

Université de Montréal

Rôle des protéines PII dans la régulation de l'activité et de l'état de modification de la nitrogénase chez *Rhodobacter capsulatus*

par Amélie Pelletier

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie immunologie

janvier, 2005

©Amélie Pelletier, 2004



W

4

U58

2005

v. 069

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Rôle des protéines PII dans la régulation de l'activité et de l'état de
modification de la nitrogénase chez *Rhodobacter capsulatus***

présenté par :

Amélie Pelletier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr. George Szatmari

Directeur de recherche : Dr. Patrick C. Hallenbeck

Membre du jury : Dr. Marc Drolet

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

Pour se développer et survivre, tous les organismes de la terre doivent se procurer ou synthétiser les nutriments essentiels au maintien de la vie. Parmi ceux-ci, on retrouve l'azote qui entre dans la composition des protéines et des acides nucléiques. Parmi les différentes sources azotées, le NH_3 constitue la source préférée des microorganismes pour la production des constituants cellulaires. Cependant, la quantité d'azote retrouvée dans le sol s'épuise rapidement et limite entre autres la production agricole et la survie des microorganismes. En absence de source d'azote assimilable, certaines bactéries ont la capacité de transformer l'azote diatomique en NH_3 , forme qui sera utilisée pour la production d'acides aminés. Cette transformation appelée fixation de l'azote est essentielle et pour bien comprendre et améliorer ce processus biologique, il est important que des études soient faites à ce sujet.

La fixation de l'azote est possible grâce à l'enzyme nitrogénase. Cependant, la réaction demande beaucoup d'énergie, alors il existe des mécanismes permettant la régulation de ce processus lorsqu'une source de NH_3 est ajoutée au milieu. Parmi ceux-ci, les protéines PII sembleraient avoir un impact important sur le contrôle de l'utilisation de l'azote. Il a été démontré chez quelques organismes tels qu'*Escherichia coli* qu'elles posséderaient la fonction de réguler l'activité enzymatique et l'expression génétique de la nitrogénase en réponse à la concentration d'azote cellulaire.

Rhodobacter capsulatus est une bactérie photosynthétique pourpre non sulfureuse qui a la capacité de fixer l'azote atmosphérique lorsque les sources d'azote sont insuffisantes. Chez cet organisme, la présence de deux protéines PII, GlnK et GlnB, a été prouvée mais leur rôle précis reste obscur. L'objectif de ce projet était donc l'étude des rôles de GlnK et GlnB dans la régulation de l'activité et de l'état de modification de la nitrogénase chez cet organisme.

Chez la plupart des procaryotes, le gène *glnK* se retrouve en association dans un opéron avec le gène *amtB* qui code pour une protéine membranaire transporteur de NH_3 . Comme les deux gènes sont invariablement liés, on soupçonne qu'il existe un lien fonctionnel entre les 2 protéines. Des techniques comme le SDS-PAGE et

l'immunobuvardage ont été effectuées afin de prouver l'existence d'une interaction potentielle entre les protéines GlnK et AmtB. Cependant, les résultats escomptés n'ont pas été obtenus à cause d'un manque de spécificité des anticorps produits.

De plus, les PII peuvent être modifiées de façon covalente par ajout de groupement UMP sur un résidu tyrosine. Dans le but de vérifier le rôle de cette modification dans la régulation de l'activité et de l'ADP-ribosylation de la nitrogénase, des protéines PII mutantes pour le codon Tyrosine ont été créées par mutagenèse dirigée par PCR. Il a été possible pour cette expérience de doser l'activité de la nitrogénase chez les mutants par la chromatographie en phase gazeuse et de déterminer son état de modification par immunobuvardage. Les résultats démontrent que l'uridylation de GlnK et GlnB est essentielle au bon fonctionnement de l'enzyme, car chez les mutants, aucune régulation de l'activité et de la modification de la nitrogénase n'a été observée lorsqu'une source de NH_3 a été ajoutée aux cellules bactériennes.

Mots clés : fixation de l'azote, nitrogénase, GlnK/GlnB, *Rhodobacter capsulatus*.

SUMMARY

To develop and survive, all organisms on Earth need to obtain or synthesise essential nutrients to preserve life. Among these nutrients, we find nitrogen, an important component of proteins and nucleic acids. Among different nitrogen sources, NH_3 is the favorite source for microorganisms to produce cellular constituents. Nevertheless, the amount of nitrogen found in soil runs out quickly and limits agricultural production. In the absence of an assimilable nitrogen source, some bacteria have evolved the capacity to transform diatomic nitrogen into NH_3 , a form that can be utilized to produce amino acids. This transformation, called nitrogen fixation is essential. To better understand and to improve this biological process, it is important to study this subject in further detail.

Nitrogen fixation is possible using the enzyme nitrogenase. However, the reaction is very energy demanding, so there are many mechanisms that are involved in the regulation of this process when an NH_3 source is added to the media. Among these regulating mechanisms, the PII proteins have an important impact on the control of utilization of nitrogen. It has been demonstrated in some organisms like *Escherichia coli* that these proteins can regulate the enzymatic activity and the genetic expression of nitrogenase in response to cellular nitrogen concentration.

Rhodobacter capsulatus is a photosynthetic non-sulfur bacteria that has the capacity to fix atmospheric nitrogen when nitrogen sources are insufficient. In this organism, the presence of two PII proteins, GlnK and GlnB, has been proven but their exact role is still obscure. The objective of this project was the study of the role of GlnK and GlnB in the regulation of the activity and the state of modification of the nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*.

In most of prokaryotes, the *glnK* gene is found in an operon with the *amtB* gene that codes for a NH_3 membrane transporter. Because the two genes are invariably associated, it is possible that a functional link may exist between these two proteins. Techniques like SDS-PAGE and Western blot have been carried out to prove the existence of a potential interaction between the proteins PII and AmtB. However, the expected results have not been obtained because of a lack of antibody specificity.

The PII proteins can be modified by covalent modification with a gain of a UMP group on a tyrosine residue. To verify the role of this modification in the regulation of the activity and ADP-ribosylation of nitrogenase, mutant PII proteins for the tyrosine codon have been created by PCR-directed mutagenesis. It has been possible for this experiment to measure the nitrogenase activity in mutants by gas chromatography and to determine its state of modification by Western blot. The results show that uridylylation of GlnK and GlnB is essential for proper enzymatic activity, because in mutants, no regulation of activity and modification of nitrogenase has been observed when a NH_3 source was added to the bacterial cells.

