

SYNTHÈSE *de novo* DE GLYCOGÈNE PAR UN MUTANT D'*Escherichia coli* DÉPOURVU D'ACTIVITÉS GLUCOSE-PHOSPHATE ISOMÉRASE ET D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE DÉSHYDROGÉNASE*

J P CHAMBOST, A FAVARD ET J CATTANEO

Laboratoire de Chimie Bactérienne, C N R S, 13-Marseille (IX^e) (France)

(Reçu le 29 novembre 1971, accepté après modification le 23 février 1972)

ABSTRACT

A mutant of *E. coli* lacking both D-glucose-phosphate isomerase and D-glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesizes glycogen when supplemented with D-glucose. The cells grown on D-gluconate, without D-glucose, contain all the enzymes for glycogen synthesis but are devoid of glucoside primer. However, this strain is able to synthesize glycogen rapidly and without lag when it is supplemented with D-glucose. This *de novo* synthesis does not seem to be limited by the energy charge of the cells.

SOMMAIRE

Un mutant, dépourvu d'activité glucose-phosphate isomérase et glucose-6-phosphate déshydrogénase, synthétise du glycogène à partir de D-glucose quand celui-ci est fourni en plus du substrat métabolisable. Les cellules cultivées sur D-gluconate, en l'absence de D-glucose, contiennent toutes les enzymes de la glycogénèse mais sont pratiquement dépourvues d'amorces glucosidiques. Elles sont cependant capables de synthétiser rapidement le glycogène sans phase de latence apparente, après addition de D-glucose au milieu. Cette synthèse « *de novo* » ne semble pas être limitée par le niveau d'énergie des cellules.

INTRODUCTION

Chez les bactéries, l'accumulation de glycogène est induite ou fortement accélérée par l'arrêt de la croissance ou, d'une manière plus générale, par des conditions où le taux de production de l'ATP est supérieur à son taux d'utilisation^{1,2}. Il est admis que cet excès d'énergie permet la biosynthèse du glycogène. Les travaux de Preiss^{3,4} ont montré que la régulation de cette biosynthèse ne s'effectue pas au niveau de la glycogène synthétase comme chez les mammifères, mais au niveau de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, enzyme qui catalyse la synthèse du donneur de groupe-

*Dédicé au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire

ments D-glucosyles, l'ADP-glucose L'activité de cette enzyme est contrôlée par de nombreux effecteurs³ Cette dernière est activée par plusieurs intermédiaires de la glycolyse et inhibée par le 5'-AMP (adénosine 5'-phosphate), l'ADP (adénosine 5'-diphosphate) et les phosphates inorganiques De plus, l'ATP (adenosine 5'-triphosphate) étant un substrat et un activateur de l'enzyme, la synthèse de l'ADP-glucose [adenosine 5'-(α -D-glucopyranosyl-pyrophosphate)] et, par suite, la synthèse du glycogène doivent donc être sous la dépendance de la charge d'énergie de la cellule^{5 6} L'étude de mutants^{4 7} chez qui la structure de l'ADP-glucose pyrophosphorylase a été modifiée a permis de montrer que les effets régulateurs de ces métabolites, observés *in vitro*, ont bien une signification physiologique Cependant, puisque la formation de nouvelles liaisons glucosidiques α -D-(1→4) par les synthétases bactériennes exige, en général, la présence d'une amorce glucosidique, la vitesse de biosynthèse du glycogène doit être également contrôlée au niveau de la glycogène synthétase par la quantité d'amorce présente dans les cellules

Un mutant d'*Escherichia coli* K10, DF 2000, isolé par Fraenkel⁸, nous a paru très intéressant pour étudier la synthèse du glycogène *in vivo* Ce mutant a perdu l'activité glucose-phosphate isomérase et l'activité glucose-6-phosphate deshydrogénase Il est donc incapable d'utiliser le D-glucose comme substrat de croissance, mais il peut se développer sur d'autres sources de carbone telles que le D-gluconate, le mannitol, le glycerol et le succinate Les travaux de Fraenkel⁹ ont montré que, lorsque le D-glucose est fourni en plus du substrat métabolisable, ce mutant peut l'accumuler sous forme de D-glucose 6-phosphate et d'un D-glucanne Dans cette étude, nous avons isolé et caractérisé ce D-glucanne Il a une structure semblable à celle des glycogènes isolés à partir d'autres souches d'*E. coli* Étant donné que chez cet organisme le D-glucose n'est utilisé que pour la synthèse du D-glucose 6-phosphate et du glycogène, la vitesse de synthèse de ce glycogène a pu être étudiée *in vivo* par incorporation de D-glucose marqué Les résultats obtenus montrent que des cellules en croissance exponentielle sur D-gluconate, pratiquement dépourvues d'amorces glucosidiques, sont capables de synthétiser le glycogène sans phase de latence apparente et que cette synthèse *de novo* ne semble pas limitée par le niveau d'énergie de la cellule

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matiriel — La souche K10 (Hfr C) de *E. coli* (souche sauvage) et le mutant DF 2000 qui est un double mutant ayant perdu à la fois l'activité glucose-phosphate isomérase (D-glucose-6-phosphate-aldo-cetoisomérase, EC 5.3.1.9) et l'activité glucose-6-phosphate deshydrogenase (D-glucose-6-phosphate NADP oxydoreductase EC 1.1.1.49) sont deux souches prototrophes Nous les devons à l'obligeance du Dr D. G. Fraenkel

