

Rameau dégradatif commun des hexuronates chez *Escherichia coli* K12

Mécanisme d'induction des enzymes assurant le métabolisme du 2-céto-3-désoxy-gluconate

Jacques M. POUYSSÉGUR et François R. STOEBER

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

(Reçu le 26 avril/28 juin 1972)

After the recent investigation on the biochemical properties of the 2-keto-3-deoxy-gluconokinase and 2-keto-3-deoxy-6-phospho-gluconate aldolase in *Escherichia coli* K12, we report in this paper the induction mechanism of these two enzymes and the genetic control of a new enzymatic activity: the 2-keto-3-deoxy-gluconate transport system.

The D-glucuronate and D-galacturonate raise the high basal levels of the kinase and aldolase on glycerol by a factor of 5 and 3–4, respectively, the kinase and aldolase being enzymes of the common degradative pathway of D-glucuronate and D-galacturonate. The differential rates of synthesis of these two enzymes are constant from the addition of the galacturonate. Under a variety of conditions (different inducers and substrates of growth) kinase and aldolase have been found to be synthesized non coordinately. The strongest decoordination is carried out by gluconate: this compound which is a good inducer of the aldolase, not only is unable to induce the kinase but also represses it. Moreover, the aldolase seems to be less sensitive to the catabolic repression than the kinase.

By means of appropriate negative mutants we have established that the two hexuronates and two keto-uronates do not induce directly kinase and aldolase, but by sequential conversion into 2-keto-3-deoxy-gluconate. Furthermore, the fact that the hexuronates induce the kinase in aldolase-negative mutants (*kdg A*) and besides, “over” induce the aldolase in kinase negative mutants (*kdg K*) strongly suggests that 2-keto-3-deoxy-gluconate is a true inducer for both enzymes. In addition, the gluconate which still induces the aldolase in an *edd* strain suggests that, this compound and/or the 6-phospho-gluconate are/is also inducer(s) of this enzyme.

Moreover, we have isolated spontaneous mutants able to utilize the 2-keto-3-deoxy-gluconate as a unique carbon source. Two classes have been identified. The mutants of these classes which arise at high frequency (10^{-5} to 10^{-6}) are either simultaneously constitutive for a specific 2-keto-3-deoxy-gluconate transport system, kinase and aldolase (class *kdg R^c*) or only constitutive for the transport system (class *kdg P^c*). The 2-keto-3-deoxy-gluconate as exogenous substrate, which cannot induce its transport system in the wild type, behaves like a non-inducer substrate. So the strains *kdg R^c* and *kdg P^c* are respectively *i⁻* and *o^c* *lac*-like mutants. These findings and the fact that we have found thermosensitive mutants mapping in the *kdg R* locus (34.5 min) and which are simultaneously derepressed for the permease, kinase and aldolase at 42 °C but not at 28 °C, strongly suggest that the synthesis of the three sequential enzymes degrading the 2-keto-3-deoxy-gluconate is negatively controlled by a common regulator gene product. The decoordinated syntheses of these three enzymes are in agreement with the scattering of the corresponding operons on the chromosome: transport system operon (76.5 min), kinase operon (69 min), aldolase operon (34 min).

Le catabolisme des hexuronides et des hexuronates chez *Escherichia coli* K12, qui est sous la dépendance de huit activités enzymatiques inductibles, semblait fournir une base d'étude pour étendre et compléter notre connaissance des systèmes régulateurs de la biosynthèse des enzymes inductibles.

Enzymes. 2-céto-3-désoxy-6-phospho-D-gluconate aldolase (EC 4.1.2.14); 2-céto-3-désoxy-D-gluconate kinase (EC 2.7.1.45).

L'équipe d'Ashwell a élucidé en 1960 les différentes étapes métaboliques de la dégradation du D-glucuronate et du D-galacturonate chez la souche d'*E. coli* ATCC 9637 (Fig. 1) [1–4]. D'après ces travaux le 2-céto-3-désoxygluconate, intermédiaire commun aux deux voies parallèles dégradatives de ces deux composés, est phosphorylé en 2-céto-3-désoxy-6-phospho-gluconate, lui-même intermédiaire commun du catabolisme du gluconate. Ce métabolite, commun

à trois voies dégradatives est scindé en pyruvate et glyceraldéhyde-3-phosphate. L'étude biochimique des différentes étapes enzymatiques a été reprise et élargie chez la souche K12 d'*E. coli* [5-10]. Etant donné la pluralité des voies d'induction possibles pour certaines des activités enzymatiques, la plupart de ces recherches ont consisté à établir l'individualité de ces enzymes et notamment de la kinase et de l'aldolase catalysant des réactions communes à plusieurs séquences métaboliques (étapes IV et V du schéma Fig. 1). Ces études préliminaires, assorties de considération de nature physiologique que nous reprendrons en partie ici, ont permis de préciser les premières bases des différents groupes de régulation assurant le contrôle de la biosynthèse de ces enzymes inductibles [11,12]. Dans ce cadre, les deux dernières enzymes du tronc commun de dégradation des hexuronates, la 2-céto-3-désoxy-gluconate kinase et la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase appartiennent à un groupe de régulation distinct de ceux qui contrôlent la biosynthèse des enzymes des étapes précédentes.

L'étude de la coordination de l'induction de ces deux enzymes chez la souche sauvage, ainsi que l'isolement et l'étude de mutants devenus capables de métaboliser le 2-céto-3-désoxygluconate, nous ont permis de proposer un mécanisme de régulation de la biosynthèse des enzymes de ce rameau commun. D'après ce type d'expérimentation il apparaît une unité de régulation qui comprend, outre les deux enzymes ci-dessus, l'un des composants du système de transport spécifique du désoxy-ose, nouvelle activité enzymatique révélée chez des mutants affectés dans un élément régulateur. Cette unité physiologique de régulation dont il est question dans cet article se trouve largement confirmée par les résultats génétiques publiés [13,14] et à paraître (Pouysségur, J. & Stoeber, F.). Enfin, d'autres résultats mentionnés ici permettent d'établir la nature des inducteurs de la 2-céto-3-désoxygluconate kinase et de la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits chimiques

Le glucuronate de sodium, l'acide galacturonique et le gluconate de sodium utilisés comme substrats

inducteurs et de croissance proviennent respectivement des firmes Calbiochem, Serva et Sigma. Le D-mannonate de sodium et l'amide D-mannonique nous ont été généreusement fournis par le Dr Robert-Baudouy [25]. L'acide D-altronique a été synthétisé selon la méthode de Pratt et Richmyer [30]. Le 2-céto-3-désoxygluconate et le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate ont été synthétisés selon deux procédés que nous avons récemment publiés [31,27]. Une méthode de synthèse du 2-céto-3-désoxy[1-¹⁴C]-gluconate à partir du [6-¹⁴C]glucuronate (Radiochemical Centre, Amersham) vient d'être mise au point à l'aide d'un mutant 2-céto-3-désoxygluconate kinase négatif [18]. La lactate déshydrogénase type II est de marque Sigma, le glucose-6-phosphate et la 6-phosphogluconate déshydrogénase sont de marque Boehringer.

Cultures en milieu liquide

Les bactéries sont cultivées en milieu minéral M 63 [16], dans des conditions d'aérobiose (flores coniques agitées à 37 °C) et en présence d'une source de carbone utilisable. Pour les études d'induction la source énergétique peut être un milieu riche (bactotryptone + extrait de levure) ou dans la plupart des cas une source de carbone neutre à 2 mg/ml (glycérol) additionné des facteurs de croissance nécessaires selon la souche considérée. La nature et la concentration du substrat inducteur ou à tester sont indiquées dans les différents tableaux ou en légende des figures. La croissance bactérienne est estimée par turbidimétrie à 600 nm avec un spectrophotomètre Jean et Constant préalablement étalonné en poids sec bactérien et en nombre de cellules viables.

Techniques d'induction

Pour chaque source carbonée ou milieu riche utilisé comme substrat énergétique pour la culture d'induction, une préculture sur ce substrat est réalisée de manière à « adapter » physiologiquement la souche sur ce substrat de croissance avant l'addition du composé inducteur. La préculture arrêtée en phase exponentielle est centrifugée. Le culot bactérien resuspendu dans un faible volume de milieu M 63 sert à ensemercer au temps 0 la culture sur le

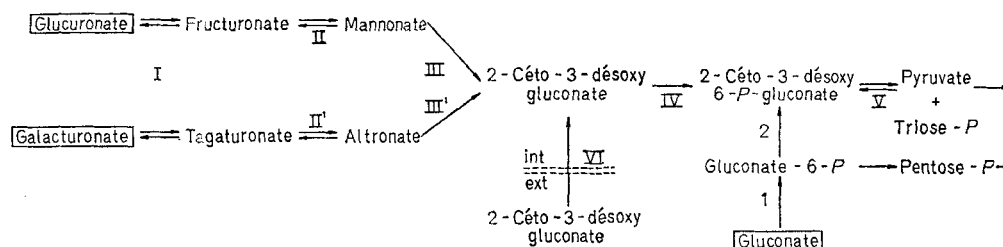


Fig. 1. Schéma d'utilisation des deux hexuronates, du 2-céto-3-désoxygluconate et du gluconate par *E. coli* K12

même milieu préchauffé à 37 °C additionné ou non selon le cas d'un inducteur (innoculum $3 \cdot 10^7$ bactéries/ml). Les prélèvements en cours de culture agitée à 37 °C sont immédiatement placés dans la glace, additionnés de chloramphénicol à 50 µg/ml et centrifugés. Les bactéries sont remises en suspension ($6 \cdot 10^8$ à 10^9 cellules/ml) dans le tampon KH_2PO_4 -KOH 10 mM, pH 7,0. Ces suspensions peuvent être conservées 24 heures à +4 °C sans modification des activités enzymatiques considérées. Les enzymes sont « extraites » par traitement au toluène (voir paragraphe correspondant) et leurs activités immédiatement dosées selon les conditions standard rappelées dans dosages enzymatiques.