Key words : nitrogen fixation, nitrogenase, GlnK/GlnB, *Rhodobacter capsulatus*

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xii
CHAPITRE I - REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1. MÉTABOLISME DE L'AZOTE	2
1.1 CYCLE DE L'AZOTE	3
1.1.1 Nitrification	3
1.1.2 Dénitrification	4
1.1.3 Fixateurs d'azote	4
1.2 ASSIMILATION DU NH₃	5
1.2.1 La glutamate déshydrogénase	6
1.2.2 La glutamate synthase	6
1.2.3 La glutamine synthétase	6
1.3 SYSTÈME NTR	7
1.3.1 GlnD	7
1.3.2 Protéines PII	8
1.3.2.1 Structure de PII	9
1.3.2.2 Différence entre GlnB et GlnK	9
1.3.2.3 Fonction des protéines PII	11
1.3.2.3.1 Régulation de la GSI par modification covalente	12
1.3.2.3.2 Régulation de l'expression génique par NtrBC	12
1.3.3 NtrB	13
1.3.4 NtrC	13
1.3.5 AmtB	16
1.4 LA FIXATION DE L'AZOTE	17
1.4.1 Nitrogénase	17

1.4.1.1 Nitrogénase à molybdène	18
1.4.1.2 Nitrogénase à vanadium	19
1.4.1.3 Nitrogénase alternative	19
1.4.2 Identification et organisation des gènes <i>nif</i>	20
1.4.3 Les diazotrophes	22
1.4.4 Adaptations physiologiques contre O ₂	22
1.5 RÉGULATION DE LA FIXATION DE L'AZOTE	25
1.5.1 Régulation de la transcription de <i>nifA</i> par NtrC	25
1.5.2 Régulation de l'activité de NifA	27
1.5.3 Régulation de l'activité de la nitrogénase par «switch off/switch on»	28
1.5.3.1 «Switch off» par modification post-traductionnelle	28
1.5.3.2 Réponse de magnitude chez <i>R. capsulatus</i>	31
1.5.3.3 «Switch off» indépendant de l'ADP-ribosylation	32
1.5.4 Implication des protéines PII et AmtB dans le système «switch off»	32
1.6 PROJET DE RECHERCHE	34
CHAPITRE II - MATÉRIEL ET MÉTHODE	35
2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES UTILISÉS	36
2.2 CONDITIONS DE CULTURE	38
2.3 MANIPULATION DE L'ADN	39
2.3.1 Extraction de l'ADN plasmidique	39
2.3.2 Amplification par PCR	39
2.3.3 Mutagénèse dirigée par PCR	41
2.3.4 Digestion par des enzymes de restriction	41
2.3.5 Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose	42
2.3.6 Méthode de ligation	42
2.4 STRATÉGIES DE CLONAGE	42
2.4.1 Clonage de <i>glnKY51F</i> et <i>amtB</i> dans pJB3Tc20	42
2.4.2 Clonage de <i>glnBY51F</i> dans pJB3Tc20	43
2.4.3 Création d'une protéine de fusion GlnK-GST	43
2.4.4 Création d'une souche de <i>R. capsulatus</i> Δ <i>glnK</i> ::Gm ^r	44

2.5 SÉQUENÇAGE	44
2.6 TRANSFORMATION	45
2.6.1 Préparation de cellules thermocompétentes congelées	45
2.6.2 Préparation de cellules thermocompétentes fraîches	45
2.6.3 Transformation chimique	46
2.6.4 Électroporation	46
2.7 CONJUGAISON	47
2.8 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA NITROGÉNASE	47
2.9 MÉTHODES D'ANALYSE DES PROTÉINES	48
2.9.1 Expression et extraction des protéines	48
2.9.2 Purification de la protéine de fusion	49
2.9.3 Production d'anticorps anti-GlnK de lapin	50
2.9.3.1 Préparation de l'antigène	50
2.9.3.2 Immunisation et production d'anticorps	50
2.9.4 Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS	50
2.9.5 Transfert des protéines par Western blot	51
2.9.6 Détection avec des anticorps	51
2.9.7 Détection de la présence de protéines	51
2.9.8 Séparation des compartiments cellulaires	52
 CHAPITRE III – RÉSULTATS	 53
 3.1 ÉTUDE DU RÔLE DE L'URIDYLATION DES PII DANS LA RÉGULATION ET LA MODIFICATION DE LA NITROGÉNASE	 54
3.1.2 Création d'un mutant <i>glnKY51F</i> par mutagenèse dirigée par PCR	54
3.1.3 Création d'une souche <i>R.capsulatus</i> Δ <i>glnK</i> ::Gm ^r	55
3.1.4 Criblage et vérification des doubles recombinants	57
3.1.5 Création d'un mutant <i>glnBY51F</i> par mutagenèse dirigée par PCR	58
3.1.6 Vérification de la présence de la mutation Y51F dans les gènes <i>glnK</i> et <i>glnB</i>	59
3.1.7 Régulation de l'activité de la nitrogénase chez différentes souches de <i>R.capsulatus</i>	59

3.1.8 ADP-ribosylation de la protéine Fe de la nitrogénase chez différentes souches de <i>R. capsulatus</i>	62
3.2 ÉTUDE SUR LA SÉQUESTRATION DE GLNK À LA MEMBRANE	64
3.2.1 Création d'une protéine de fusion GlnK-GST	64
3.2.2 Surexpression de la protéine de fusion GlnK-GST	65
3.2.3 Purification de la protéine GlnK	66
3.2.4 Production d'anticorps anti-GlnK de lapin	67
3.2.5 Séparation et analyse des compartiments cellulaires	68
CHAPITRE IV- DISCUSSION	69
CONCLUSION	77
BIBLIOGRAPHIE	78
ANNEXE I	xiv
ANNEXE II	xv
REMERCIEMENTS	xvi

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Gènes <i>nif</i> : produits et fonctions.	21
Tableau II.	Microorganismes diazotrophes.	24
Tableau III.	Caractéristiques et provenances des souches bactériennes utilisées.	36
Tableau IV.	Caractéristiques et provenances des plasmides utilisés.	37
Tableau V.	Amorces utilisées lors de différentes réactions de PCR.	40

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le cycle de l'azote.	3
Figure 2. Entrée de l'azote dans le métabolisme.	5
Figure 3. Structure d'un monomère de (a) GlnB et (b) GlnK.	10
Figure 4. Fonctions des protéines PII.	11
Figure 5. Trois formes d'activateurs de transcription NtrC.	15
Figure 6. Composantes et réactions des deux nitrogénases : la nitrogénase à molybdène et la nitrogénase à vanadium.	18
Figure 7. Comparaison de l'organisation des gènes <i>nif</i> de (A) <i>K.pneumoniae</i> , (B) <i>A.vinelandii</i> et (C) <i>R.capsulatus</i> .	20
Figure 8. Trois niveaux de régulation de la fixation de l'azote chez <i>R. capsulatus</i> .	26
Figure 9. Modèle d'ADP-ribosylation réversible chez <i>R.rubrum</i>	29
Figure 10. Effets de l'ammonium sur A) l'activité de la nitrogénase in vivo et B) l'ADP-ribosylation de la nitrogénase pour des cultures de <i>R. capsulatus</i> hautement limitée en azote. (Réponse «switch off»)	30
Figure 11. Effets de l'ammonium sur A) l'activité de la nitrogénase in vivo et B) l'ADP-ribosylation de la nitrogénase pour des cultures de <i>R. capsulatus</i> modérément limitée en azote. (Réponse de magnitude)	31
Figure 12. Modèle proposé pour la fonction d'AmtB et GlnK dans le transport d'ammonium et leur intégration dans le système ntr de <i>E.coli</i> .	34