Le milieu utilisé est un milieu minimum décrit précédemment^{1,2} contenant en plus du chlorhydrate de thiamine (3 mg/l) et du D-gluconate de sodium (4 g/l) Dans les expériences effectuées en présence de D-glucose, celui-ci est ajouté à une concentration de 0,5 g/l

Le D-glucose-*U*-¹⁴C provient du Commissariat à l'Énergie Atomique (France) Il a été dilué avec du D-glucose froid et ajouté au milieu de façon à obtenir une concentration de 0,5 mg/ml avec une activité spécifique de 30 000 c p m par mg Le D-glucosinate-*U*-¹⁴C de sodium provient du Radiochemical Centre (Amersham, Angleterre), il a été ajouté au milieu de culture de façon à obtenir une concentration de 5 mg/ml avec une activité spécifique de 16 500 c p m par mg

Les enzymes utilisées, α -amylase [(1→4)- α -D-glucanase 4-glucanohydrolase, EC 3 2 1 1], β -amylase [(1→4)- α -D-glucanase maltohydrolase, EC 3 2 1 2], phosphorylase [(1→4)- α -D-glucanase orthophosphate glucosyltransferase, EC 2 4 1 1], proviennent de Sigma Chem Co (St Louis, Mo, E U) La phosphorylase *b* du muscle de lapin est un don du Dr H Buc de l'Institut Pasteur, Paris

Méthodes analytiques — Les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry et al¹⁰, toutes les lectures étant reportées à une courbe standard préparée avec de l'albumine de plasma de bœuf cristallisée (Armour Laboratories, Eastbourne, Angleterre)

Le dosage du glycogène dans les cellules a été effectué selon la méthode de Hassid et Abraham¹¹ modifiée de la façon suivante aux cellules provenant de 10 ml de culture, on ajoute 0,3 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 30% Le mélange est porté à ébullition pendant 30 min Après addition de 2 gouttes d'une solution de sulfate de sodium à 0,1%, le glycogène est précipité par l'éthanol (1 ml) La suspension est portée à 80° et refroidie à la température ambiante Les échantillons sont ensuite centrifugés Les culots sont lavés une fois avec de l'éthanol à 60% puis hydrolysés à reflux avec l'acide chlorhydrique v/v (0,5 ml) pendant 3 h Après neutralisation, la quantité de D-glucose est déterminée par la méthode à la glucose oxydase (Glucostat, Bulletin technique, Worthington Biochem Corp, Freehold, N J)

Incorporation du D-glucose radioactif dans le glycogène — Les cellules de 10 ml de culture sont rapidement refroidies à des temps différents et après centrifugation sont lavées deux fois avec du tampon phosphate de potassium 0,1M, pH 7,0, contenant du D-glucose non-radioactif (1 mg/ml) On ajoute aux cellules 0,2 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 60% et 0,2 ml d'une solution de glycogène (2,5 mg/ml) Les mélanges sont portés à ébullition pendant 30 min et le polysaccharide est précipité par addition de méthanol contenant 1% de chlorure de potassium Le précipité de glycogène est dissous dans l'eau (0,4 ml) et reprecipite par le méthanol (2 ml) additionné de chlorure de potassium Après centrifugation, le culot est dissous dans l'eau (1,0 ml) Le comptage est effectué sur 0,5 ml de cette solution dans 14 ml de liquide de Bray¹² dans un appareil à scintillation (Nuclear-Chicago)

Dosage des enzymes — L'activité de la glycogène synthétase est mesurée par la méthode de Preiss et Greenberg¹³, qui consiste à suivre la vitesse de transfert du D-glucose-*U*-¹⁴C de l'ADP-glucose-*U*-¹⁴C au glycogène

L'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (ATP α -D-glucose-1-phosphate adenylyltransférase, EC 2 7 7 6) a été déterminée selon Preiss et al³ en suivant la synthèse de l'ATP-³²P à partir de l'ADP-glucose et de pyrophosphate-³²P

L'activité de l'enzyme branchante a été déterminée par la méthode de Brown et

Brown¹⁴ Les mélanges réactionnels contenaient . 10 µmoles de tampon glycyl-glycine pH 6,8, 0,5 µmole de 5'-AMP, 50 µmoles de α -D-glucopyranosyl phosphate, 10 µmoles de 2-hydroxy-1-éthanethiol, 100 µg de phosphorylase a et l'extrait cellulaire à tester contenant environ 100 µg de protéines

Le D-glucose total a été déterminé par hydrolyse des cellules dans l'acide sulfurique M pendant 3 h suivi du dosage du D-glucose par la glucose oxydase

