherichia coli* K12. C. R. Acad. Sci. (Paris) **271**, 255—258 (1970).
- Böck, A., Neidhardt, F.C.: Genetic mapping of phenylalanyl-s-RNA synthetase in *Escherichia coli* K12. Science **157**, 78—79 (1967).
- Brice, C.B., Kornberg, H.L.: Location on the chromosome of *Escherichia coli* of a gene specifying phosphopyruvate synthase activity. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **136**, 412—414 (1967).
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J., Hartman, P.E.: A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics **54**, 61—76 (1966).
- Didier-Fichet, M.L., Stoeber, F.: Sur les propriétés et la biosynthèse de la β -glucuronidase d'*Escherichia coli* K12. C. R. Acad. Sci. (Paris) **266**, 2021—2024 (1968).
- Dixon, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. **55**, 170—171 (1953).
- Gorini, L., Kaufman, H.: Selecting bacterial mutants by the penicillin method. Science **131**, 604—605 (1960).
- Huang, M., Pittard, J.: Genetic analysis of mutant strains of *Escherichia coli* requiring p-aminobenzoic acid for growth. J. Bact. **91**, 1938—1942 (1967).
- Jacob, F., Wollman, E.: Sexuality and the genetics of bacteria. New York: Academic Press 1961.
- Jimeno-Abendano, J.: Recherches sur les propriétés et la biosynthèse de la D-altronate hydrolyase chez *Escherichia coli* K12. Thèse de Docteur-ingénieur, Lyon (1968).
- Lennox, E.S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology, **1**, 190—206 (1955).
- Low, B.: Formation of merodiploids in matings with a class of *rec*⁺ recipient strains of *Escherichia coli* K12. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **60**, 160—167 (1968).
- Markovitz, A., Sydiskis, R.J., Lieberman, M.M.: Genetic and biochemical studies on man-nose-negative mutants that are deficient in phosphomannose isomerase in *Escherichia coli* K12. J. Bact. **94**, 1492—1496 (1967).
- Novel, G., Novel, M., Didier-Fichet, M.L., Stoeber, F.: Etude génétique du système de dégradation des hexuronides chez *Escherichia coli* K12. C. R. Acad. Sci. (Paris) **271**, 457—460 (1970).
- Novel, M., Novel, G.: Mutations *gur*: localisation précise du locus *gur* A gène de structure de la β -glucuronidase chez *Escherichia coli* K12. C. R. Acad. Sci. (Paris) **273**, 2691—2693 (1971).
- Overath, P., Pauli, G., Schairer, H.U.: Fatty acid degradation in *E. coli*: an inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of *old*-mutations and the isolation of regulatory mutants. Europ. J. Biochem. **7**, 559—574 (1969).
- Pittard, J., Wallace, B.J.: Distribution and functions of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Bact. **91**, 1494—1508 (1966).
- Pouysségur, J.: Localisation génétique de mutations 2-céto-3-désoxy-6-P-D-gluconate aldolase négatives chez *Escherichia coli* K12. Molec. gen. Genet. **113**, 31—42 (1971).
- Reiner, J.M.: Quantitative aspects of enzymes and enzyme systems. Comprehensive Biochemistry, éd. M. Florkin et E.H. Stotz, vol. 12., Ch. V, p. 158—162. Amsterdam: Elsevier Publ. Co. 1964.
- Robert-Baudouy, J.: Propriétés, purification et individualité de la D-mannonate hydrolyase. Thèse de Docteur de spécialité, Lyon (1971).
- Russell, R.R.B., Pittard, A.J.: Mutants of *Escherichia coli* unable to make protein at 42° C. J. Bact. **108**, 790—798 (1971).
- Schwartz, D.O., Beckwith, J.R.: Mutagens which cause deletions in *Escherichia coli*. Genetics **61**, 371—376 (1969).
- Sistrom, W.R.: On the physical state of the intracellularly accumulated substrates of β -galactoside permease in *Escherichia coli*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **29**, 579—587 (1958).
- Stoeber, F.: Etudes des propriétés et de la biosynthèse de la glucuronidase et de la glucuronide-perméase chez *Escherichia coli*. Thèse de Docteur ès Sciences, Paris (1961).
- Swanstrom, M., Adams, M.H.: Agar layer method for production of high titer phage stocks. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **78**, 372—375 (1951).
- Taylor, A.L.: Current linkage map of *Escherichia coli*. Bact. Rev. **34**, 155—175 (1970).

- Taylor, A.L., Thoman, M.S.: The genetic map of *Escherichia coli* K 12. *Genetics* **50**, 659—677 (1964).
- Taylor, A.L., Trotter, C.D.: Revised linkage map of *Escherichia coli*. *Bact. Rev.* **31**, 332—353 (1967).

Note ajoutée sur les épreuves. La mutation *man-1* portée par la souche K 63 a été obtenue par P. Overath (communication personnelle): elle est par conséquent distincte des mutations *man* déjà localisées respectivement par A. L. Taylor et A. Markovitz (références ci-dessus). Nous avons vérifié que la souche K 63 (*man-1*) présente un taux affaibli de synthèse de la phosphomanno-isomérase (PMI): le dixième de l'activité mesurée chez une souche *Man*⁺ (K 12: Hfr H). Les cultures sur glucose à 30°, les extraits soniques et les dosages de la PMI ont été réalisés selon Kang, S., Markovitz, A.; *J. Bact.* **93**, 584—591 (1967).

Mémoire présenté par F. Gros

Dr. Georges Novel
 Dr. Madeleine Novel
 Service de Microbiologie
 de l'Institut National
 des Sciences Appliquées de Lyon
 20, avenue Albert Einstein
 69 Villeurbanne
 France