- Figure 13.** Fragment *glnK* de *R.capsulatus* muté par mutagenèse dirigée par PCR. 54
- Figure 14.** Gène *amtB* de *R.capsulatus* amplifié par PCR. 55
- Figure 15.** Vérification de la construction des plasmides A) pBSKABGM et B) pAP11. 56
- Figure 16.** Fragment *glnB* de *R.capsulatus* muté par mutagenèse dirigée par PCR. 58
- Figure 17.** Régulation de l'activité de la nitrogénase en présence de 200 μ M de NH_4Cl (●) ou de 100 μ M de NH_4Cl (▲) chez *R.capsulatus* SB1003. 60
- Figure 18.** Régulation de l'activité de la nitrogénase en présence de 200 μ M de NH_4Cl chez les mutants *R.capsulatus* A) *glnKY51F* et B) *glnBY51F*. 61
- Figure 19.** ADP-ribosylation de la protéine Fe chez les souches de *R.capsulatus* A) SB1003, B) *glnKY51F* et C) *glnBY51F*. 62
- Figure 20.** A) Fragment *glnKamtB* de *R.capsulatus* amplifié par PCR. B) Fragment *glnKamtB* digéré EcoRI/NotI. 64
- Figure 21.** Surexpression de la protéine de fusion GlnK-GST. 65
- Figure 22.** GlnK purifié coloré au bleu de coomassie. 67
- Figure 23.** Détection de la protéine GlnK purifiée avec les anticorps anti-GlnK de lapin produits. 68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	adénine
Ab	antibiotique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adenosine diphosphate
AMP	adenosine 5'-monophosphate
Ap	ampicilline
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
C	cytosine
°C	degré Celsius
dNTP	quatre désoxyribonucléosides triphosphates
DO	densité optique
F	phénylalanine
Fe	dinitrogénase réductase
G	guanine
Gm	gentamicine
h	heure
IgG	Immunoglobuline G
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	kilopaires de bases
kDa	kilodalton
klenow	grand fragment de l'ADN polymérase I de <i>E.coli</i>
Km	kanamycine
L	litre
lacZ	gène de la β -galactosidase
M	molaire
mM	millimolaire
mg	milligramme
min	minutes

ml	millilitre
nmole	nanomole
ori	origine de réplication
P	phosphate
pb	paires de bases
PBS	tampon phosphate salin
PCR	polymerase chain reaction
P.M.	poids moléculaire
PVDF	polyvinylidène difluoride
r	résistance
Rif	rifampicine
RNase	ribonucléase
rpn	révolution par minute
SCM	site de clonage multiple
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse en gel polyacrylamide avec SDS
T	thymine
TAE	tampon Tris-Acétate-EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline avec Tween 20
Tc	tétracycline
Tyr	tyrosine
µg	microgramme
µl	microlitre
un	unité
µM	micromolaire
W	watt
Y	tyrosine

CHAPITRE I
REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. MÉTABOLISME DE L'AZOTE

La majorité de l'azote est retrouvée dans l'atmosphère où elle existe sous forme de gaz diatomique (N_2). Ce gaz est un composé majeur de l'air puisqu'il constitue jusqu'à 78 % du volume de l'atmosphère de la terre. Le chimiste et physicien Daniel Rutherford découvrit en 1772 qu'en enlevant l'oxygène et le gaz carbonique de l'air, le gaz résiduel, c'est-à-dire l'azote, ne permettait pas la combustion et la survie d'organismes vivants. Effectivement, cet élément est requis en très grande quantité puisqu'il est le composé essentiel des protéines, des acides nucléiques et autres constituants cellulaires. Il contribue à la fabrication du matériel organique et donc à la survie des organismes sur terre. Même si la plupart de l'azote est diatomique, elle peut également se retrouver sous d'autres formes telles que l'ammoniac (NH_3), l'ammonium (NH_4^+), le nitrite (NO_2^-), le nitrate (NO_3^-) et l'azote organique (ADN, protéines).

Malgré son abondance dans l'atmosphère, l'azote diatomique est souvent le nutriment limitant pour la croissance des organismes puisqu'il possède un triple lien entre les deux atomes d'azote ($N\equiv N$). Ceci rend la molécule très stable, voire inutilisable par la majorité des êtres vivants sur terre. La plupart des bactéries préfèrent l'azote ammoniacal aux autres formes, mais il existe des microorganismes capables d'utiliser le gaz N_2 en absence de NH_3 dans le milieu. Les végétaux quant à eux, favorisent l'utilisation du nitrate alors que les animaux ne peuvent que retirer l'azote de la matière organique. Comme les sources utilisées sont différentes selon les organismes et que leur disponibilité est limitée comparativement au N_2 , il est important que l'azote soit recyclé et toujours disponible sous une forme assimilable.

1.1 CYCLE DE L'AZOTE

Le cycle de l'azote est un des procédés les plus importants retrouvés dans les écosystèmes terrestres. Il permet une succession de réactions d'oxydoréductions subies par les différentes formes d'azote afin que celles-ci soient disponibles pour assurer la survie des organismes. Ce processus continu représenté à la figure 1 est dirigé par 3 phénomènes biochimiques : la nitrification, la dénitrification et la fixation de l'azote.

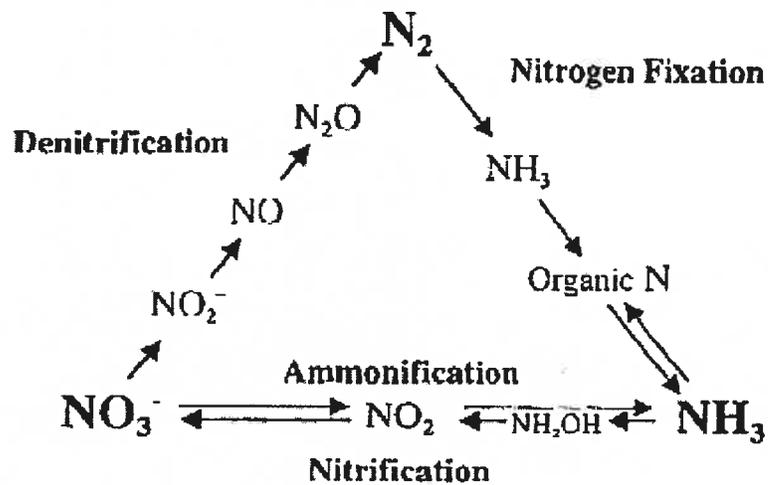


Figure 1. Le cycle de l'azote. (Arp, 2000)

1.1.1 La nitrification

La majeure partie de l'azote du sol sert de source d'énergie à des bactéries aérobies. En présence d'oxygène, ces bactéries appelées nitrificatrices oxydent l'ammonium en nitrite (NO_2^-) et en nitrate (NO_3^-) dans une réaction qui se produit en deux étapes. La première transforme le NH_4^+ en NO_2^- grâce à des espèces du genre *Nitrosomas* alors que la deuxième transforme le NO_2^- en NO_3^- grâce à des

Nitrobacter. Le nitrate produit peut ensuite être incorporé dans les tissus végétaux. Les animaux, eux, ne peuvent qu'assimiler de l'azote organique en mangeant les végétaux ou d'autres animaux. L'azote est ainsi emmagasiné principalement dans la matière organique vivante et morte. Dans l'une des étapes du cycle, cet azote organique est converti en forme inorganique via la décomposition. Les décomposeurs retrouvés dans la couche supérieure du sol modifient chimiquement l'azote organique en ammoniac. Ce processus s'appelle minéralisation ou ammonification et il est fait par une variété de bactéries, d'actinomycètes et de fungi. Les détritviores renvoient ainsi de grandes quantités d'azote dans le sol.

1.1.2 La dénitrification

Quant à la petite quantité de nitrate produite par nitrification qui n'a pas été incorporée par les végétaux, elle sera reconvertie en azote atmosphérique via la dénitrification. Ce processus réduit les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) puis en oxydes nitreux (N_2O) et en azote diatomique (N_2). Des espèces comme *Pseudomonas* accomplissent une grande partie de la dénitrification, mais il en existe d'autres comme *Thiobacillus denitrificans*, *Serratia* et *Achromobacter* qui possèdent aussi cette capacité. La transformation se produit en absence de O_2 même si ces espèces sont habituellement aérobies. Elles vont utiliser le nitrate comme accepteur final d'électrons plutôt que l'oxygène. Leur activité résulte en un retour substantiel de N_2 dans l'atmosphère, ce qui balance la quantité d'azote fixé qui s'accumule chaque année.