Extraction et purification du polysaccharide intracellulaire — Le polysaccharide a été isolé à partir de 20 l de culture sur D-gluconate en présence de D-glucose. Les cellules ont été récoltées en phase stationnaire de croissance. Elles contenaient 12,5 % (poids sec) de D-glucanne. Le procédé d'extraction est le suivant : les cellules sont centrifugées et lavées avec du tampon 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (Tris)-acide chlorhydrique 0,05M de pH 7,0. Elles sont ensuite extraites dans le même tampon dans une French press à 850 kg/cm² en présence de chlorure mercurique 0,01M. L'extrait est ensuite centrifugé pendant 30 min à 1 500 g. Les culots sont lavés avec le tampon d'extraction et centrifugés à nouveau à 1 500 g. Les deux surnageants sont réunis et centrifugés à 105 000 g pendant 1 h. Le culot, qui contient 85 % du D-glucose total de l'extrait brut, est mis en suspension dans du tampon Tris-HCl 0,01M de pH 8 contenant du chlorure de sodium 0,05M. La solution obtenue est passée sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée avec le même tampon. Le polysaccharide, qui n'est pas adsorbé sur la colonne, sort immédiatement dans les fractions eluées après le volume mort. Ces fractions sont réunies, dialysées pendant 15 h contre de l'eau distillée et concentrées. Après précipitation par 1 vol d'éthanol, le polysaccharide est redissous de manière à obtenir une solution à 3 % environ. Cette solution est centrifugée à 1 500 g, puis le produit est reprécipité 3 fois par 1 vol d'éthanol, il est lavé à l'éthanol, puis à l'éther et séché.

Le D-glucanne purifié a été caractérisé par les méthodes décrites par Kjølberg et Manners¹⁵ et par Fales¹⁶. Les sucres réducteurs et le maltose libérés par l'action de l' α -amylase ou de la β -amylase ont été mesurés par la méthode au ferricyanure de Park et Johnson¹⁷, modifiée selon Sigal *et al*².

L'hydrolysat acide du polysaccharide a été analysé par chromatographie ascendante sur papier Arches 310 avec le solvant eau-éthanol-nitrométhane (23 41 35, v/v)

RÉSULTATS

Les travaux de Fraenkel⁹ ont montré que le mutant DF 2000 était capable de former des colonies sur milieu minimum avec différentes sources de carbone, telles que le D-gluconate, le mannitol, le glycérol, le succinate et le D-xylose. L'addition de D-glucose aux cultures de ce mutant en phase exponentielle sur certains de ces substrats provoque une inhibition de la croissance. Nous avons vérifié cet effet sur les différents substrats et observé que le D-gluconate était le seul pour lequel l'addition de D-glucose ne provoquait aucune modification du taux de croissance. C'est pourquoi nous avons utilisé le D-gluconate pour effectuer cette étude de la synthèse du glycogène *in vivo*.

Caractérisation du polysaccharide accumulé par le mutant DF 2000 — Lorsqu'on fournit du D-glucose à des cellules de ce mutant cultivées sur D-gluconate, le D-glucose est métabolisé essentiellement sous forme de D-glucose 6-phosphate et d'un D-glucanne.⁹ Nous avons isolé et caractérisé ce D-glucanne à partir d'une culture en phase stationnaire, la croissance étant limitée par la source d'azote. Nous avons employé une méthode d'extraction relativement douce (voir méthodes) afin d'éviter la dégradation du produit. Nous avons abandonné la méthode d'extraction à l'hydroxyde de potassium décrite précédemment² bien que celle-ci donne des degrés de purification meilleurs. Nous avons obtenu ainsi un produit contenant 89 % de D-glucose et 1 % de protéines. L'analyse de l'hydrolysat acide par chromatographie sur papier ne donne que du glucose. Le Tableau I montre que la structure de ce D-glucanne est peu différente des glycogènes que nous avons isolés à partir d'autres souches d'*E. coli*. Il faut noter cependant que la turbidité à 420 nm des solutions de ces glycogènes était plus faible, ceci est dû vraisemblablement à la diminution de la taille moléculaire moyenne par l'extraction à l'hydroxyde de potassium.¹⁸ On peut conclure de cette étude que le mutant DF 2000 accumule, en présence de D-glucose, un polysaccharide de type glycogène.

TABLEAU I
PROPRIÉTÉS ET STRUCTURE DE GLYCOCÈNES ISOLES D'*E. coli*

| <i>Propriétés et structure</i> | <i>Glycogènes d'E. coli</i> | |
|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| | <i>DF 2000</i> | <i>Autres souches²</i> |
| Pureté (%) | 89 | 93-98 |
| Dégénération par α -amylase ^a (%) | 67,5 | 62-71 |
| Dégénération par β -amylase ^b (%) | 50,3 | 47-56 |
| Liaisons α -D-(1→6) ^c (%) | 9,5 | 8,8-10,6 |
| CL α -amylase ^d | 10,5 | |
| CL periodate ^e | 11,7 | 10-13 |
| ECL ^f | 7,8 | 8-9 |
| ICL ^g | 1,7 | 1-3 |
| Complexes avec l'iode | | |
| $\lambda_{\text{max}}^{\text{aux}}$ (nm) | 440 | 420-455 |
| Absorbance à λ_{max} | 0,178 | 0,120-0,230 |
| Opacité des solutions aqueuses à 1 % à 420 nm | 1,08 | 0,5-0,8 |

^aDegré (en %) de conversion apparente en maltose par action de l' α -amylase. ^bDegré (en %) de conversion en maltose par action de la β -amylase. ^cCalculé à partir du degré de dégradation par l' α -amylase selon la méthode de Kjøberg et Manners.¹⁵ ^dLongueur de chaîne moyenne déterminée par la conversion apparente en maltose par action de l' α -amylase. ^eLongueur de chaîne moyenne déterminée par oxydation par l'ion periodate.¹⁶ ^fLongueur de chaîne externe. ^gLongueur de chaîne interne.