Extractions enzymatiques

Pour les dosages nombreux nécessités par les études de cinétique d'induction, la 2-céto-3-désoxygluconate kinase et la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase sont dosées à partir des cellules traitées au toluène (addition de 0,1 ml de toluène pour 2 ml de suspension cellulaire et agitation 60 min à 37 °C). Les activités mesurées dans ces conditions sont proportionnelles à la densité cellulaire de la suspension au moins jusqu'à $3 \cdot 10^9$ bactéries/ml dans le cas de la kinase et $1,5 \cdot 10^9$ bactéries/ml dans le cas de l'aldolase. D'autre part, les activités spécifiques ainsi mesurées sont identiques à celles obtenues par une extraction aux ultra-sons à +2 °C pendant 10 min avec un appareil du type « Raytheon ». Les suspensions cellulaires extraites par ce procédé ont des densités cellulaires variant entre $3 \cdot 10^9$ et $3 \cdot 10^{10}$ bactéries/ml. Pour le dosage de la 6-phosphogluconate déshydrase, l'extraction au toluène dénature la quasi totalité de l'enzyme, aussi, seule l'extraction aux ultra-sons réalisée sur une suspension cellulaire dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 additionné de Fe^{++} (0,8 mM) et de β -mercaptoéthanol (50 mM), permet de révéler de façon satisfaisante l'activité déshydrasique.

Dosages enzymatiques

La 2-céto-3-désoxygluconate kinase est dosée en 2 temps. On incube à 37 °C pendant 10 ou 30 min un mélange de 2-céto-3-désoxygluconate, d'ATP et Mn^{++} en présence de l'extrait toluénisé à la dilution choisie. La réaction est arrêtée en portant le milieu à 100 °C pendant 2 min. Le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate formé est ensuite dosé dans le surnageant par couplage de l'action de la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase purifiée d'*E. coli* [9] et de la lactate déshydrogénase en présence de NADH. La 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase est dosée automatiquement à 30 °C avec un spectrophotomètre à double faisceau, en couplant en présence de NADH un excès de lactate déshydro-

génase à l'extrait toluénisé aldolasique. Un témoin approprié permet de corriger instantanément l'action parasite de la NADH oxydase de l'extrait brut. Dans ces conditions nous obtenons des cinétiques linéaires pendant plus de 10 min. Les conditions précises des dosages standard de ces deux enzymes (concentration des substrats et coenzymes, molarité et nature des tampons utilisés) ont été décrites ailleurs [9,10]. La gluconate kinase et la 6-phosphogluconate déshydrase sont dosées selon des conditions assez voisines de celles utilisées par Eisenberg *et al.* [17]. Le milieu réactionnel employé pour la gluconate kinase comprend: 2,5 µmol de gluconate de sodium; 5 µmol d'ATP; 2,5 µmol de MnCl_2 ; 1 µmol de NADP^+ , 80 µmol de tampon Tris-HCl de pH 7,6; 10 µg de 6-phosphogluconate déshydrogénase. Après incubation à 30 °C, la réaction est déclenchée par l'addition de l'extrait brut, et la formation de NADPH au cours du temps est enregistrée à 340 nm. La 6-phosphogluconate déshydrase est dosée en 2 temps: incubation à 30 °C de 20 µmol de tampon imidazole-HCl pH 8,0; 2 µmol de gluconate-6-phosphate; 0,8 µmol de FeSO_4 ; 50 µmol de β -mercaptoéthanol et de l'extrait brut à doser. La formation de 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate est arrêtée au temps désiré par un chauffage de 2 min à 100 °C. Le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate de ce surnageant est ensuite dosé dans les mêmes conditions que pour le dosage de la 2-céto-3-désoxygluconate kinase indiqué ci-dessus. La 6-phosphogluconate déshydrogénase est également dosée automatiquement par enregistrement de la formation de NADPH au cours du temps: aux 4 µmol de glucose-6-phosphate, 60 µmol de tampon Tris-HCl pH 7,6, 1 µmol de NADP^+ incubé à 30 °C est ajouté l'extrait brut à la dilution convenable.

Le système de transport du 2-céto-3-désoxygluconate est dosé sur des suspensions bactériennes (200 µg de poids sec/ml) incubées à 25 °C en présence de 2-céto-3-désoxy[1- ^{14}C]gluconate (0,2 mCi/mmol) à la concentration de 0,5 mM. Des prélèvements de 1 ml en fonction du temps sont filtrés sur millipore HA (diamètre 25 mm, pore 0,45 µm). Les filtres sont lavés, séchés, et leur radioactivité mesurée dans un compteur à scintillation. Le détail de cette technique sera précisé ailleurs (Lagarde, A., Pouysségur, J. & Stoeger, F., résultats inédits). Pour toutes ces enzymes, les activités spécifiques sont exprimées en µmol de substrat transformé/min (U) par mg de poids sec bactérien.

Souches bactériennes

Les cinétiques d'induction et les mesures d'activités spécifiques ont été réalisées sur les souches d'*E. coli* K12 Hfr H et Hfr P_4X (auxotrophe pour la méthionine). Les principaux phénotypes enzyma-

Tableau 1. *Souches utilisées*

Nous avons représenté par les symboles suivants: (+) la présence, (—) l'absence, (c) la nature constitutive de certaines des activités enzymatiques, elles-mêmes symbolisées de la manière qui suit: HLA = hydrolyase altronique (étape III'); HLM = hydrolyase mannonique (étape III); TKG = système de transport du 2-céto-3-désoxygluconate (étape VI); KIN = 2-céto-3-désoxy-gluconate kinase (étape IV); EDA = «Entner-Doudoroff-aldolase» (étape V); EDD = «Entner-Doudoroff-déshydrase» (étape 2). Mut. NTG = Mutagenèse à la *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine; Mut. spont. = Mutation spontanée

Souches		Caractères enzymatiques						Souches parentales	Mode d'obtention	Référence
		Voie des hexuronates				Voie du gluconate				
		HLA	HLM	TKG	KIN	EDA	EDD			
H	(Hfr)	+	+	+	+	+	+			J. Puig
P ₄ X	(Hfr)	+	+	+	+	+	+			E. Wollman
GN 74		+	—	+	+	+	+	H	Mut. NTG	ce laboratoire
AJ 1		—	+	+	+	+	+	H	Mut. NTG	ce laboratoire
K 01		+	+	+	—	+	+	P ₄ X	Mut. NTG.	ce laboratoire
K 3141		+	+	+	—	+	+	A 314	Mut. spont. + transduction <i>kdg A</i> ⁺	ce laboratoire
K 3142		+	+	+	—	+	+	A 314	Mut. spont. + transduction <i>kdg A</i> ⁺	ce laboratoire
K 3144		+	+	+	—	+	+	A 314	Mut. spont. + transduction <i>kdg A</i> ⁺	ce laboratoire
K 3145		+	+	+	—	+	+	A 314	Mut. spont. + transduction <i>kdg A</i> ⁺	ce laboratoire
A 314		+	+	+	+	—	+	P ₄ X	Mut. NTG.	ce laboratoire
A 34		+	+	+	+	—	+	P ₄ X	Mut. NTG.	ce laboratoire
D 3141		+	+	+	+	+	—	A 314	Mut. spont. + transduction <i>kdg A</i> ⁺	ce laboratoire
PS 392		+	+	c	+	+	+	S 39	Mut. spont.	ce laboratoire
PS 393		+	+	c	+	+	+	S 39	Mut. spont.	ce laboratoire
PK 4		+	+	c	—	+	+	PA 3	Mut. spont. + transduction <i>kdg A</i> ⁺	ce laboratoire
CS 391		+	+	c	c	c	+	S 39	Mut. spont.	ce laboratoire
CS 394		+	+	c	c	c	+	S 39	Mut. spont.	ce laboratoire
CS 395		+	+	c	c	c	+	S 39	Mut. spont.	ce laboratoire
S 39		+	+	+	+	+	+	P ₄ X	transduction (20)	ce laboratoire
PA 3		+	+	c	+	—	+	PS 393	transduction <i>kdg A</i> ⁻	ce laboratoire
CA 1		+	+	c	c	—	+	CS 391	transduction <i>kdg A</i> ⁻	ce laboratoire
CAK 101		+	+	c	—	—	+	CA 1	Mut. spont.	ce laboratoire

tiques (métabolisme des hexuronates et du gluconate), des différentes souches mutantes étudiées, ainsi que leur filiation sont rassemblés dans le Tableau 1. Les caractères génétiques nouveaux ont été nommés selon les recommandations de Demerec *et al.* [19]: *kdg K* = locus des mutations 2-céto-3-désoxygluconate kinase négatives, *kdg T* = locus des mutations négatives pour le système de transport du 2-céto-3-désoxygluconate, *kdg P* = locus des mutations constitutives de ce système de transport, *kdg R* = locus du gène régulateur des 3 activités perméase, kinase, aldolase. En fonction de ces principes nous avons été conduits à remplacer les récentes appellations *eda* [20,21] ou *kga* [22] du gène de structure de la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase par *kdg A*.

TECHNIQUES GÉNÉTIQUES

Mutagenèse

Les mutants déficients en 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase ont été obtenus par l'action de la *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine [23] et enrichissement à la pénicilline [24] selon des conditions que nous avons récemment publiées [20]. Le mutant K01 déficient en 2-céto-3-désoxygluconate kinase a été obtenu avec le même agent mutagène mais sans action de la pénicilline [10]. L'isolement et la caractérisation des deux mutants AJ1 et

GN74 interrompus respectivement pour les étapes III' et III (Fig.1) ont été décrits récemment [25,26].