1.1.3 Fixateurs d'azote

Le rôle des bactéries fixatrices d'azote est de transformer le N_2 atmosphérique en NH_3 lorsqu'aucune autre source azotée ne leur est disponible. Une infime partie du NH_3 sera utilisée pour leurs besoins métaboliques alors que le reste sera libéré et mis à la disposition des autres microorganismes. Ce processus sera élaboré à la section 1.4.

1.2 ASSIMILATION DU NH_3

L'azote ammoniacal (NH_3) est la source préférée des bactéries parce que c'est sous cette forme qu'il est introduit dans les cellules pour former les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques. C'est via son incorporation dans le glutamate et la glutamine que le groupement amide sera intégré dans les réactions de biosynthèses et parviendra à la formation du matériel biologique. Chez les entérobactéries, il existe deux voies principales pour assimiler le NH_3 . La plus importante est la voie de la glutamine synthétase/glutamate synthétase (GS/GOGAT) et la deuxième implique la glutamate déshydrogénase (GDH). Elles sont illustrées à la figure 2.

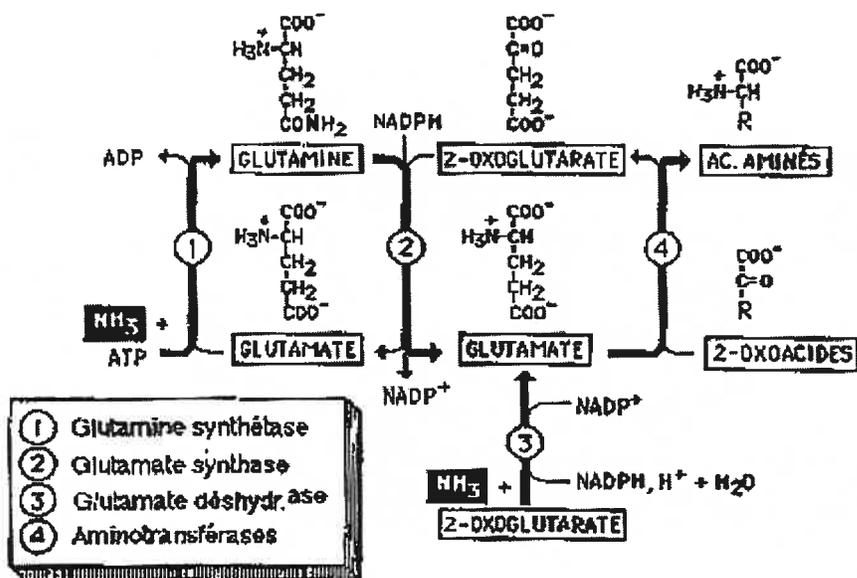


Figure 2. Entrée de l'azote dans le métabolisme. (Pelmont, 1993)

1.2.1 La glutamate déshydrogénase

Lorsque le NH_3 est présent en grande quantité, c'est la glutamate déshydrogénase qui combine l'ammonium avec le α -cétoglutarate ce qui produit du glutamate. Cet enzyme est peu spécifique et ne nécessite pas d'énergie.

1.2.2 La glutamate synthétase

La glutamate synthétase (GOGAT) a pour fonction de prévenir l'accumulation de la glutamine pendant une carence en NH_3 ce qui maintient un rapport physiologique entre la glutamine et le α -cétoglutarate. Cet enzyme produit du glutamate dans une réaction qui transfère le groupement amide de la glutamine au cétoglutarate.

1.2.3 La glutamine synthétase

Lorsque la source de NH_3 s'épuise dans le sol, l'organisme utilise une voie de secours qui demande l'activation d'un enzyme beaucoup plus spécifique, la glutamine synthétase (GS). La forme la plus connue de l'enzyme est GSI et elle est composée de douze sous-unités identiques encodées par *glnA*. Ce gène se retrouve dans l'opéron *glnAntrBC* chez les entérobactéries tandis qu'on le retrouve au niveau de l'opéron *glnBA* chez *Rhodobacter capsulatus* et *Rhodobacter sphaeroides* (Foster-Harnett et Kranz, 1994). Au cours de l'évolution bactérienne, d'autres formes de glutamine synthétase ont fait leur apparition. On note notamment la présence de GSII qui a été identifiée chez des *Rhizobium* (Darrow et Knotts, 1977) de même que GSIII chez les *Bacteroides* (Hill *et al.*, 1989). On retrouve aussi GlnT qui existe chez *Sinorhizobium* (Chiurazzi *et al.*, 1992).

Le rôle de la glutamine synthétase est primordial dans le métabolisme de l'azote. C'est elle qui permet son introduction dans la cellule. Cette intégration est accomplie en combinant le NH_3 avec le glutamate pour former de la glutamine. Ce processus est très spécifique et nécessite l'utilisation d'ATP. Comme cette réaction est énergétiquement défavorable pour la cellule, les bactéries ont élaboré des moyens pour contrôler la synthèse ou l'activité de la GSI. La régulation qui se fait à trois

niveaux peut être allostérique, transcriptionnelle ou par modification post-traductionnelle.

Prenons la modification covalente comme exemple. Lorsque le milieu est riche en azote ammoniacal, la GSI subit une modification par ajout d'un groupement AMP sur chacune de ses sous-unités, ce qui inactive progressivement l'enzyme. L'activité de GS diminue à mesure que la cellule retrouve une quantité d'azote suffisante pour l'assimiler sans utilisation d'énergie. Cette régulation évite la baisse inutile en ATP et protège la concentration en glutamate dans la cellule, ce qui permet une croissance rapide de l'organisme. Inversement, en milieu pauvre en NH_3 , les groupements adényles sont enlevés ce qui active la GSI à nouveau, permettant ainsi l'introduction de NH_3 dans la cellule. L'adénylation et désadénylation de GSI sont catalysées par l'ATase, un enzyme bifonctionnel adényltransférase et désadénylante codé par *glnE*.

1.3 SYSTÈME NTR

Le système ntr pour « nitrogen regulated » est très bien connu chez les entérobactéries et plusieurs protéobactéries. Ce système de régulation central coordonne l'expression des gènes responsables de l'assimilation et du catabolisme de l'azote (Merrick et Edwards, 1995). Celui-ci se compose de 5 protéines : une UTase/UR (GlnD), deux protéines PII (GlnK et GlnB), ainsi qu'un système à 2 composantes (NtrB et NtrC). Voici une description plus détaillée de chacune de ces protéines régulatrices.

1.3.1 GlnD (Uridyltransférase)

Le statut intracellulaire en azote est d'abord signalé via la protéine GlnD codée par le gène *glnD*. Celle-ci est un monomère qui possède deux activités enzymatiques : une «uridyltransférase» (UTase) et l'autre «uridylremoving» (UR). Ses activités UTase/UR permettent d'ajouter ou d'enlever un groupement UMP sur PII. Le gène *glnD* est exprimé constitutivement ce qui fait en sorte que

l'UTase/UR est toujours présent dans la cellule. Par contre, les activités transférase ou enlevante de cet enzyme sont modulées en réponse à la disponibilité en NH_3 qui est reflétée dans le ratio glutamine : cétoglutarate. Un ratio élevé indiquerait la présence de NH_3 intracellulaire et stimulerait l'activité UR de l'enzyme tandis qu'un ratio bas indiquerait une déficience en azote, ce qui activerait l'ajout d'UMP sur PII par l'UTase (Engleman *et al.*, 1978 ; Jiang *et al.* 1998). L'activité de l'UTase est affectée allostériquement par la glutamine et le cétoglutarate ; le cétoglutarate et l'ATP stimulant son activité et la glutamine l'inhibant. Alors dans certaines conditions physiologiques, l'enzyme GlnD servirait de senseur intracellulaire de l'azote et le niveau d'uridylation de PII serait le reflet de ce statut.