Accumulation du glycogène pendant la croissance sur D-gluconate, en présence de D-glucose — La Figure 1 montre que le mutant contient environ 5% de glycogène en phase exponentielle sur D-gluconate additionné de D-glucose et que l'arrêt de la croissance, dû à l'épuisement de la source d'azote, induit une accélération de la

synthèse de ce polysaccharide jusqu'à ce que les cellules en contiennent environ 15% de leur poids sec

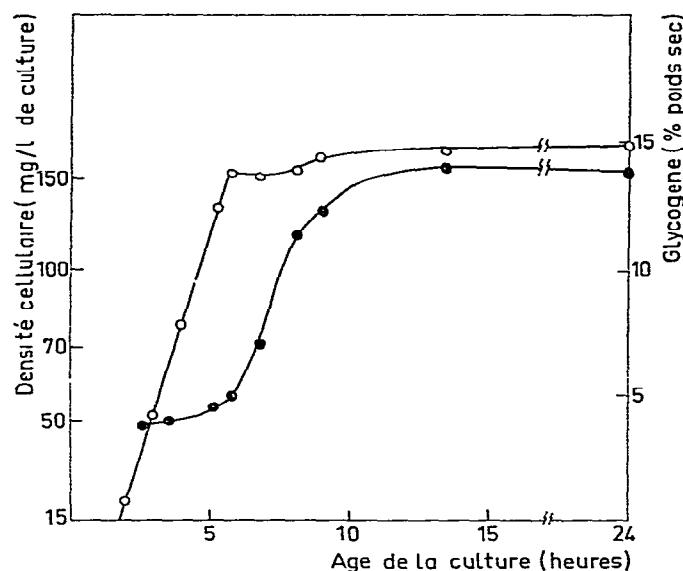


Fig 1 Accumulation de glycogène par le mutant DF 2000 cultivé sur D-gluconate+D-glucose,
—○— densité cellulaire de la culture (mg/l), —●— % du poids sec cellulaire

Absence d'amorces glucosidiques dans les cellules cultivées en l'absence de D-glucose — Par suite de la perte des activités glucose-phosphate-isomérase et glucose-6-phosphate-deshydrogénase, la synthèse du D-glucose et celle du glycogène à partir de D-gluconate doivent être excessivement réduites. En effet, nous avons trouvé que les cellules de DF 2 000, en croissance exponentielle sur D-gluconate, contiennent 0,76% (poids sec) de D-glucose total alors que les cellules de la souche sauvage, cultivées dans les mêmes conditions, en contiennent 5% (glycogène 3,5%). La teneur en glycogène des cellules du mutant est impossible à déterminer par les méthodes usuelles. Par une expérience de dilution isotopique, nous avons montré que les cellules en croissance exponentielle sur D-gluconate- $U-^{14}C$ contiennent moins de 0,05% de glycogène. Même en phase stationnaire de croissance, la teneur en D-glucose des cellules ne dépasse pas 1%.

Chez ce mutant, cultivé en l'absence de D-glucose, la synthèse du glycogène est donc pratiquement nulle et la synthèse du D-glucose elle-même est très réduite, la petite quantité de D-glucose formé étant probablement utilisée pour la synthèse des parois.

Présence des enzymes de la glycogénèse dans les cellules de DF 2000 — Que les cellules soient placées ou non dans les conditions où elles peuvent synthétiser le glycogène, l'ADP-glucose pyrophosphorylase, la glycogène synthétase et l'enzyme de branchement sont présents comme le montre le Tableau II. De plus, le niveau de ces

enzymes n'augmente pas sensiblement lorsque les cellules sont cultivées en présence de D-glucose. Ces enzymes sont donc constitutives ou, du moins, ne sont pas induites par le D-glucose ou un de ses dérivés impliqués dans le métabolisme du glycogène.

TABLEAU II

NIVEAU DES ENZYMES DE SYNTHÈSE DU GLYCOGENE CHEZ *E. coli* DF 2000

| Conditions de croissance | Glycogene (% poids sec) | ADP-glucose pyrophosphorylase ^a | Glycogene- synthétase ^b | Enzyme de branchement ^c |
|--------------------------------|----------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| D-Gluconate | | | | |
| phase exponentielle | <0,05 | 1,07 | 1,67 | 28,2 |
| phase stationnaire | | 1,40 | 1,64 | |
| D-Gluconate + D-glucose | | | | |
| phase exponentielle | 4-5 | 0,88 | 2,1 | |
| phase stationnaire | 15 | 1,5 | 1,84 | 29,6 |

^aμmoles d ADPG synthétisé en 15 min par mg de protéines ^bμmoles de D-glucose incorporé dans le glycogène en 15 min par mg de protéines ^cμmoles de phosphate inorganique formé en 60 min par mg de protéines