Isolement de mutants spontanés

Nous avons déjà signalé les caractéristiques d'inhibition de croissance que présentent les mutants aldolase négatifs [9,13,27]. Cette propriété a été mise à profit pour isoler des mutants affectant spécifiquement des enzymes du catabolisme des hexuronates ou du gluconate. Des clones, issues du mutant A 314 (aldolase-négatif) servent à ensemercer des cultures indépendantes sur 1 ml de milieu riche. Ces cultures sont centrifugées et les bactéries resuspendues dans 1 ml de milieu salin M 63. A partir de chaque culture une strie épuisante est étalée sur milieu minimum solide additionné des facteurs de croissances et des sources carbonées suivantes (galacturonate: 1 mg/ml; glucuronate: 1 mg/ml; glycérol: 2 mg/ml). Après 48 heures d'incubation à 37 °C certains clones résistants à l'inhibition de croissance apparaissent sur la strie. Un clone prélevé sur chaque strie est réisolé sur le même milieu et analysé (*cf.* Tests colorés de caractérisation). L'acquisition d'une mutation kinase négative, première enzyme du tronc métabolique commun devait donc permettre à la souche A 314 de résister à l'empoisonnement entraîné par la formation du composé phos-

Tableau 2. Réponses des mutants aux tests colorés

Pour rechercher la présence de kinase ou d'aldolase les Tests II et III sont pratiqués à partir de cultures induites (glycérol + hexuronate). La recherche de la constitutivité est réalisée sur des cultures non induites (glycérol); dans ces conditions le symbole (+) indique un niveau exalté par rapport au sauvage non induit

Caractères	Tests			
	I	II	III	IV
Sauvage	—	+	+	—
Kinase ⁻			—	+
Aldolase ⁻	+	—		
Kinase constitutive			++	
Aldolase constitutive		++		

phorylé issu du métabolisme des deux hexuronates. Effectivement certains de ces clones ont acquis une deuxième mutation: 2-céto-3-désoxygluconate kinase négative, car cultivés en présence de glucuronate ou de galacturonate sur milieu riche, ils n'excrètent plus le composé phosphorylé [27] mais le 2-céto-3-désoxygluconate (cf. tests colorés de caractérisation.) Ainsi les mutants AK 3141, ... AK 3145 (kinase⁻, aldolase⁻) ont été obtenus selon des conditions très semblables. Les souches K 3141, ... K 3145 (kinase⁻) sont issues des mutants correspondants par transduction du génotype *kdg A*⁺ (aldolase⁺) de l'Hfr P₄X. La même méthode a été utilisée pour obtenir des mutants négatifs en 6-phosphogluconate déshydrase à partir du mutant A 314. Le mélange hexuronates + glycérol est remplacé par du gluconate à 2 mg/ml. Sur ce milieu de nombreux clones résistants sont devenus capables d'utiliser la voie des pentose phosphates par déficience de l'activité déshydrasique (AD 3141). Les caractérisations phénotypiques de ce double mutant et de son dérivé transduit (*kdg A*⁺) ont été récemment mentionnées [20].

La sélection de mutants spontanés synthétisant d'une manière constitutive le système de transport du 2-céto-3-désoxygluconate est indiquée dans Résultats.

Tests colorés de caractérisation de mutants négatifs et constitutifs

Pour une recherche rapide d'un grand nombre de mutants issus des expériences de mutagenèse induite ou spontanée, nous avons établi une série de tests qualitatifs qui nous permettent une identification préliminaire.

Tests I et II. Ces deux tests déjà décrits [27] offrent une caractérisation des mutants *kdg A*. Le Test I déce le l'excrétion dans le milieu de culture du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate et le Test II dénote la présence de l'activité aldolasique.

Test III de recherche d'activité kinasique 0,1 ml de culture toluénisée des mutants à tester

et 0,2 ml de milieu réactionnel kinasique (substrat, coenzyme, tampon, aldolase purifiée mélangés dans les proportions du dosage [10]) sont incubés 10 min à température ambiante. L'éventuelle formation de pyruvate est révélée par le test coloré rapide à la 2,4 dinitro-phénylhydrazine [28].

Test IV d'excrétion du 2-céto-3-désoxy-gluconate. Des cultures de 1 ml de milieu riche additionné d'un des 2 hexuronates (2 mg/ml) pour chaque mutant sont arrêtées en phase stationnaire. L'excrétion du substrat de la kinase est directement recherchée sur 0,2 ml de culture par la méthode colorimétrique spécifique de Waravdekar et Saslaw, modifiée par Weissbach et Hurwitz [29]. Les réponses des différents mutants à ces tests qualitatifs sont rassemblées dans le Tableau 2.

RÉSULTATS

CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUES DE LA SOUCHE SAUVAGE

Séquentialité de l'induction de la 2-céto-3-désoxygluconate kinase et de la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase

Dans une récente note, Baudouy-Robert *et al.* [11] ont examiné les modalités de l'induction des six premières enzymes dégradant les hexuronides et les hexuronates. En première analyse, trois unités de régulation se dégagent d'après les premières observations d'induction et les données génétiques actuelles (résultats non publiés). Une unité contrôlerait l'hydrolyse des β -glucuronides et β -galacturonides, une autre assurerait la régulation de la biosynthèse des enzymes I, II', III' (Fig.1) et la troisième la biosynthèse des enzymes II et III du rameau parallèle. C'est dans le cadre de cette étude générale que nous avons abordé l'étude physiologique de l'induction des deux dernières enzymes de cette séquence (étape IV et V de la Fig.1).

Sur un milieu neutre (glycérol, succinate, milieu tryptoné) les activités kinasique et aldolasique sont aisément décelables. Toutefois ces activités spécifiques peuvent être multipliées par un facteur de 5 à 6 pour la kinase et un facteur de 3 à 4 pour l'aldolase lorsqu'un substrat inducteur est présent dans le milieu de croissance (Tableaux 3 et 4). Bien que de caractère inductible, ces deux enzymes, et tout particulièrement l'aldolase, se caractérisent par un haut niveau « basal » reflétant une partielle constitutivité.

Des expériences d'induction sur des mutants simples AJ 1 (affecté pour l'enzyme III') et GN 74 (affecté pour l'enzyme correspondante III du rameau parallèle) nous ont permis d'établir que les deux hexuronates (galacturonate et glucuronate) n'induisent la kinase et l'aldolase chez le sauvage, que par formation séquentielle d'un métabolite inducteur situé après l'altronate ou le mannonate

Tableau 3. Activités spécifiques induites de la kinase et de l'aldolase chez les mutants AJ 1 et GN 74

Toutes les croissances sont réalisées sur glycérol à 2 mg/ml, le substrat inducteur est ajouté à la même concentration. Les dosages sont effectués à partir de cellules récoltées en phase exponentielle après 4 à 5 doublements

Souches	Substrats inducteurs	Caractère	Activités spécifiques	
			Kinase	Aldolase
			mU/mg poids sec	
Hfr H	galacturonate	sauvage	355	695
	glucuronate		350	565
	amide-mannonique		70	180
	néant		70	250
AJ 1	galacturonate	déshydrase altronique ⁻	65	125
GN 74	glucuronate	déshydrase mannonique ⁻	120	100

dans la séquence dégradative des hexuronates. En effet, la croissance d'AJ 1 sur glucuronate est normale, sa faculté d'utiliser le galacturonate est abolie par son défaut génétique mais il accumule l'altronate dans des conditions appropriées [6, 26]. Or chez AJ 1 la kinase et l'aldolase ne sont présentes qu'à leur niveau basal sur milieu glyciné additionné de galacturonate. Il en est de même chez le mutant GN 74 négatif pour la déshydrase mannonique; ce mutant croissant sur galacturonate mais incapable d'utiliser l'autre hexuronate, qui de plus, accumule du mannonate sur milieu glycérol + glucuronate [25], n'est plus inductible pour les enzymes IV et V par le glucuronate (Tableau 3).

Par ailleurs Baudouy-Robert *et al.* [11] ont montré que l'amide D-mannonique, qui n'assure pas la croissance d'*E. coli*, est cependant un bon inducteur des cinq enzymes: isomérase I, déshydrogénase II et II', déshydrases III et III'. Ce composé qui se comporte comme un inducteur gratuit n'induit pas la kinase et l'aldolase (Tableau 3). L'ensemble de ces observations nous ont amené à considérer que la régulation de la biosynthèse des deux dernières enzymes de la séquence devait être disjointe des schémas régulateurs de la biosynthèse des enzymes précédentes.

Cinétiques d'induction Taux différentiels de synthèse

Nous avons vu que les deux hexuronates élevaient le niveau d'activité spécifique des deux enzymes considérées (Tableau 3); aussi avons-nous utilisé l'un de ces deux composés comme inducteur pour l'étude cinétique de l'induction de la kinase et de l'aldolase. Les Fig. 2A et 2B montrent qu'un maximum d'activité spécifique est obtenu dans nos conditions expérimentales entre 2,5 et 4 h de culture sur milieu glyciné ou glucosé pour les deux enzymes.

Au-delà de 5 h de culture ce maximum d'activité tend à décroître; il correspond au début de la phase stationnaire. Lors des études d'induction chez divers mutants ou chez le sauvage avec divers inducteurs, nous avons remplacé la mesure du taux différentiel de synthèse [32] par l'activité spécifique, toujours mesurée dans la zone maximale (4 à 5 doublements). La valeur d'activité spécifique ainsi obtenue, légèrement inférieure au taux différentiel de synthèse est néanmoins très reproductible.

Les Fig. 3A et 3B représentent les taux différentiels de synthèse induite ou non induite respectivement pour la kinase et l'aldolase. Il est intéressant de noter que ces taux différentiels de synthèse induite, constants pendant la durée de l'expérience, prennent leur valeur maximale dès l'addition de l'inducteur puisque les droites s'extrapolent à l'origine pour les deux enzymes. Un résultat analogue a été décrit pour la cinétique de biosynthèse de la déshydrase altronique par le galacturonate [26]. Ce phénomène suggérait à l'auteur que l'induction devait être non séquentielle. En effet, dans le catabolisme du DL-mandélate par *Pseudomonas putida*, l'activité spécifique d'enzymes induites séquentiellement ne s'élève qu'une heure après l'addition de l'inducteur, temps nécessaire pour obtenir le niveau pleinement induit des enzymes précédentes induites de manière non séquentielle [33]. Dans le cas présent d'une induction séquentielle par le galacturonate, l'absence de latence à l'induction, suggère que la transformation du galacturonate extérieur en métabolite inducteur postérieur à l'altronate est très rapide. Par ailleurs dans de nombreux cas, une latence à l'induction est le résultat de la crypticité de la bactérie vis à vis de l'inducteur; or le système de transport des hexuronates présent à un haut niveau sur milieu au glycérol (Jimeno-Abendano, communication personnelle) ne représente pas une étape limitante à la formation immédiate d'inducteur séquentiel.