1.3.2 Protéines PII

Le rôle général des protéines PII est de sentir la concentration d'azote intracellulaire via leur état d'uridylation et de transmettre un signal par des interactions protéine-protéine à des enzymes impliqués dans ce métabolisme. (Drepper *et al.*, 2003). Parmi les membres des protéines PII, on retrouve chez *R. rubrum* GlnB, GlnK et GlnJ (Zhang *et al.*, 2001). Pour nos recherches, deux types nous intéressent : GlnB et GlnK codés par les gènes du même nom *glnB* et *glnK*. Le gène *glnB* a tout d'abord été identifié en 1984 par Son et Rhee grâce à son implication dans la régulation de la GSI alors que c'est en 1995 que la présence d'un second gène homologue, *glnK*, a été confirmé chez *E.coli* (van Heeswijk *et al.*, 1996). Ces deux types de protéines PII sont présents chez les protéobactéries, les actinomycètes, les firmibactéries, cyanobactéries et les archaebactéries. Elles ont même été retrouvées récemment chez certaines plantes (Drepper *et al.*, 2000 ; Masepohl *et al.*, 2002). Jusqu'à ce jour, 44 séquences hautement conservées codant pour PII sont connues.

1.3.2.1 Structure de PII

Les protéines PII ont d'abord été purifiées chez *E.coli* et *Pseudomonas putida* (Adler *et al.*, 1975). Elles se composent de 112 acides aminés et la masse moléculaire du monomère formé est de 12.4 kDa. Les structures des monomères de GlnB et GlnK sont représentées à la figure 3. Ces dernières sont similaires et contiennent deux hélices α et six feuillets β reliés ensemble par trois loupes. La plus grande s'appelle la loupe T. Elle se positionne au niveau des résidus 37 à 55 et contient le site d'uridylation (Tyr-51) (Ninfa et Atkinson, 2000). Les résidus 82 à 88 constituent la loupe B tandis que la loupe C est localisée en C-terminal entre les acides aminés 102 à 105 et possède un site de liaison à l'ATP (de Mel *et al.*, 1994 ; Arcondéguy *et al.*, 2001). Pendant quelque temps, on croyait que l'arrangement des monomères créait un tétramère de sous-unités identiques. Récemment, la cristallographie de PII a montré qu'il s'agissait en fait d'un trimère (Cheah *et al.*, 1994) avec un poids moléculaire final de 44 kDa (Adler *et al.*, 1975). La caractéristique la plus apparente du trimère est la présence des trois loupes T qui sortent d'une de ses surfaces planes (Carr *et al.*, 1996). Chacune des boucles contient à son apex le résidu Tyr en position 51. Le groupe hydroxyle de la tyrosine ainsi exposé sur la surface de la molécule le rend facilement accessible à l'uridylation par GlnD.

1.3.2.2 Différence entre GlnB et GlnK

Chez *E.coli*, la protéine GlnK présente 67 % d'homologie avec GlnB (Atkinson et Ninfa, 1999). La différence entre ces deux protéines se situe à plusieurs niveaux. D'abord, on retrouve 36 variations parmi les 112 acides aminés qui constituent ces protéines, ce qui donne une conformation protéique de base très similaire, mais qui diffère considérablement dans la structure de la loupe T ; celle de GlnK étant plus compacte que celle de GlnB (Ninfa *et al.*, 2000). La loupe T de GlnB de *E.coli* est connue comme étant essentielle dans l'interaction avec ses trois récepteurs : ATase, UTase et NtrB (Arcondéguy *et al.*, 2001 ; Jaggi *et al.*, 1996).

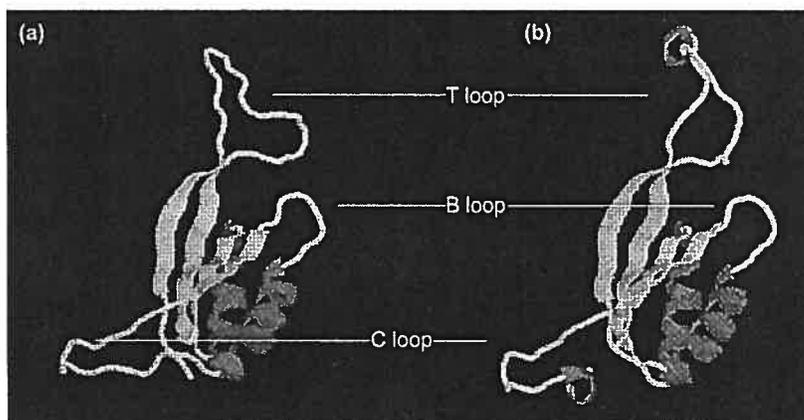


Figure 3. Structure d'un monomère de (a) GlnB et (b) GlnK. (Ninfa, 2000)

Celle de GlnK lui permet d'interagir avec l'UTase et NtrB mais n'est pas aussi efficace avec l'ATase. Ainsi, les deux protéines peuvent se substituer l'une et l'autre même si elles ne sont pas complètement interchangeables dans certaines circonstances. Par exemple, chez *K.pneumoniae*, il a été démontré que GlnK seul peut interagir avec NifL (régulateur négatif) alors que GlnB lie NifA (régulateur positif) (He *et al.*, 1998). Le rôle spécifique de GlnK dans cette régulation est la seule fonction définie élucidée jusqu'à maintenant qui permet la distinction entre GlnB et GlnK. Dans la majorité de leurs implications, la différence entre les rôles des deux protéines PII est confondante, entre autres parce qu'elles peuvent former des hétérotrimères *in vivo*. Du côté de l'organisation génétique, on retrouve chez les α -protéobactéries le gène *glnB* associé et cotranscrit avec *glnA* (*glnBA*) qui code pour la glutamine synthétase (Kranz *et al.*, 1990). Le gène *glnK* se retrouve chez la plupart des procaryotes dans un opéron avec le gène *amtB* (*glnKamtB*), un gène codant pour une protéine transporteur d'ammonium (Thomas *et al.*, 2000). Les deux opérons sont sous le contrôle de NtrC. Finalement, la dernière différence se situe au niveau transcriptionnel. Contrairement à GlnB qui est exprimée de façon constitutive, la transcription de GlnK est inhibée en présence de NH_3 .

1.3.2.3 Fonctions des protéines PII

Les protéines PII ont été découvertes vers la fin des années 60 en étudiant les facteurs qui contrôlaient l'activité de GSI chez *E.coli*. Des expériences biochimiques ont démontré que ces protéines interagissaient avec l'ATase et étaient donc des éléments clé dans la régulation de l'activité de la GSI (Shapiro *et al.*, 1969). Suite à cette découverte, d'autres études effectuées avec *E.coli*, *S. enterica*, *K. aerogenes* et *K. pneumonia* ont permis l'identification du système à deux composantes NtrBC (Merrick et Edwards, 1995). Celui-ci impliquerait PII dans une cascade de régulation très complexe qui sera décrite plus loin. Aujourd'hui, elles sont reconnues pour avoir plusieurs fonctions importantes dans le contrôle du métabolisme de l'azote microbien. Voici deux exemples qui sont représentés schématiquement à la figure 4 et expliqués dans les deux prochaines sections.