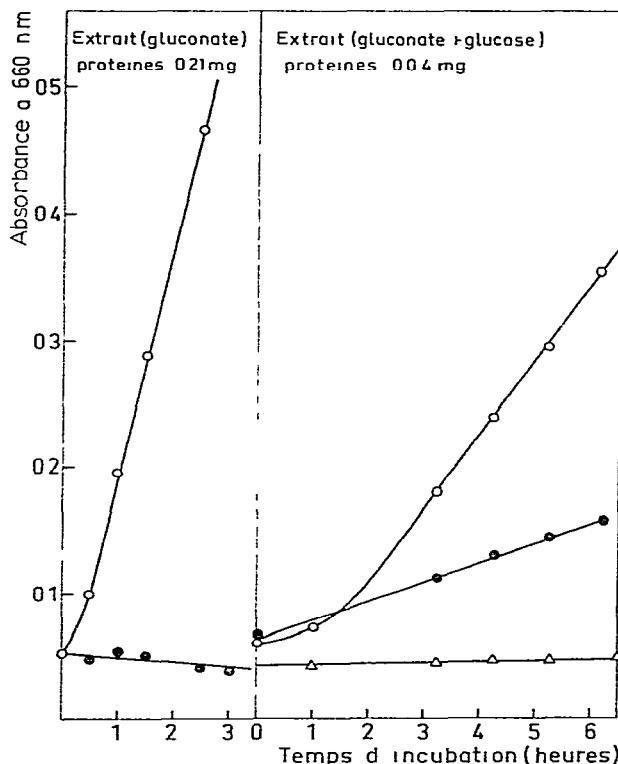


Fig. 2 Activité de l'enzyme de branchement dans les extraits de DF 2000 —●— en présence d'extract bouilli, —○— en présence d'extract non bouilli, —△— contrôle sans extract

L'enzyme de branchement a pu être dosee par la méthode de Brown et Brown¹⁴, qui consiste à mesurer l'activation, par l'enzyme de branchement, de la synthèse *de novo* du glycogène catalysée par la phosphorylase de lapin. Ce dosage ne donne pas des résultats très précis avec des souches qui synthétisent du glycogène parce que celui-ci sert d'amorce à la phosphorylase. La Figure 2 montre d'une part que les extraits des cellules cultivées sur D-gluconate ont une activité branchante puisqu'ils sont capables d'activer la synthèse *de novo* du glycogène, d'autre part que cette activation n'est pas due à la présence d'amorces dans l'extrait, en effet, l'extrait bouilli n'a aucun effet sur la vitesse de la réaction. Cette expérience apporte une preuve supplémentaire de la faible quantité d'amorces glucosidiques présentes dans les cellules de DF 2000 cultivées en l'absence de D-glucose. Avec les cellules cultivées en présence de D-glucose, il est nécessaire de diluer davantage l'extrait car il contient suffisamment d'amorce pour activer la synthèse *de novo*. L'activité de l'enzyme branchante peut être estimée par la différence des activations obtenues avec les extraits bouillis et non bouillis lorsque ceux-ci sont suffisamment dilués.

Chez les entérobactéries⁴, 70 à 95 % de la (1→4)- α -D-glucanase synthétase est particulière. On la trouve dans les fractions qui sédimentent entre 30 000 et 105 000 g. Comme la majeure partie du glycogène intracellulaire se retrouve aussi dans ces fractions, il est généralement admis que la synthétase est liée au glycogène et forme un complexe enzymatique particulier. Cependant nous avons trouvé que 90 % de la glycogène synthétase présente dans les cellules de DF 2000 cultivées sur D-gluconate

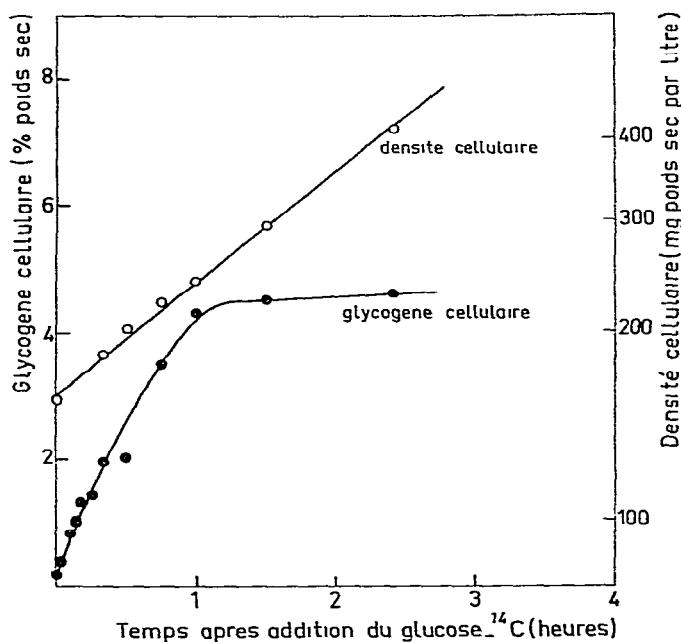


Fig 3 Formation de glycogène après addition de glucose marqué à une culture de DF 2000 en croissance exponentielle sur D-gluconate