L'induction par le galacturonate est éloignée des conditions de «gratuité» [34] puisque ce dernier est métabolisé: le temps de doublement sur glycérol décroît lorsque des concentrations croissantes de galacturonate sont ajoutées à la culture. Cette transformation concomitante de l'inducteur apparaît dans l'étude des taux différentiels de synthèse en fonction de la concentration de galacturonate (Fig. 4). Des ruptures de pente très semblables pour la kinase et l'aldolase sont observées pour les faibles concentrations de galacturonate. La deuxième pente correspond exactement au taux différentiel de synthèse observé sur glycérol seul (taux basal). Il existe donc une concentration seuil de vrai inducteur interne dépendant de la concentration de galacturonate disponible, pour laquelle le taux différentiel de synthèse est maximum et au-dessous de laquelle il prend la même valeur qu'en l'absence d'inducteur

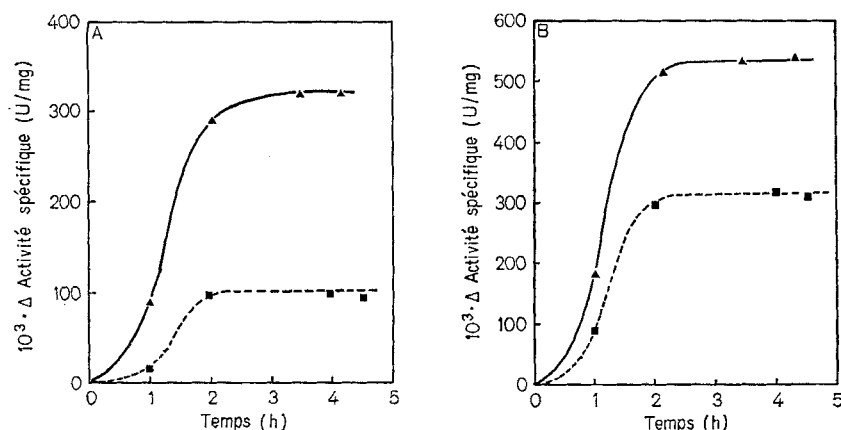


Fig. 2. Accroissement des activités spécifiques kinasique et aldolasique en fonction du temps de culture dans des conditions d'induction (souche Hfr H). (A) Accroissement des activités spécifiques kinasique; (B) accroissement des activités

spécifiques aldolasique. L'inducteur (galacturonate) est ajouté au temps 0 à la concentration de 2 mg/ml à des milieux de culture contenant 2 mg/ml de glycérol (\blacktriangle) ou 2 mg/ml de glucose (\blacksquare)

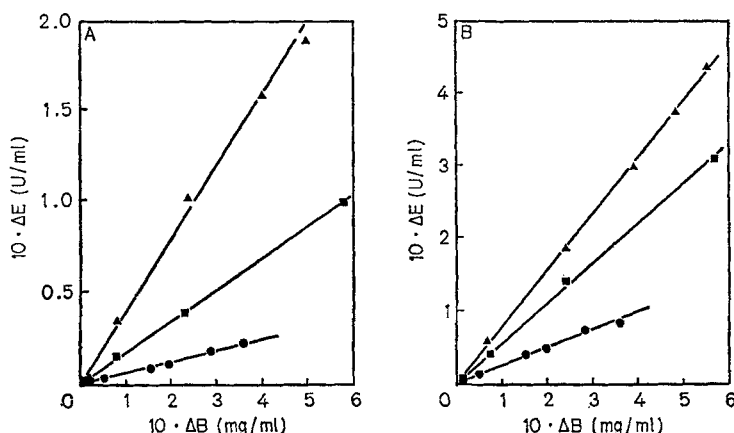


Fig. 3. Taux différentiels de synthèse de la kinase (A) et de l'aldolase (B) dans des conditions d'induction et de non-induction pour la souche Hfr H. ΔE = accroissement de l'activité enzymatique par ml de culture en fonction du temps. ΔB = accroissement correspondant de la masse bactérienne

(poids sec) par ml de culture. Les courbes (\bullet) représentent les taux différentiels de synthèse sur glycéril à 4 mg/ml. Les autres courbes représentent les taux différentiels de synthèse induite par le galacturonate (2 mg/ml) mesurés à partir de cultures contenant 2 mg/ml de glycéril (\blacktriangle) ou 2 mg/ml de glucose (\blacksquare)

exogène. L'emploi de faibles concentrations d'inducteur est le reflet d'expériences d'enlèvement de l'inducteur à des temps variables. Une telle propriété — non prolongation de l'induction après enlèvement de l'inducteur — est commune aux différents systèmes inducibles décrits chez *E. coli* [35].

Etude de la coordination de l'induction des deux enzymes

Il pourrait paraître paradoxal de rechercher une unité opéronique pour deux enzymes dont le rôle métabolique les sépare: la kinase participe au catabolisme des deux hexuronates, l'aldolase est néces-

saire à la dégradation de ces deux hexuronates et du gluconate. Le groupement de leur gène de structure sur un même opéron entraînerait une biosynthèse gratuite de la kinase lorsque la seule source carbonée serait le gluconate. Mais comme nous le verrons plus loin, la preuve de l'existence d'un mécanisme régulateur commun à la biosynthèse de ces deux enzymes justifiait l'étude qui suit. Les différents gènes de structure appartenant à une même unité de transcription sont généralement déréprimés ou réprimés dans un rapport quantitatif fixe [36]. L'étude de nombreux systèmes dégradatifs ou biosynthétiques a largement vérifié ce concept

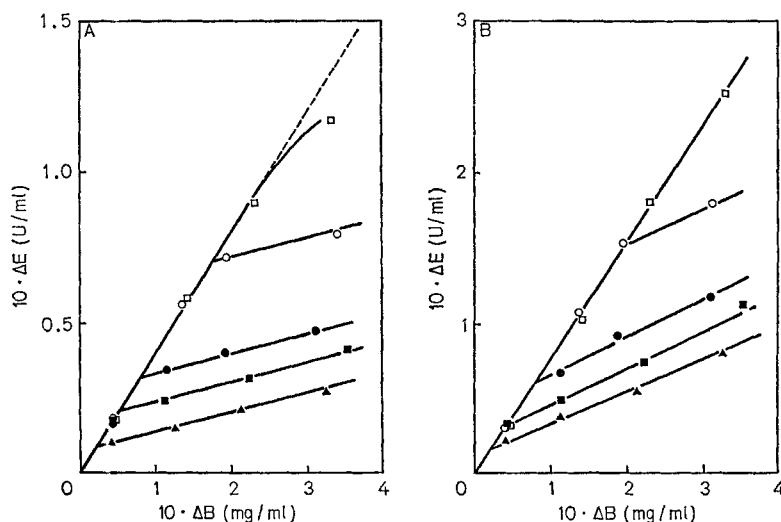


Fig. 4. Taux différentiels de synthèse de la kinase (A) et de l'aldolase (B) pour des concentrations variables d'inducteur (galacturonate). Une préculture non induite de l'Hfr H sert

à enseigner cinq milieux de cultures contenant 2 mg/ml de glycérol et des concentrations variables de galacturonate: ▲, 0,2 mM; ■, 0,5 mM; ●, 1 mM; ○, 2,5 mM; □, 5 mM

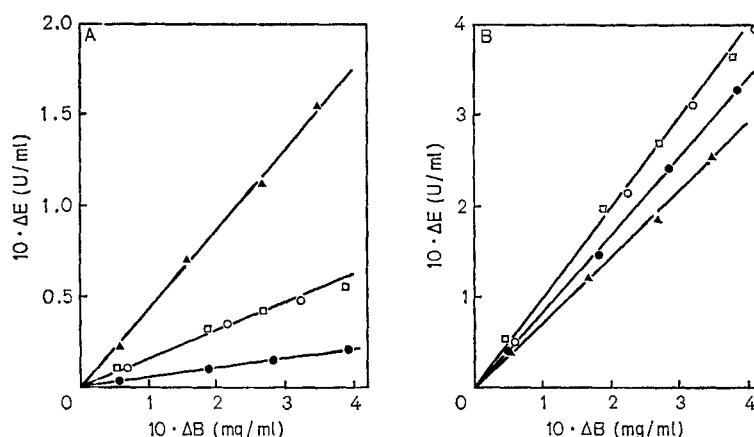


Fig. 5. Taux différentiels de synthèse de la kinase (A) et de l'aldolase (B) dans des conditions variées d'induction avec le gluconate et le galacturonate. Une préculture de la souche Hfr H adaptée au galacturonate sert à enseigner deux milieux contenant du galacturonate à 2 mg/ml additionnés

de 2 mg/ml de galacturonate (▲) ou de 2 mg/ml de gluconate (○). Une autre préculture adaptée au gluconate sert à enseigner 2 milieux contenant du gluconate (2 mg/ml) additionné de gluconate à 2 mg/ml (●) ou de galacturonate à 2 mg/ml (□)

[36–39]. La Fig. 6 qui rassemble les différentes valeurs de taux différentiels de synthèse de la 2-céto-3-déoxygluconate kinase en fonction de ceux respectifs de la 2-céto-3-déoxy-6-phosphogluconate aldolase, fait apparaître une nette décoordination dans l'induction et la répression de ces deux enzymes. Si les différentes concentrations de galacturonate ne permettent pas de montrer une décoordination de l'induction (Fig. 4), par contre une décoordination des phénomènes de répression est observée lorsque l'induction est étudiée sur les milieux au glycérol, au glucose ou riche. L'induction de la kinase est

nettement plus sensible à la répression catabolique: 61% de répression pour la kinase, 26% de répression pour l'aldolase (comparaison de l'induction sur milieu glucose + galacturonate au milieu galacturonate seul). La décoordination est plus accentuée lorsqu'on utilise le gluconate comme substrat inducteur. Excellent inducteur de l'aldolase, ce composé, non seulement n'induit pas la kinase, mais réprime son taux différentiel de synthèse induite par le galacturonate de 65%, alors qu'au sein de la même expérience le taux différentiel de synthèse de l'aldolase est significativement augmenté de 10 à 15%

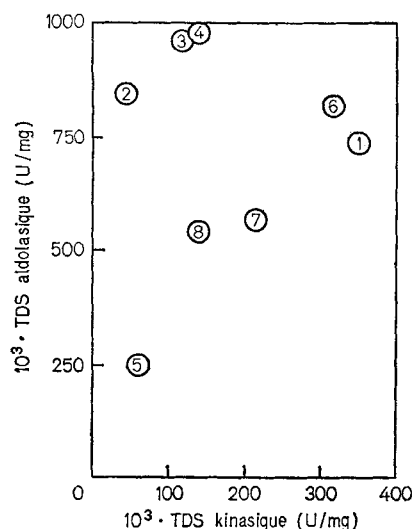


Fig. 6. *Etude de la coordination de l'induction de la kinase et de l'aldolase.* Taux différentiels de synthèse (TDS) de la kinase en fonction des taux différentiels de synthèse de l'aldolase correspondants, dans des conditions variées d'induction et de répression

Substrat de croissance de la pré-culture et de la culture (2 mg/ml)	Inducteur (2 mg/ml)
1 galacturonate	galacturonate
2 gluconate	gluconate
3 galacturonate	gluconate
4 gluconate	galacturonate
5 glycérol	néant
6 glycérol	galacturonate
7 milieu tryptoné	galacturonate
8 glucose	galacturonate

(Fig. 5). Ces effets opposés qui constituent de bonnes preuves d'une décoordination de la biosynthèse et de la répression catabolique de ces deux enzymes, suggèrent fortement que leurs gènes de structure respectifs ne peuvent être groupés dans une unité de transcription de type opéron.