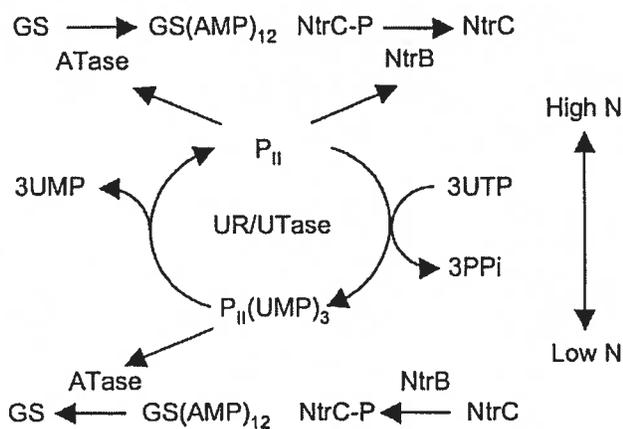


Figure 4. Fonctions des protéines PII. (Arcondéguy, 2001)

1.3.2.3.1 Régulation de la GSI par modification covalente

Comme le montre la figure 4, en carence d'azote ammoniacal, l'UTase catalyse l'uridylation de la protéine PII, plus spécifiquement de GlnB. La présence de l' α -cétoglutarate ainsi que la forme GlnB-UMP permet la formation d'un complexe avec l'ATase via sa région N-terminale. Cette association stimule alors la désadénylation de GSI qui devient active. En présence de NH_3 , la glutamine est présente et PII n'est pas uridylée. Cet état permet l'interaction de GlnB avec la région C-terminale de l'ATase et par conséquent, stimule son activité adényltransférase. Des groupements adényles sont ajoutés à chacune des sous-unités ce qui inhibe l'activité de GSI.

1.3.2.3.2 Régulation de l'expression génique par NtrBC

En présence de source azotée, les trimères de PII se complexent avec une molécule d' α -cétoglutarate et interagissent avec NtrB. Ceci stimule l'activité phosphatase de NtrB qui à son tour inactive NtrC. Inversement, en absence de NH_3 , les trimères sont modifiés (PII-UMP) et lient plusieurs molécules d' α -cétoglutarate. Sous cette forme, la protéine est incapable de s'associer à NtrB qui conserve alors son activité kinase et permet à NtrC d'être actif (Atkinson *et al.*, 1994). Les explications détaillées sur l'interaction NtrB-NtrC seront décrites dans les sections 1.3.3 et 1.3.4.

Les protéines PII sont également impliquées dans d'autres types de régulation au niveau de la fixation de l'azote. Ceux-ci seront discutés au cours de la section 1.4 qui porte sur la fixation de l'azote. Entre autres, il sera question de 1) la régulation de la transcription de *nifA*, 2) la régulation de l'activité de NifA et 3) la régulation de la nitrogénase par «switch off».

1.3.3 NtrB

Le contrôle de l'activité de NtrC en réponse à la concentration en azote est médié par NtrB qui est une protéine histidine kinase dimérique cytoplasmique. Elle possède des activités kinase et phosphatase séparées. L'activité kinase de NtrB prédomine lorsqu'un manque en azote se fait sentir. Dans de telles conditions, le domaine N-terminal détecte et transduit le signal alors que la région C-terminale s'autophosphorylle sur un résidu histidine (His-139). Le groupement phosphate est alors transféré à NtrC qui devient NtrC-P, forme qui permet l'activation de la transcription à partir des promoteurs NtrC-dépendants. Cette réaction est possible dans des conditions où l'azote est limitant parce que PII devient PII-UMP et ne peut pas lier NtrB qui peut alors conserver son activité kinase.

Cependant, en présence d'azote, c'est l'activité phosphatase qui prédomine. Ceci permet à NtrB de retirer le phosphate à NtrC. Cette activité est contrôlée par un domaine phosphotransférase/phosphatase central et par la présence de PII et de l'ATP. Comme dans cet environnement PII est non modifiée, celle-ci peut interagir avec NtrB en s'attachant à la partie N-terminale. Cette liaison crée un changement de conformation du domaine kinase et du domaine central qui adopterait alors une activité phosphatase.

1.3.4 NtrC

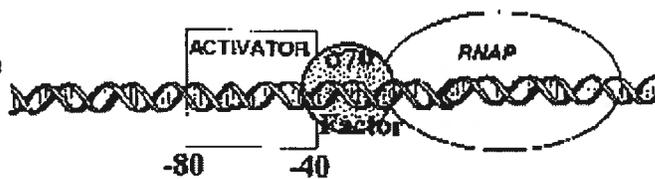
Dans le système ntr, NtrC est un activateur de transcription sigma 54 dépendant qui est typique des régulateurs de réponse. Il possède 3 domaines distincts : N-terminal, central et C-terminal. La portion N-terminale est la région régulatrice sur laquelle NtrB ajoute un groupement phosphate sur un résidu aspartate (Asp-54) en réponse à une concentration faible en azote intracellulaire. La présence d'un groupement phosphate sur NtrC-P rend la protéine transductrice de signal active. Une fois activée, elle peut lier des séquences activatrices sur l'ADN grâce à un motif hélice-tour-hélice présent dans la partie carboxyl-terminale. Le domaine central, appelé «Walker motif» (Walker *et al.*, 1982), lie l'ATP et est responsable de l'activation de la transcription. Par conséquent, NtrC-P active la transcription des

gènes du métabolisme de l'azote par l'ARN polymérase σ -54. Chez les entérobactéries, on retrouve parmi ces gènes *glnA* qui code pour GS, l'opéron *glnKamtB*, l'opéron responsable du transport de la glutamine (*glnHPQ*), celui du catabolisme de l'arginine (*astCADBE*), les gènes régulateurs de la fixation de l'azote (*nifLA*) ainsi que d'autres gènes (Merrick et Edwards, 1995).

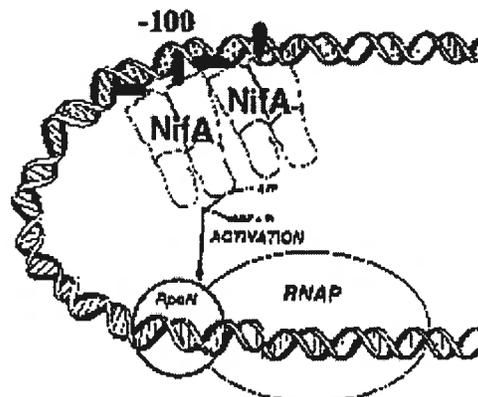
Chez *R.capsulatus*, NtrC-P active la transcription des gènes *glnBA*, *glnKamtB*, *amtY*, *nifA1*, *nifA2*, *anf* etc. (Klipp *et al.*, 2000). Cependant, même si activés par NtrC-P, aucun des promoteurs contient une séquence -24 et -12 qui est habituellement reconnue par σ -54 (Foster-Hartnett *et al.*, 1994 ; Zinchenko *et al.*, 1994 ; Cullen *et al.*, 1998). Dans chaque cas, la transcription à partir de ces promoteurs ne fonctionne pas avec une ARN polymérase σ -54 contrairement aux autres membres de la famille des activateurs NtrC. Par conséquent, NtrC de *R.capsulatus* représente un nouveau type d'activateur de transcription qui fonctionnerait avec une ARN polymérase contenant σ -70 (Bowman et Kranz, 1998; Foster-Hartnett *et al.*, 1994). Celui-ci est représenté à la figure 5.