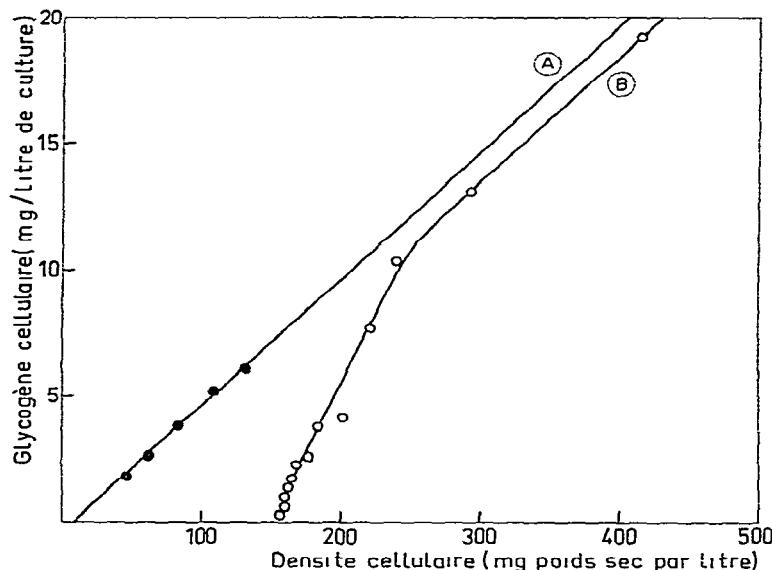


Fig 4 Vitesse différentielle de synthèse du glycogène par DF 2000 (A) Dans des cellules en phase exponentielle sur D-gluconate + D-glucose depuis plusieurs générations (B) Dans des cellules en phase exponentielle sur D-gluconate (vitesse mesurée à partir de l'addition de D-glucose marqué à la culture)

TABLEAU III

SYNTHÈSE *de novo* DU GLYCOGENE PAR *E. coli* DF 2000 EN PHASE EXPONENTIELLE ET EN PHASE STATIONNAIRE

| Temps d'incubation après addition de D-glucose (min) | Glycogene (% poids sec) | |
|--|----------------------------|-------------------|
| | Log ^a | Stat ^b |
| 0,5 | 0,20 | 0,13 |
| 2 | 0,30 | 0,24 |
| 4 | 0,62 | 0,56 |
| 6 | 0,77 | 0,78 |
| 8 | 0,92 | 0,92 |
| 10 | 1,22 | 1,15 |
| 15 | 1,52 | 1,52 |
| 20 | | 1,57 |
| 25 | | 2,01 |
| 30 | 2,45 | 2,25 |
| 45 | 2,68 | 2,7 |
| 60 | 3,22 | 3,16 |

^aDans cette expérience, le D-glucose marqué est ajouté à des cellules en croissance exponentielle à une densité bactérienne de 157 mg/l ^bDans cette expérience, le D-glucose est ajouté à des cellules remises en suspension dans un milieu sans azote avec du D-gluconate comme source d'énergie (densité bactérienne 205 mg/l) Les cellules provenaient d'une culture sur D-gluconate en phase exponentielle

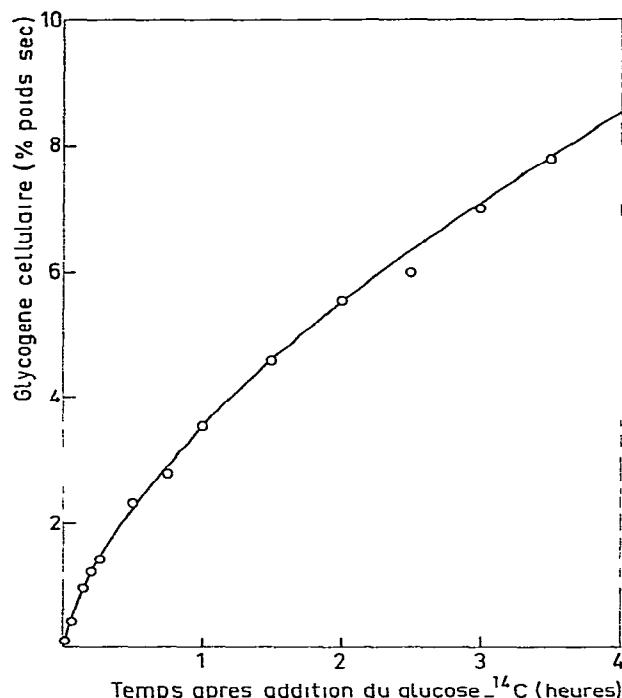


Fig 5 Accumulation de glycogène par des cellules de DF 2000 en suspension dans un milieu sans azote contenant du D-glucose et du D-gluconate. Les cellules qui ont été remises en suspension sont des cellules en phase exponentielle sur D-gluconate. La vitesse d'accumulation a été suivie par incorporation du D-glucose marqué dans le glycogène.

sedimente à 105 000 g malgré l'absence de glycogène intracellulaire. L'enzyme, chez ce mutant, est donc réellement particulière et semble liée à des structures membranaires. En effet, elle sedimente dans les mêmes conditions que le cytochrome membranaire¹⁹.