Modalités d'induction de la kinase et de l'aldolase par divers composés

Le Tableau 4 résume les capacités d'induction des différents intermédiaires des deux voies parallèles dégradant respectivement le glucuronate et le galacturonate. Les études biochimiques et d'individualité des deux enzymes ont été réalisées sur *E. coli* K12 (S 3000) mais le caractère Hfr de la souche utilisée étant peu stable les études ultérieures de génétique (obtention de mutants) ont été poursuivies sur la souche Hfr P₄X. Aussi avons-nous tenu à comparer la physiologie de l'induction de ces deux souches. En fait, les activités spécifiques induites ou non induites de l'Hfr P₄X sont pratiquement identiques (Tableau 4).

Tableau 4. *Modalités d'induction de deux souches sauvages par les divers intermédiaires de la voie métabolique des hexuronates et par le gluconate*

Les cellules sont récoltées en phase exponentielle après avoir effectué 4 à 5 doublements à la suite de l'addition de l'inducteur. Les valeurs d'activités spécifiques représentent la moyenne obtenue sur 2 expériences indépendantes

Substrat de croissance des pré-cultures et cultures (2 mg/ml)	Substrat inducteur (10 mM)	Activité spécifique des souches			
		Hfr H		Hfr P ₄ X	
		Kinase	Aldolase	Kinase	Aldolase
		mU/mg poids sec			
Glycérol	néant	70	250	80	240
Glycérol	glucuronate	350	565	300	600
Glycérol	galacturonate	355	695	350	695
Glycérol	fructuronate	265	410	260	420
Glycérol	tagaturonate	210	350	230	430
Glycérol	mannonate	55	210	85	255
Glycérol	altronate	55	200	90	280
Glycérol	2-céto-3-désoxy gluconate	60	215	80	270
Glycérol	2-céto-3-désoxy 6-P-gluconate				
		220		95	265
Milieu tryptoné	galacturonate	220	480	280	450
Glucose	galacturonate	190	540	120	440
Galacturonate	galacturonate	470	750	480	730
Galacturonate	gluconate	180	1000	200	1210
Gluconate	gluconate	60	840	65	1015
Gluconate	galacturonate	145	1000	235	1240

Il en est de même pour la répression catabolique exercée par divers milieux (glucose, gluconate, tryptone) qui ont mis à jour la décoordination de la biosynthèse de la kinase et de l'aldolase chez l'Hfr H.

Des six métabolites intermédiaires des deux voies parallèles, les seuls inducteurs sont les deux hexuronates et les deux céto-uronates. Or ces 4 composés, comme nous l'avons déjà explicité ne sont vraisemblablement inducteurs que par formation séquentielle d'un métabolite inducteur postérieur aux 2 aldones. En outre ces 4 intermédiaires peuvent assurer la croissance d'*E. coli* lorsqu'ils sont utilisés comme unique source de carbone, alors que les deux aldones, mannonate et altronate en sont incapables. L'hypothèse selon laquelle la souche sauvage serait dépourvue d'un système de transport fonctionnel pour ces deux aldones est compatible avec la non-induction de la kinase et de l'aldolase en présence de l'un ou l'autre de ces intermédiaires (Tableau 4). Mais il est possible d'obtenir par mutation spontanée des souches d'*E. coli* capables de croître sur altronate donc inductibles pour les deux enzymes (résultats inédits). Le caractère inducteur propre de l'altronate est toutefois exclu par le fait que ce composé qui s'accumule chez le mutant AJ 1 en présence de galacturonate n'induit pas la kinase et l'aldolase (Tableau 3). Le 2-céto-3-désoxygluconate et son homologue phosphorylé en position 6, tous deux intermédiaires du rameau dégradatif commun sont également incapables d'induire la

Tableau 5. Activités spécifiques chez divers mutants *kinase*⁻ (kdg K) ou *aldolase*⁻ (kdg A)

Souches	Caractère mutationnel	Substrat de croissance (2 mg/ml)	Composé inducteur (2 mg/ml)	Activités spécifiques	
				Kinase	Aldolase
mU/mg poids sec					
P ₄ X	sauvage	glycérol	galacturonate	345 ^a	635 ^a
		glucose	galacturonate	170 ^a	540 ^a
		glycérol	gluconate	—	870
K 3141	<i>kdg K</i>	glycérol	—	3 ^a	200 ^a
		glycérol	galacturonate	5 ^a	1025 ^a
		glycérol	gluconate	< 3 ^a	795 ^a
K 3142	<i>kdg K</i>	glycérol	galacturonate	12	912
		glycérol	gluconate	0	600
K 3144	<i>kdg K</i>	glycérol	galacturonate	16	1130
		glycérol	gluconate	—	730
K 3145	<i>kdg K</i>	glycérol	galacturonate	12	1035
		glycérol	gluconate	0	565
K 01	<i>kdg K</i>	glycérol	—	< 3 ^a	224 ^a
		glycérol	galacturonate	8 ^a	1315 ^a
		glycérol	gluconate	< 3 ^a	920 ^a
PK 4	<i>kdg P^c, kdg K</i>	glycérol	galacturonate	0 ^a	1120 ^a
		glycérol	2-céto-3-désoxygluconate	0 ^a	1580 ^a
A 314	<i>kdg A</i>	glucose	galacturonate	160 ^a	0 ^a
A 34	<i>kdg A</i>	glucose	galacturonate	130 ^a	0 ^a

^a Ces valeurs représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes. Les autres valeurs sont issues d'une seule expérience (on peut estimer que l'erreur relative est inférieure à 20% pour les activités kinasiques et 10% pour les activités aldolaisiques).

Tableau 6. Inductibilité de l'aldolase chez un mutant 6-phosphogluconate déshydrase⁻ (edd)

Souche	Caractère	Substrat de croissance	Substrat inducteur (2 mg/ml)	Activités spécifiques		
				Gluconate kinase	Gluconate-6- <i>P</i> déshydrase	Aldolase
mU/mg poids sec						
P ₄ X	sauvage	glycérol	gluconate	150	65	870
D 3141	<i>edd</i>	glycérol	—			250
		milieu riche	—			250
		glycérol	galacturonate			875 ^a
		gluconate		117	0,6	1070 ^a
		gluconate	gluconate			930

^a Ces valeurs représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. Lorsque la gluconate-6-P déshydrase est dosée, l'extraction enzymatique est réalisée aux ultra-sons (cf. Matériel et Méthodes).

kinase et l'aldolase (Tableau 4). Cette observation toutefois ne permet pas d'éliminer un éventuel rôle inducteur de ces deux composés lorsqu'ils sont formés de façon endogène à partir d'un précurseur métabolisable: ces 2-désoxy-oses ne peuvent en effet assurer la croissance de la souche sauvage vraisemblablement dépourvue d'un système de transport fonctionnel pour ces deux composés. Nous verrons au paragraphe suivant ce que l'on doit penser du rôle du 2-céto-3-désoxygluconate dans l'induction de ces deux enzymes et du système de transport de ce substrat chez la souche sauvage.

¶ Nous avons également recherché si parmi un grand nombre d'oses ayant ou non une analogie

structurale avec le 2-céto-3-désoxygluconate, ainsi que parmi des composés tels que le glycéraldéhyde-3-phosphate, le pyruvate, l'acétate, intermédiaires métaboliques postérieurs au 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate, certains pouvaient manifester une action inductrice ou répressive des deux enzymes. Les différents composés ont été ajoutés (10 mM) à des cultures en croissance sur glycérol et à des cultures induites en croissance sur galacturonate. Après 4 doublements les activités spécifiques kinasique et aldolaisique sont mesurées et comparées à celles que l'on obtient sans ajouter ces composés. Seuls l'amide D-mannonique et le pyruvate présentent un effet négatif sur la biosynthèse induite: le pyruvate

réprime le niveau induit des 2 enzymes d'environ 35%, l'amide D-mannonique qui n'affecte pas le niveau kinasique induit, réprime environ de 40% l'activité spécifique aldolasique.

Par contre le fait qu'aucun des composés testés ne soit inducteur de ces deux activités suggère comme pour la plupart des systèmes inductibles connus une certaine spécificité dans le mécanisme de l'induction.

CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUES DE MUTANTS VARIÉS

Mise en évidence et rôle d'un système de transport du 2-céto-3-désoxygluconate

Si la souche sauvage ne peut utiliser le 2-céto-3-désoxygluconate comme source de carbone, nous pensons que cette particularité est inhérente à l'absence d'un système de transport fonctionnel pour ce composé plutôt qu'à son incapacité à induire les enzymes kinase et aldolase nécessaires à son métabolisme. Les observations suivantes nous paraissent concluantes à cet égard. En premier lieu, rappelons le caractère séquentiel de l'induction de la kinase et de l'aldolase par le 2-céto-3-désoxygluconate ou un métabolite en dérivant (nous examinerons cette question plus loin). Par ailleurs, lorsqu'on ensemence les Hfr H ou P₄X (3 · 10⁷ bactéries/ml) sur milieu minimum liquide contenant 2 mg/ml de ce désoxy-ose une croissance s'observe après 24 à 36 h de latence. Or, lorsqu'après isolement des clones ayant cru sur ce substrat on analyse leur croissance sur ce même composé après 3 ou 4 passages successifs sur milieu riche ou glyciné, la phase de latence a disparu. Ces souches stables, isolées spontanément après un temps de latence relativement court, et dont la fréquence d'apparition spontanée est de l'ordre de 10⁻⁵ à 10⁻⁶ sont vraisemblablement le résultat d'un événement mutationnel unique. L'étude physiologique et génétique de ces

mutants au phénotype «2-céto-3-désoxygluconate⁺» établit l'existence de deux classes qui définissent deux loci distincts: *kdg P* et *kdg R* [13,14]. Il a été montré que ces deux types de mutants ont en commun un système de transport du 2-céto-3-désoxygluconate bien caractérisé et décrit ailleurs [15], permettant sa pénétration et son accumulation intracellulaire, et de plus ce système est de nature constitutive (Fig.7 et Tableau 7). Par contre les activités kinasiques et aldolasiques sont inductibles chez les mutants appartenant au locus *kdg P* (*kdg P^c*) et constitutives chez ceux dont la mutation se localise en *kdg R* (*kdg R^c*). Le fait que

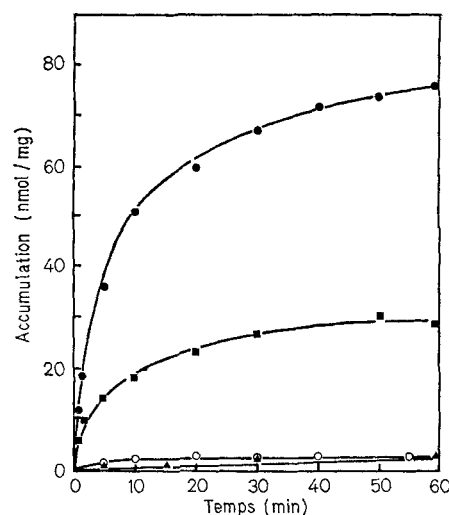


Fig.7. Pénétration du 2-céto-3-désoxy [1-¹⁴C]gluconate en fonction du temps dans les cellules de la souche sauvage et de divers mutants. Les cellules cultivées sur glycérol sont récoltées en phase exponentielle lavées et remises en suspension en M 63 + chloroamphénicol de façon à avoir 3 · 10⁸ bactéries/ml. Les conditions d'études de la pénétration sont mentionnées dans Matériel et Méthodes. ●, CAK 101; ■, PK 4; ○, K 01; ▲, P₄X

Tableau 7. Activités spécifiques de mutants (non induits) au phénotype «2-céto-3-désoxygluconate⁺»

Toutes les cultures ont été réalisées sur glycérol à 3 mg/ml. Les dosages sont effectués à partir de cellules récoltées en phase exponentielle et extraites aux ultra-sons

Souche	Caractère mutationnel	Activités spécifiques					
		Système de transport du 2-céto-3-désoxy gluconate ^b	2-céto-3-désoxy gluconate kinase	2-céto-3-désoxy 6- <i>P</i> gluconate aldolase	Gluconate kinase	Gluconate 6- <i>P</i> déshydrase ^a	Glucose-6- <i>P</i> déshydrogénase
mU/mg poids sec							
CS 391	<i>kdg R^c</i>	2,5	1620	2140	3	< 1	96
CS 394	<i>kdg R^c</i>	1,7	2010	2350	3	< 1	110
CS 395	<i>kdg R^c</i>	1,9	1750	2500	4	< 1	98
PS 392	<i>kdg P^c</i>	3,5	97	210	—	—	—
P ₄ X	sauvage	0,01	80	300	3 (150)	< 5 (65)	100

^a L'instabilité de la gluconate-6-P-déshydrase entraîne une certaine incertitude sur les valeurs d'activité spécifique.

Les nombres entre parenthèses pour la souche P₄X représentent les activités induites sur un milieu; glycérol + gluconate.

^b Activités exprimées en μmol de 2-céto-3-désoxy[1-¹⁴C]gluconate accumulé/min et par mg de poids sec bactérien.

les cellules de la souche sauvage et de K01 (kinase⁻) soient incapables d'accumuler le 2-céto-3-désoxy-gluconate (Fig. 7) prouve bien que l'incapacité de la souche sauvage à utiliser ce composé comme source de carbone provient principalement du défaut de pénétration de celui-ci.

Enfin, le fait que les mutants sélectionnés pour le phénotype «2-céto-3-désoxygluconate⁺» aient tous acquis un système de transport constitutif (*kdg P^c* ou *kdg R^c*) met en relief le caractère de non-inductibilité de ce système par le 2-céto-3-désoxygluconate exogène chez le sauvage. En revanche la kinase et l'aldolase se comportent différemment à cet égard. Nous avons vu qu'elles ne sont pas induites par le 2-céto-3-désoxy-gluconate chez la souche sauvage (Tableau 4). Cependant lorsque la cellule acquiert une mutation *kdg P^c* qui lui confère un système d'entrée pour le 2-céto-3-désoxygluconate les deux enzymes deviennent alors inducibles par ce composé (Fig. 8; Tableau 8). Cette observation démontre que le 2-céto-3-désoxygluconate est en

fait inducteur par lui-même ou sous une forme séquentiellement dérivée et que seul son défaut de pénétration constaté ci-dessus ne lui permet pas d'exercer ce rôle chez la souche sauvage.

Recherche des inducteurs de la kinase et de l'aldolase par l'étude de mutants négatifs

L'étude des modifications physiologiques d'induction des enzymes du rameau commun, engendrées par des mutations négatives simples nous a permis, compte tenu de la position du défaut enzymatique dans la séquence, de déterminer le ou les métabolites inducteurs vrais. Ceux-ci étant à rechercher en aval des deux aldonates, nous avons analysé l'accumulation de métabolites intermédiaires, et les activités spécifiques enzymatiques dans des cultures induites de mutants bloqués respectivement pour les étapes IV, V et 2 (Fig. 1).

Mutants 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase négatifs (*kdg A*)

Ces mutants *kdg A*, comme nous l'avons décrit ailleurs [27], excrètent dans le milieu de culture (glucose ou milieu tryptoné additionné de l'un des deux hexuronates ou du gluconate) le substrat de l'aldolase. Cette accumulation physiologique anormale de 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate entraîne une sévère inhibition de croissance de ces mutants sur de nombreux substrats lorsqu'un hexuronate ou le gluconate est ajouté au milieu [9,20] (et Pouysségur, J. & Stoerber, F., résultats inédits). Récemment d'autres auteurs ont confirmé indépendamment les propriétés ci-dessus chez des mutants dont les mutations sont situées dans le même locus [21,22]. La mise en évidence de fortes accumulations de 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate chez ces mutants lorsque le glucuronate, galacturonate ou gluconate sont ajoutés à un milieu glucosé ou riche est une preuve du fonctionnement et donc de l'inductibilité de toutes les enzymes de ces trois voies dégradatives malgré le défaut aldolasique. Ce fait permet d'exclure le rôle qu'auraient pu jouer le pyruvate et/ou le glycéraldéhyde-3-phosphate dans le mécanisme d'induction de la 2-céto-3-désoxy-gluconate kinase et dans celui des deux premières

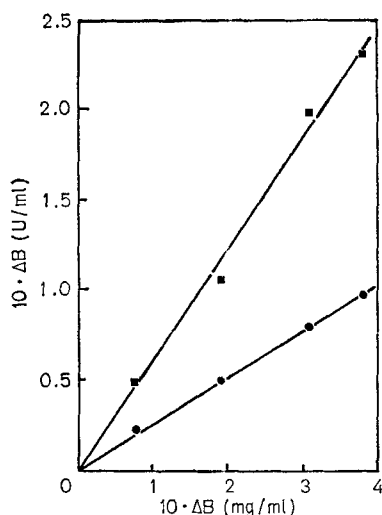


Fig. 8. Taux différentiel de synthèse de la kinase et de l'aldolase chez la souche PS 392 induite par le 2-céto-3-désoxygluconate. L'induction est réalisée sur une culture au glycérol (2 mg/ml). L'abscisse 0 correspond à l'addition du 2-céto-3-désoxygluconate à la culture (2 mg/ml). Taux différentiel de synthèse de l'aldolase (■), et de la kinase (●)

Tableau 8. Inductibilité de la kinase et de l'aldolase chez les mutants de la classe *kdg P^c*

Souche	Caractère mutationnel	Substrat de croissance	Substrat inducteur	Activités spécifiques	
				Kinase	Aldolase
mU/mg poids sec					
PS 392	<i>kdg P^c</i>	glycérol	galacturonate	330	870
		glycérol	2-céto-3-désoxy gluconate	280	605
PS 393	<i>kdg P^c</i>	glycérol	galacturonate	300	935
		glycérol	2-céto-3-désoxy gluconate	250	615

enzymes inductibles de la voie du gluconate (gluconate kinase et gluconate-6-phosphate déshydrase).

L'activité spécifique induite de la kinase des mutants *kdg A* ne peut être mesurée que sur des cultures en croissance sur glucose, seul substrat assurant une légère croissance en présence de galacturonate. Malgré une forte répression de l'induction par le glucose, les deux mutants *kdg A* A 314 et A 34 ont sensiblement la même activité kinasique que la souche sauvage Hfr P₄X dans les mêmes conditions (Tableau 5). Etant donné la position du blocage enzymatique, il apparaît que les intermédiaires inducteurs sont limités au 2-céto-3-désoxygluconate et à son homologue phosphorylé. Cependant, si ce dernier composé, le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate, était capable d'induire la kinase, nous devrions observer une induction de celle-ci par le gluconate qui engendre ce métabolite; or les observations que nous avons rapportées (Fig. 5A, Tableau 4) montrent que la 2-céto-3-désoxygluconate kinase n'est pas induite par le gluconate. L'ensemble de ces faits suggère fortement que l'inducteur vrai de cette enzyme est son substrat: le 2-céto-3-désoxygluconate.

Mutants 2-céto-3-désoxygluconate kinase négatifs (*kdg K*)

Ces mutants simples affectés pour l'étape IV ont été caractérisés, outre l'absence de la kinase, par la mise en évidence de fortes accumulations de 2-céto-3-désoxygluconate dans le milieu de culture. Un mutant kinase⁻ cultivé sur glycérol additionné de glucuronate et remis en suspension sur glucuronate seul (cellules non proliférantes) est capable de transformer en quelques heures 40% du glucuronate (2 mg/ml) en 2-céto-3-désoxygluconate. De fortes excréctions du même composé sont également obtenues lorsque le galacturonate est métabolisé. Cette production de l'intermédiaire précédant le défaut enzymatique, démontre que toutes les enzymes dégradant les deux hexuronates sont inductibles chez ces mutants *kdg K*.