Le système ntr de régulation du métabolisme de l'azote pourrait se résumer ainsi : en présence d'azote, UTase/UR catalyse l'enlèvement de groupements UMP sur PII ce qui permet la stimulation de déphosphorylation de NtrC par NtrB, donc l'inactivation de la transcription des gènes du métabolisme de l'azote. Ceci permet alors de contrôler la quantité d'énergie utilisée pour fixer l'azote.

1. Traditional
sigma 70-type
(eg. many)



2. Enhancer/ATP-dependent
sigma 54 (RpoN)-dependent
(eg. NifA at nifHDK
promoters)



NEW:
3. Enhancer/ATP-dependent
sigma 70-dependent
(eg. NtrC at nifA)

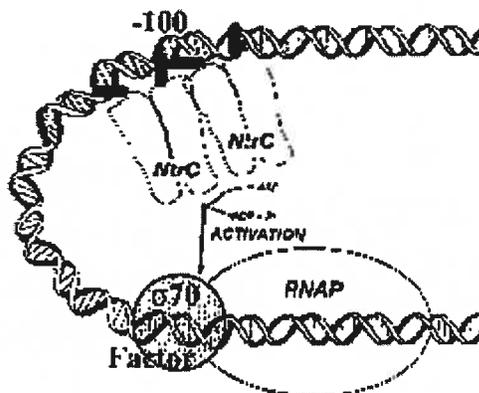


Figure 5. Trois formes d'activateurs de transcription NtrC.
(Kranz et Bowman, 1999)

1.3.5 AmtB

La protéine AmtB ne fait pas partie du système ntr mais elle semble être essentielle à la régulation de la fixation de l'azote, c'est pourquoi il en sera question dans cette section.

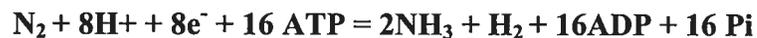
AmtB est une protéine membranaire transporteur d'ammonium. Cette protéine est retrouvée chez les bactéries, archaea, fungi, plantes et animaux, incluant les humains (sous la forme homologue Rhesus). Chez la plupart des procaryotes, le gène *amtB* forme un opéron avec le gène *glnK* et la protéine qu'il exprime possède une structure en trimère tout comme GlnK. La plupart des protéines AmtB possèdent 11 hélices transmembranaires avec la partie N-terminale extra-cytoplasmique et le C-terminal intra-cytoplasmique (Thomas *et al.*, 2000). Par contre, chez *E.coli*, il semblerait y avoir une douzième hélice en N-terminal qui permettrait à cette région de se retrouver également dans le cytoplasme.

Cette protéine voit son activité réprimée en présence de fortes concentrations d'ammonium extracellulaire, et stimulée par sa carence. Lorsque la concentration en ammonium est élevée dans le milieu, celui-ci traverse librement la membrane par diffusion passive. Par contre, lorsqu'il se fait plus rare, la diffusion rapide de l'ammonium à travers la membrane cytoplasmique est nécessaire et se fait grâce à la présence d'AmtB qui le transporte activement à l'intérieur de la cellule avec une haute affinité. De plus, AmtB est capable de récupérer l'ammonium perdu par les cellules par diffusion à travers la membrane cellulaire en le ramenant à l'intérieur. Chez *R. capsulatus*, en plus de son rôle de transporteur d'ammonium, AmtB posséderait la fonction de transducteur de signal. Il serait impliqué au niveau de la régulation de la fixation de l'azote en sentant la concentration en azote dans le milieu externe (Yakunin et Hallenbeck, 2002) et en la signalant à GlnK. Évidemment, le fait que des protéines soient génétiquement associées, qu'elles aient une structure similaire et qu'elles soient impliquées dans la régulation d'un même processus nous amène fortement à croire qu'elles peuvent interagir physiquement. Des recherches sont en cours pour spécifier l'interaction entre GlnK et AmtB qui n'a pas encore été démontré chez *R.capsulatus*. Il en sera question à la section 1.5.4.

1.4 LA FIXATION DE L'AZOTE

Dans le sol, on retrouve du NH_3 dans les composés organiques. Par contre, en absence de ceux-ci, les organismes doivent trouver une autre source d'azote à utiliser. Le diazote que l'on retrouve en grande quantité dans l'atmosphère peut être utilisé par la majorité des organismes, mais seulement lorsqu'il est fixé. La fixation de l'azote se définit par la transformation de l'azote atmosphérique (N_2) en ammoniac (NH_3). Il existe différents types de fixation. On retrouve la fixation non biologique qui se produit soit par l'intermédiaire de la combustion, par procédés industriels ou par les éclairs. Cependant, elle constitue un taux de fixation de 80 millions de tonnes par année ce qui est en fait, deux fois moins que le deuxième type de fixation appelée biologique. Cette dernière qui se fait par le biais de microorganismes présents dans le sol ou dans la mer est la plus importante avec 175 millions de tonnes de N_2 fixé par année.

La fixation biologique de l'azote peut être représentée par l'équation suivante, dans laquelle 2 moles d'ammoniac sont produites pour une mole de diazote avec l'aide de molécules d'ATP et d'une source de protons et d'électrons.



1.4.1 Nitrogénase

Le processus de fixation de l'azote est exclusif aux procaryotes et a lieu grâce à l'enzyme nitrogénase. La réaction catalysée par la nitrogénase est essentiellement un processus de réduction du N_2 en NH_3 . Pour que la réaction enzymatique ait lieu adéquatement, la nitrogénase a besoin d'une bonne source de MgATP (16 molécules pour la réduction d'une molécule de N_2) ainsi qu'un donneur d'électrons à bas potentiel redox (ferrédoxine ou flavodoxine réduite). Comme il existe divers types de microorganismes capables de fixer l'azote, on retrouve différentes sortes de nitrogénases : la nitrogénase à molybdène, à vanadium et alternative. Ces enzymes sont toutefois semblables, car ils sont élaborés à partir du même modèle.

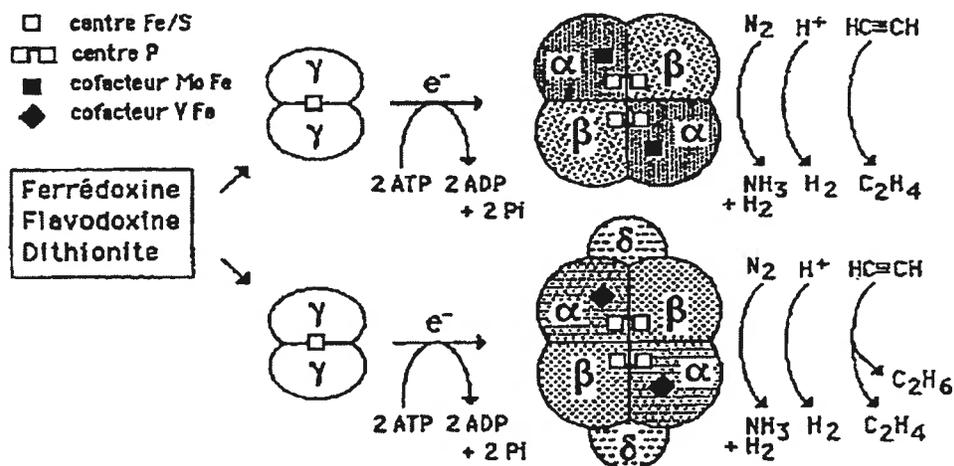


Figure 6. Composantes et réactions des deux nitrogénases : la nitrogénase à molybdène et la nitrogénase à vanadium. (Pelmont, 1993)