Incorporation du D-glucose-U-¹⁴C par les cellules de DF 2000 cultivées sur D-gluconate — L'adjonction de D-glucose à des cellules en croissance exponentielle sur D-gluconate ne provoque aucun changement du taux de croissance. Il est assimilé principalement sous forme de D-glucose-6-phosphate et de glycogène, ce qui permet de suivre la vitesse de formation de ce glycogène par une mesure d'incorporation du D-glucose-U-¹⁴C dans le polysaccharide précipité à l'éthanol. La Figure 3 montre que la biosynthèse du glycogène commence immédiatement après l'addition de D-glucose sans phase de latence apparente. En une génération environ, la concentration en glycogène atteint 5% du poids sec cellulaire, teneur égale à celle des cellules cultivées sur D-gluconate et D-glucose depuis plusieurs générations. La Figure 4 représente la vitesse différentielle de formation du glycogène d'une part dans une culture sur D-gluconate et D-glucose (Fig. 4A) et d'autre part dans une culture sur D-gluconate à partir du moment où on ajoute le D-glucose (Fig. 4B). On voit que dans cette dernière

expérience la vitesse différentielle est rapide au départ (14%) malgré l'absence de composés glucosidiques pouvant servir d'amorces, puis se ralentit pour atteindre finalement la vitesse différentielle observée dans des cultures sur D-gluconate et D-glucose (5%)

Nous avons étudié d'autre part l'incorporation du D-glucose- $U^{-14}C$ par des suspensions de cellules en milieu minimum sans azote avec le D-gluconate comme source d'énergie Pour cela, des cellules en croissance exponentielle sur D-gluconate ont été récoltées, lavées puis remises en suspension dans ce milieu. Dans ces conditions, le D-gluconate n'étant pas utilisé pour la biosynthèse des protéines, on pouvait s'attendre à une vitesse d'incorporation plus élevée que celle observée avec des cellules en croissance En réalité, le Tableau III montre que la vitesse de biosynthèse du glycogène est pratiquement la même pendant les soixante premières minutes mais que la teneur des cellules en glycogène continue à augmenter dans le cas des cellules qui ne se développent pas (Fig 5)

DISCUSSION

L'addition de D-glucose à des cellules de DF 2000 en croissance exponentielle sur D-gluconate provoque l'accumulation immédiate de glycogène sans modifier le taux de croissance Cette synthèse rapide et sans latence montre que la formation intermédiaire d'oligosaccharides libres de faible poids moléculaire est peu probable et que les cellules en croissance sur D-gluconate doivent disposer de l'énergie nécessaire et de tout l'équipement enzymatique sous une forme active

Les conditions qui favorisent la biosynthèse du glycogène bactérien^{1 2} suggéraient que celle-ci pouvait être contrôlée par le niveau d'énergie libre dans les cellules En effet, en phase exponentielle où la majeure partie de l'énergie disponible est utilisée pour la biosynthèse des macromolécules essentielles comme les protéines et les acides nucléiques, la biosynthèse du glycogène est lente ou même nulle En phase stationnaire, au contraire, il y aurait un excès d'énergie libre qui permettrait cette biosynthèse Cependant, les résultats obtenus avec DF 2000 montrent que le D-glucose ajouté à des cellules en phase exponentielle provoque une synthèse de glycogène aussi rapide que lorsque le D-glucose est ajouté à des cellules en phase stationnaire Les cellules en phase exponentielle possèdent donc assez d'énergie pour permettre la biosynthèse du glycogène

Nous avons montré que les enzymes nécessaires à cette synthèse sont présentes dans les cellules en phase exponentielle sur D-gluconate et que leur niveau n'augmente pas sensiblement après addition de D-glucose au milieu ou lorsque les cellules entrent en phase stationnaire

Les glycogène-synthétases décrites jusqu'ici⁴ semblent exiger la présence d'une amorce glucosidique pour être actives, or les cellules de DF 2000 cultivées sur D-gluconate, avant l'addition de D-glucose, en semblent pratiquement dépourvues, elles sont cependant capables, dès qu'on leur fournit du D-glucose, de synthétiser rapidement du glycogène La présence d'une petite quantité de polysaccharide lié à l'enzyme et

difficilement détectable ne peut être exclue Si les cellules ne contiennent réellement pas d'amorces glucosidiques, trois hypothèses peuvent être envisagées (a) il existe dans les cellules un autre système enzymatique, différent des glycogène-synthétases connues, qui n'a pas besoin d'amorce pour fonctionner, (b) dans certaines conditions, les glycogène-synthétases sont capables de fonctionner sans amorce, (c) il existe dans les cellules des accepteurs de résidus de D-glucose, autres que les D-glucannes et qui servent d'amorce aux glycogène-synthétases

Gahan et Conrad²⁰ ont décrit chez *A aerogenes* un système capable de synthétiser du glycogène *de novo* et qui est activé par un facteur protéique contenu dans les extraits cellulaires Le mécanisme de ce procédé semble différent du mécanisme habituel de synthèse du glycogène En effet, l'allongement des chaînes ne se ferait pas par les extrémités non réductrices de la molécule mais par l'extrémité réductrice Il est possible qu'un mécanisme semblable soit utilisé par *E coli* pour la synthèse *de novo* du glycogène, car les courbes de formation de ce polysaccharide que nous avons obtenues *in vivo* ne correspondent pas à un processus autocatalytique comme devrait l'être la synthèse par le système connu glycogène-synthétase-enzyme de branchement D'autre part, la nature particulière de la glycogene-synthétase peut suggerer une liaison de cette enzyme à des éléments structuraux de la membrane, pouvant servir éventuellement d'amorce