Cependant, le résultat le plus marquant réside dans le fait que la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase est demeurée inductible par le galacturonate malgré le défaut kinasique des mutants K 01, K 3141, . . . K 3145 (Tableau 5). De plus, alors que le niveau basal aldolasique sur glycérol (mutants K 01 et K 3141) est identique à celui de l'Hfr P₄X, le galacturonate exalte le niveau induit de l'aldolase d'environ 70% par rapport à l'activité spécifique induite du sauvage sur ce même substrat. Cette hyperinduction paraît de nature physiologique puisque chez les mêmes mutants le gluconate induit l'aldolase à un niveau normal. Ce résultat observé sur six mutants kinase⁻ démontre que le 2-céto-3-désoxygluconate est un bon inducteur de

l'aldolase. L'hyperinduction aldolasique peut être due à l'accumulation anormale d'inducteur dans la cellule (nous avons signalé les fortes excréctions de 2-céto-3-désoxygluconate) ou bien comme des auteurs l'ont récemment démontré pour le système arabinose, à l'abolition de la *self catabolite repression* [40] par la mutation kinase⁻: la formation de composés répresseurs comme le pyruvate serait diminuée. La première interprétation se trouve cependant vérifiée par l'étude de la souche PK 4. Cette souche kinase⁻ porte une autre mutation dans le locus *kdg P* lui conférant ainsi un système de transport constitutif pour le 2-céto-3-désoxygluconate. Or, comme chez les autres mutants kinase⁻ l'aldolase est hyper-induite par le galacturonate, et de plus le 2-céto-3-désoxygluconate utilisé directement comme inducteur élève encore ce niveau induit de 40% et atteint une valeur voisine de celle des mutants constitutifs (Tableau 5). Etant donné l'irréversibilité des étapes III et III' catalysées par les déshydrases, ce résultat souligne le rôle direct très probable du 2-céto-3-désoxygluconate dans le mécanisme d'induction de l'aldolase.

Mutants 6-phosphogluconate déshydrase négatifs (*edd*)

Nous avons démontré sur la base de plusieurs argumentations indépendantes [9] que l'activité aldolasique nécessaire au métabolisme du gluconate et des hexuronates est sous la dépendance d'un gène de structure unique. Il est alors surprenant de constater que l'inducteur de l'aldolase soit le 2-céto-3-désoxygluconate, intermédiaire exclusif de la voie des hexuronates. Nous devons admettre l'existence d'un autre composé inducteur de la 2-céto-3-désoxygluconate aldolase lorsque le gluconate est métabolisé. A ce titre, le mutant D 3141 déficient en 6-phosphogluconate déshydrase (étape 2) et donc incapable de former le substrat aldolasique, constitue une souche essentielle pour cette étude. L'aldolase de ce mutant, normalement induite par le galacturonate demeure également inductible par le gluconate (Tableau 6). Ce résultat nous conduit à penser que le gluconate ou le gluconate-6-phosphate sont des inducteurs de l'aldolase, sans qu'il soit toutefois exclu que le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate puisse également induire par lui-même (voir plus loin).

Cette observation nous paraissait en accord avec les résultats établis sur le mutant RZ 10 par Zabloutny et Fraenkel [41]. Ce mutant déshydrase⁻ présente une activité aldolasique pleinement induite sur milieu riche + gluconate tout comme la souche parentale K 10. Or, récemment Fradkin *et al.* [21] utilisant la même souche nouvellement nommée DZ 10 montrent nettement que sur gluconate seul l'aldolase de ce mutant n'est présente qu'à un niveau

basal, et concluent de ce fait que l'inducteur possible de l'aldolase est le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate. Cette divergence de résultats et donc d'interprétation pouvait venir des différences de conditions de culture du mutant *edd* (RZ 10 ou DZ 10) d'une expérience à l'autre (milieu riche + gluconate dans un cas et gluconate seul dans l'autre). Ainsi nous pensions que l'induction de l'aldolase observée sur milieu au glycérol + gluconate chez D 3141 et celle observée chez le mutant RZ 10 cultivé sur milieu riche + gluconate [41] pouvait résulter d'une induction par le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate endogène formé à partir du pyruvate et du D-glycéraldéhyde-3-phosphate [21,13]. Ces 2 composés pouvaient en effet être présents à un niveau plus élevé dans les conditions citées que lorsque le gluconate est le seul substrat de croissance. Mais le Tableau 6 montre que sur gluconate seul le mutant D 3141 présente une activité aldolasique pleinement induite. La différence entre nos résultats et ceux de Fradkin *et al.* reste donc difficile à expliquer pour le moment.

Si nos résultats semblent assigner au gluconate ou au gluconate-6-phosphate un rôle direct dans l'induction de l'aldolase l'étude de souches aldolase-réverses suggère par ailleurs la possibilité d'un rôle concomitant du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate dans le mécanisme d'induction de l'aldolase. Nous avons récemment démontré [13] que les souches A 314 r8 et A 314 r7 porteuses de mutations affectant le gène de structure de l'aldolase présentent un niveau basal anormalement bas (facteur d'induction 30 à 40). Cette observation nous a suggéré que la réaction réversible aldolasique à partir du pyruvate et du glyceraldéhyde-3-P est considérablement ralentie par les modifications de structure de l'aldolase. Ainsi, la diminution du haut niveau basal aldolasique chez les deux mutants structuraux s'expliquerait par la diminution du pool interne du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate, inducteur endogène. Une démonstration plus directe de cette hypothèse pourra être apportée par l'étude des modifications cinétiques de la réaction réversible aldolasique chez ces deux souches réverses.

*Unité de régulation contrôlant la biosynthèse
des 3 activités enzymatiques assurant
le métabolisme du 2-céto-3-désoxygluconate exogène*

Parmi les mutants simples ayant acquis spontanément la faculté de croître sur le 2-céto-3-désoxygluconate comme unique source de carbone, une classe dont les mutations définissent le locus *kdg R* [13,14] se distingue physiologiquement par la synthèse constitutive simultanée du système de transport du 2-céto-3-désoxygluconate (Fig.7) [15] de la kinase et de l'aldolase, enzymes séquentielles assurant le métabolisme de ce composé

(Tableau 7). Il est intéressant de souligner que le phénotype sélectionné pour l'obtention de ces mutants ne porte que sur l'acquisition d'un système de transport fonctionnel, car pour croître sur ce substrat l'acquisition d'un phénotype constitutif pour la kinase et l'aldolase n'est pas nécessaire. Nous avons vu, en effet, que ces deux enzymes sont inductibles par le 2-céto-3-désoxygluconate. De plus, une vérification est apportée par l'obtention d'une autre classe de mutants: *kdg P^c*, qui, ayant acquis la constitutivité pour le système de transport, conservent une kinase et une aldolase inductible.

La haute fréquence d'apparition spontanée des mutants de la classe *kdg R^c* (10^{-6}) et l'acquisition toujours simultanée de la triple constitutivité chez les mutants de ce type, suggèrent que ces mutations *kdg R^c* ont affecté un gène régulateur gouvernant l'expression des trois gènes structuraux codant respectivement pour une protéine du système de transport du 2-céto-3-désoxygluconate, la 2-céto-3-désoxygluconate kinase, et la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase.

Pour connaître l'étendue de la pléiotropie engendrée par ces mutations *kdg R^c*, et donc l'étendue du contrôle de ce gène régulateur, nous avons mesuré les activités spécifiques des enzymes des deux voies parallèles dégradant les deux hexuronates, et de la voie gluconate à partir de cultures non induites (glycérol). Toutes les enzymes du métabolisme des hexuronates ne sont présentes qu'à leur niveau basal. Ceci confirme, comme nous l'avons déjà signalé [12], que le mécanisme gouvernant la biosynthèse des enzymes du rameau dégradatif commun est disjoint de celui qui commande l'induction des enzymes des deux voies parallèles. De même les enzymes de la voie gluconate: la gluconate-kinase et la 6-phosphogluconate déshydrase ont gardé leur caractère d'inductibilité par le gluconate (Tableau 7). Le mécanisme de régulation de leur biosynthèse est donc également nettement dissocié de celui qui contrôle les biosynthèses des trois enzymes séquentielles dégradant le 2-céto-3-désoxygluconate.

DISCUSSION

L'analyse préliminaire des modalités physiologiques de l'induction des deux dernières enzymes dégradant les hexuronates a fait apparaître rapidement l'individualité de ce système par rapport aux étapes enzymatiques précédentes. L'étude de l'utilisation du 2-céto-3-désoxygluconate par *E. coli* K 12, qui a révélé l'existence d'un système de transport nouveau, spécifique de ce composé, permet de compléter le schéma régulateur de notre système. Ce substrat n'est pas capable d'induire le système de transport vraisemblablement parce que le niveau basal de celui-ci est excessivement bas (Fig.7) (Lagarde, A., Pouysségur, J. & Stoeber, F., résultats

inédits). Or, nous avons vu que des mutants capables d'utiliser ce composé comme unique source carbonée, apparaissent avec les particularités suivantes: (a) fréquence spontanée élevée (10^{-5} à 10^{-6}), (b) nature constitutive pour le système de transport, (c) existence de deux classes *kdg P^c* et *kdg R^c*. Cette situation paraît indiquer que le 2-céto-3-désoxygluconate simule vis-à-vis du système de transport dont le déterminant spécifique est sous un état fortement réprimé, le comportement d'un substrat non inducteur tel que l'altrose β -galactoside vis-à-vis du système lactose [42] ou le lactose lui-même vis à vis du système *lac* modifié par les mutations *i^s* [43]. Cette analogie de situation nous fait penser que les deux types de mutants *kdg P^c* et *kdg R^c* seraient l'équivalent des mutations réverses *o^c* et *i⁻* obtenues à haute fréquence par la restauration du phénotype lactose⁺ chez les mutants *i^s* [44]. Des résultats analogues ont été rapportés par Lin et al. au sujet du système L- α -glycérophosphate à régulation négative [45] et par Starlinger et al. étudiant l'opéron galactose contrôlé également de façon négative [46,47]. Dans cet ordre d'idée, les mutations *kdg R^c* qui définissent un locus lié à *kdg A* mais nettement distinct [13,14], et déclenchent de manière pléiotrope l'expression constitutive de la perméase, de la kinase et de l'aldolase, affectent très vraisemblablement un gène régulateur; celui-ci, produirait chez la souche sauvage un répresseur bloquant à la fois la synthèse des trois activités enzymatiques citées. Des mutations thermosensibles modifiant simultanément la biosynthèse de ces 3 activités enzymatiques, localisées en *kdg R*, viennent d'être isolées [14]. Comme pour les systèmes *lac* et *glp* à régulation négative, les premières études de ces mutations montrent une dérépression simultanée des trois déterminants: perméase, kinase, aldolase, lorsque ces mutants se développent à 42 °C. Dans une culture de ces mutants à 28 °C, les trois activités sont présentes à leur niveau basal. Cette étude préliminaire que nous développons actuellement apporte une confirmation au schéma de régulation négative que nous avons proposé.