La synthèse du glycogène bactérien est vraisemblablement contrôlée au niveau de l'ADPG pyrophosphorylase par les concentrations relatives des activateurs et inhibiteurs de cette enzyme^{3 21,22} En effet, l'étude de mutants⁴ a confirmé le rôle physiologique des inhibiteurs dans la régulation de la biosynthèse Cette biosynthèse est déréprimée en phase exponentielle de croissance chez des mutants qui possèdent une ADPG pyrophosphorylase désensibilisée à ses inhibiteurs²³ Les résultats obtenus avec le mutant DF 2000 montrent que la vitesse initiale de la biosynthèse induite par l'addition de D-glucose à des cellules en croissance exponentielle est presque aussi rapide que dans les mutants déréprimés²³ mais la vitesse se ralentit par la suite pour maintenir un niveau constant de glycogène égal à 5% La rapidité avec laquelle débute la synthèse indique que les concentrations des effecteurs de l'ADPG pyrophosphorylase doivent être favorables à l'activité de cette enzyme dans des cellules se développant sur D-gluconate en l'absence de D-glucose Le ralentissement observé par la suite, et qui semble résulter de la formation du glycogène lui-même, pourrait être expliqué par une rétro-inhibition exercée par le glycogène sur sa propre biosynthèse Cette hypothèse est cependant peu vraisemblable puisque les mutants déréprimés et les cellules en phase stationnaire sont capables d'accumuler des quantités plus importantes de glycogène sans qu'il y ait augmentation du niveau des enzymes de biosynthèse Ce ralentissement pourrait être dû aussi à un changement des vitesses relatives de synthèse et de dégradation de glycogène, la vitesse de dégradation pouvant augmenter avec la concentration intracellulaire de glycogène jusqu'à atteindre la valeur de la vitesse de synthèse, maintenant ainsi un taux constant de glycogène Une troisième hypothèse peut être envisagée On peut supposer que la synthèse du glycogène provoque une variation du pool des adénylates et, en particulier, de la

concentration en 5'-AMP de telle sorte que le seuil d'inhibition de l'ADPG-pyrophosphorylase est atteint lorsqu'il y a formation d'environ 5 % de polysaccharide. En phase stationnaire, ou les dépenses en ATP sont réduites, ce seuil serait atteint beaucoup plus tard. En effet, des variations assez faibles de la concentration en 5'-AMP pourraient suffire pour modifier l'activité de l'ADPG-pyrophosphorylase car les concentrations intracellulaires de cet effecteur chez *E. coli*²⁴ semblent être très proches de la constante d'inhibition pour cette enzyme²³.

RÉFÉRENCES

- 1 I H SEGEL, J CATTANEO ET N SIGAL, *Colloq Int C N R S, Mecanismes de régulation des activités cellulaires chez les micro-organismes* (1963), 1965, p 337
- 2 N SIGAL, J CATTANEO ET I H SEGEL, *Arch Biochem Biophys*, 108 (1964) 440
- 3 J PREISS, L SHEN, E GREENBERG ET N GENTNER, *Biochemistry*, 5 (1966) 1833
- 4 J PREISS, dans B L HORECKER ET E R STADTMAN (Eds), *Current topics in cellular regulation*, vol I, Academic Press, New York, 1969, p 125
- 5 D E ATKINSON ET G M WALTON, *J Biol Chem*, 242 (1967) 3239
- 6 D E ATKINSON, *Biochemistry*, 7 (1968) 4030
- 7 J CATTANEO, M DAMOTTE, N SIGAL, F SANCHEZ-MEDINA ET J PUIG, *Biochem Biophys Res Commun*, 34 (1969) 694
- 8 D G FRAENKEL, *J Bacteriol*, 95 (1968) 1267
- 9 D G FRAENKEL, *J Biol Chem*, 243 (1968) 6451
- 10 O H LOWRY, N J ROSEN BROUGH, A L FARR ET R J RANDALL, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265
- 11 W Z HASSID ET S ABRAHAM, *Methods Enzymol*, 3 (1957) 34
- 12 G A BRAY, *Anal Biochem*, 1 (1960) 279
- 13 J PREISS ET E GREENBERG, *Biochemistry*, 4 (1965) 2328
- 14 B I BROWN ET D H BROWN, *Methods Enzymol*, 8 (1966) 395
- 15 O KJØLBERG ET D J MANNERS, *J Chem Soc*, 886 (1962) 4596
- 16 F W FALES, *Anal Chem*, 31 (1959) 1898
- 17 J T PARK ET M J JOHNSON, *J Biol Chem*, 181 (1949) 149
- 18 S A ORRELL ET E BUEDING, *J Biol Chem*, 239 (1964) 4021
- 19 J P CHAMBOST, A FAVARD ET J CATTANEO, résultats non publiés
- 20 L C GAHAN ET H E CONRAD, *Biochemistry*, 7 (1968) 3979
- 21 N GENTNER ET J PREISS, *Biochem Biophys Res Commun*, 27 (1967) 417
- 22 L C SHEN ET D E ATKINSON, *J Biol Chem*, 245 (1970) 3996
- 23 N CREUZET-SIGAL, M LATIL-DAMOTTE, J CATTANEO, J PUIG, A FAVARD ET C FRIXON, dans R PIRAS ET H G PONTIS (Éds), *Int Symp Biochem Glycosidic Linkage*, Academic Press, New York, 1972, p 647
- 24 O H LOWRY, J CARTER, J B WARD ET L GLASER, *J Biol Chem*, 246 (1971) 6511