Si génétiquement l'expression des mutations du type *kdg R^c* constitue une preuve de l'existence d'un gène régulateur commun pour le contrôle de la biosynthèse des trois activités enzymatiques citées, il est des conditions physiologiques où cette unité de régulation semble se disjoindre. Nous avons observé, en effet, une totale décoordination de l'induction et de la répression de la kinase et de l'aldolase, notamment lorsque l'inducteur est le gluconate. En outre, l'induction du système de transport par les deux hexuronates, vraisemblablement par formation séquentielle de 2-céto-3-désoxygluconate, vient d'être montré, ainsi que son absence d'induction par le gluconate [15]. Cette situation qui évite, lorsque le gluconate est le seul sub-

strat de croissance, une synthèse gratuite de la kinase et du système de transport est bénéfique pour le bilan global de la croissance. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette dualité de la régulation. L'une d'entre elles qui eût pu intégrer l'ensemble de ces observations: unité de régulation et individualité de l'opéron *kdg A* était basée sur l'existence de deux déterminants de structure pour l'aldolase. L'un eût été spécifique de la voie gluconate et donc exprimé à part, et l'autre spécifique du métabolisme des deux hexuronates et donc co-induit avec les déterminants de structure de la kinase et du système de transport. Cette hypothèse examinée récemment a été rejetée [9]. L'hypothèse qui nous paraît la plus probable pour rendre compte de ces effets apparemment contradictoires est la suivante. A la décoordination physiologique de l'expression du système de transport, de la kinase et de l'aldolase correspond une dispersion des loci génétiques impliqués: *kdg A* à la 35^e min [20] (gène de structure de l'aldolase [13]), *kdg T* à la 76,5^e min et *kdg K* à la 69^e min [14] (gènes de structures probables respectivement du système de transport et de la kinase). Il paraît donc exister trois opérons distincts refermant chacun l'un de ces gènes de structure et ayant probablement chacun un opérateur spécifique. Les affinités du répresseur pour ces trois opérateurs pourraient être fort différentes (situation rencontrée dans les régulateurs *glp* et *arg* [45,48]) et parallèlement les modifications d'affinité provoquées par la fixation des divers inducteurs sur le répresseur seraient variables selon la nature de ceux-ci. On expliquerait ainsi que la dérépression de chaque opéron soit dépendante de la nature de l'inducteur mis en jeu. Le 2-céto-3-désoxygluconate, nous l'avons vu, est un excellent inducteur à la fois de la kinase et de l'aldolase; mais, nous avons également montré que le gluconate et/ou le gluconate-6-phosphate et peut-être le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate sont des inducteurs exclusifs de l'aldolase. On peut donc penser que le 2-céto-3-désoxygluconate, bon inducteur, est capable de déréprimer les trois opérons. Par contre, les autres intermédiaires inducteurs, composés spécifiques de la voie gluconate ne dérépriment que l'aldolase car le complexe répresseur-opérateur de l'opéron *kdg A* serait par exemple plus labile que les autres. La modification du répresseur engendrée par ces inducteurs serait insuffisante pour déréprimer les deux autres opérons. Des preuves directes seront recherchées pour la validité de cette hypothèse.

Nous remercions Melle Gisèle Couchoux pour son excellente collaboration technique et M. A. Lagarde qui a réalisé pour nous les expériences de perméation. 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 n° 177). Ce mémoire recouvre en partie les travaux présentés par Pouysségur, J. en 1972 pour l'obtention du

grade de Docteur ès-Sciences Physiques devant l'Université Claude Bernard de Lyon. Cette thèse est enregistrée au CNRS sous le N°: AO 7651.

Note ajoutée aux épreuves. Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'induction exclusive de l'aldolase par le gluconate et/ou le gluconate-6-P ferait appel à l'existence d'un 2^e gène régulateur R' contrôlant spécifiquement *kdg A* par l'intermédiaire d'un inducteur de la voie gluconate. Des résultats récents en faveur d'un tel modèle ont été apportés dans le cas de l'opéron *gal* [49]. Cependant nous avons montré que l'aldolase des mutants *kdg R^c* n'est pas «super» induite par le gluconate (Pouysségur, résultats inédits). Si cette observation laisse peu de place à l'existence de 2 produits R et R' agissant en tandem, elle n'exclut pas l'hypothèse selon laquelle l'association de R et R' serait nécessaire à la répression de *kdg A*.

BIBLIOGRAPHIE

- Ashwell, G., Whaba, A. J. & Hickman, J. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 1559.
- Hickman, J. & Ashwell, G. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 1566.
- Smiley, J. D. & Ashwell, G. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 1571.
- Cynkin, M. A. & Ashwell, G. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 1576.
- Didier-Fichet, M. L. & Stoeber, F. (1970) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* **271**, 457.
- Robert-Baudouy, J., Jimeno-Abendano, J. & Stoeber, F. (1971) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* **272**, 2740.
- Portalier, R. & Stoeber, F. (1972) *Eur. J. Biochem.* **26**, 50.
- Portalier, R. & Stoeber, F. (1972) *Eur. J. Biochem.* **26**, 290.
- Pouysségur, J. & Stoeber, F. (1971) *Eur. J. Biochem.* **21**, 363.
- Pouysségur, J. & Stoeber, F. (1971) *Biochimie*, **53**, 771.
- Baudouy-Robert, J., Didier-Fichet, M. L., Jimeno-Abendano, J., Novel, G., Portalier, R. & Stoeber, F. (1970) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* **271**, 255.
- Pouysségur, J. & Stoeber, F. (1970) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* **271**, 370.
- Pouysségur, J. & Stoeber, F. (1972) *Mol. Gen. Genet.* **114**, 305.
- Pouysségur, J. & Stoeber, F. (1972) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* **274**, 2249.
- Lagarde, A., Pouysségur, J. & Stoeber, F. (1972) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* (sous presse).
- Sistrom, W. R. (1958) *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 579.
- Eisenberg, R. C. & Dobrogosz, W. J. (1967) *J. Bacteriol.* **93**, 941.
- Pouysségur, J. & Label, J., *Compounds*, soumis pour publication.
- Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J. & Hartman, P. E. (1966) *Genetics*, **54**, 61.
- Pouysségur, J. M. (1971) *Mol. Gen. Genet.* **113**, 31.
- Fradkin, J. & Fraenkel, D. G. (1971) *J. Bacteriol.* **108**, 1277.
- Faik, P., Kornberg, H. L. & McEvoy-Bowe, E. (1971) *FEBS Lett.* **19**, 225.
- Adelberg, E. A., Mandel, M. & Chen, G. C. C. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 788.
- Davis, B. D. (1949) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **35**, 1.
- Robert-Baudouy, J. (1971) Thèse de 3^e cycle, Lyon.
- Jimeno-Abendano, J. (1968) Thèse de Docteur-ingénieur, Lyon.
- Pouysségur, J. & Stoeber, F. (1970) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **52**, 1407.
- Friedemann, T. E. & Haugen, G. E. (1943) *J. Biol. Chem.* **147**, 415.
- Weissbach, A. & Hurwitz, J. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 705.
- Pratt, J. W. & Richtmyer, N. K. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 1906.
- Pouysségur, J. & Stoeber, F. (1970) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **52**, 1419.
- Monod, J., Pappenheimer, A. M., Jr & Cohen-Bazire, G. (1952) *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 648.
- Stanier, R. Y., Hegeman, G. D. & Ornston, L. N. (1963) in *Coll. International du CNRS* (CNRS, ed.) n° 124, p. 227.
- Monod, J. & Cohn, M. (1952) *Advan. Enzymol.* **13**, 67.
- Buttin, G. (1963) *J. Mol. Biol.* **7**, 164.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 193.
- Ames, B. N. & Garry, B. (1959) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **45**, 1453.
- Lee, N. & Englesberg, E. (1963) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **50**, 696.
- Buttin, G. (1963) *J. Mol. Biol.* **7**, 183.
- Katz, L. & Englesberg, E. (1971) *J. Bacteriol.* **107**, 34.
- Zablotny, R. & Fraenkel, D. G. (1967) *J. Bacteriol.* **93**, 1579.
- Lederberg, J. (1951) in *Genetics in the 20th Century* (Dunn, L. C., ed.) p. 263, The McMillan Co., New York.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961) *J. Mol. Biol.* **3**, 318.
- Willson, C., Perrin, D., Cohn, M., Jacob, F. & Monod, J. (1964) *J. Mol. Biol.* **8**, 582.
- Cozzarelli, N. R., Freedberg, W. B. & Lin, E. C. C. (1968) *J. Mol. Biol.* **31**, 371.
- Saedler, H., Gullon, A., Fiethen, L. & Starlinger, P. (1968) *Mol. Gen. Genet.* **102**, 79.
- Fiethen, L. & Starlinger, P. (1970) *Mol. Gen. Genet.* **108**, 322.
- Jacoby, G. & Gorini, L. (1969) *J. Mol. Biol.* **39**, 73.
- Hua, S. S. & Markovitz, A. (1972) *J. Bacteriol.* **110**, 1089.

J. M. Pouysségur et F. R. Stoeber
Service de Microbiologie
Institut National des Sciences Appliquées de Lyon
20 Avenue Albert-Einstein, F-69 Villeurbanne, France