1.4.1.1 Nitrogénase à molybdène

La nitrogénase à molybdène est la forme la plus répandue. Cet enzyme consiste en un complexe de 2 protéines, une protéine dinitrogénase (MoFe) codée par les gènes *nifD* et *nifK* et une protéine dinitrogénase-réductase (Fe) produite par *nifH*. Comme on peut le voir à la figure 6, la protéine MoFe est un tétramère composé de deux sous-unités non-identiques $\alpha_2\beta_2$ où sont liés des cofacteurs Mo-Fe contenant du fer, du molybdène et du soufre (Shah et Brill, 1977) ainsi que des centres fer-soufre (Fe_8S_8) appelés centres P (Dean *et al.*, 1993). Le centre P est le lieu de stockage des électrons alors que les cofacteurs réduisent le substrat. La protéine Fe est un dimère de deux sous-unités identiques γ_2 qui contient un seul centre Fe_4S_4 . Ce centre P reçoit les électrons directement de la ferrédoxine ou de la flavodoxine. Pour que la réaction se produise, les deux composantes de la nitrogénase doivent s'associer et il doit y avoir hydrolyse de 2 MgATP pour chaque électron transféré. Chaque fois que la protéine MoFe reçoit un électron, le substrat attaché au complexe est réduit. Suite au transfert, il y a dissociation des deux protéines. Plusieurs cycles de transfert intermoléculaire d'électrons doivent être effectués avant que le substrat ne puisse être réduit complètement. Ainsi, N_2 devient $HN=NH$ ensuite H_2N-NH_2 et finalement

2NH_3 . La nitrogénase peut également réduire d'autres substrats qui contiennent des liens triples. Par exemple, elle peut réduire l'acétylène (C_2H_2) en éthylène (C_2H_4), produit que l'on peut détecter par chromatographie en phase gazeuse. Cette propriété est intéressante d'un point vu analytique car elle constitue un moyen efficace pour étudier l'activité de la nitrogénase.

Il est important de noter que l'énergie (ATP) nécessaire pour fixer l'azote atmosphérique peut être obtenue par fermentation, respiration ou photosynthèse, dépendamment du type de microorganisme. De plus, il faut savoir que la nitrogénase est sensible à l'oxygène donc que le processus nécessite un environnement anaérobie.

1.4.1.2 Nitrogénase à vanadium

Cette nitrogénase est synthétisée lorsqu'il y a carence de molybdène mais présence de vanadium. Elle est codée par les gènes *vnfHDK* et fonctionne de la même façon que celle à molybdène. Elle a été isolée chez des mutants *nifHDK* de *A.chroococcum* (Eady *et al.*, 1987) et de *A.vinelandii* (Hales *et al.*, 1986). Ces composantes sont représentées à la figure 6.

1.4.1.3 Nitrogénase alternative

Cet enzyme est le produit des gènes *anfHDK*. Elle est induite en absence de molybdène et vanadium et elle ne contient que du fer. Elle a été purifiée chez *A.vinelandii* pour la première fois (Chisnell *et al.*, 1988) et quelques années plus tard chez *R.capsulatus* (Schneider *et al.*, 1991). La nitrogénase alternative a la particularité de posséder une troisième chaîne appelée δ produite par le gène *anfG* (Schneider *et al.*, 1991).

1.4.2 Identification et organisation des gènes *nif*

La figure 7 montre la comparaison de l'organisation des gènes *nif* de la nitrogénase à molybdène entre trois organismes. Chez *K.pneumoniae*, ils se retrouvent au niveau d'un seul locus dans un fragment d'environ 23 Kb qui compte 7 opérons. Chez *A.vinelandii*, ils se composent de deux groupes de gènes sur des fragments d'ADN de 25 Kb et 7 Kb alors qu'ils se situent au niveau de trois régions chromosomiques chez *R.capsulatus*. Chez *K.pneumoniae*, les gènes *nifHDK* forment les composantes structurales de la nitrogénase, alors que les gènes *nifMUSNEBVWQ* codent pour des protéines responsables de la synthèse, la stabilisation ou l'insertion de centres métalliques au niveau des sous-unités MoFe et Fe. Un dernier groupe de gènes, *nifALFJ*, code pour les protéines de régulation de l'expression des gènes *nif* ou dans le transport d'électrons vers la nitrogénase. La description détaillée des produits des gènes *nif* est donnée au tableau I.

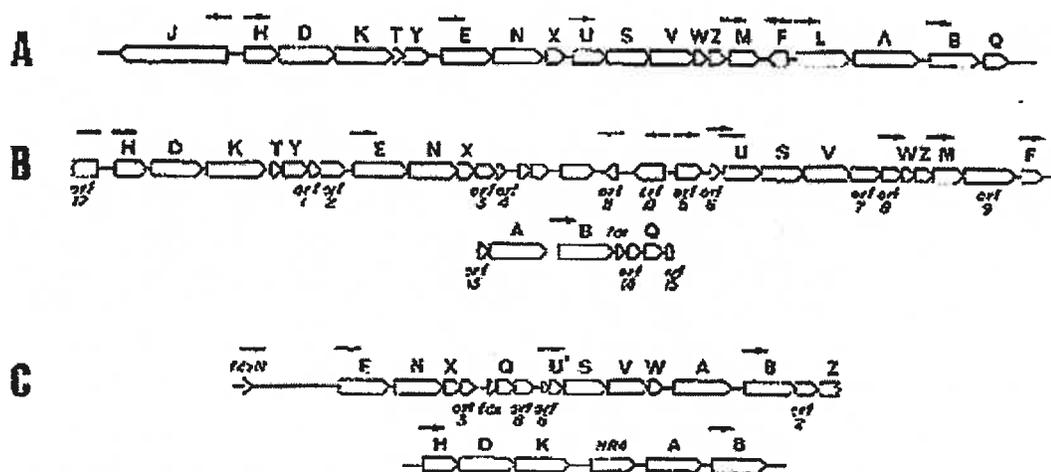


Figure 7. Comparaison de l'organisation des gènes *nif* de (A) *K.pneumoniae*, (B) *A.vinelandii* et (C) *R.capsulatus*. Les flèches indiquent la position et la direction des sites d'initiation de la transcription.

(Dean et Jacobson, 1992)

Tableau I. Gènes *nif* : produits et fonctions. (Dean et Jacobson, 1992)

Gènes	Produits et fonctions connues
<i>nifH</i>	NifH, dinitrogénase réductase (Fe), fixe deux molécules de MgATP et réduit la dinitrogénase (MoFe).
<i>nifD</i>	NifD, sous-unité α de la dinitrogénase à molybdène (MoFe)
<i>nifK</i>	NifK, sous-unité β de la dinitrogénase à molybdène (MoFe)
<i>nifF</i>	NifF, flavodoxine, réducteur de la dinitrogénase réductase
<i>nifJ</i>	NifJ, pyruvate-flavodoxine-oxidoréductase, couple l'oxydation du pyruvate à la réduction de la flavodoxine
<i>nifM</i>	NifM, permet l'activation de la dinitrogénase réductase
<i>nifU</i>	NifU, stabilisation de la dinitrogénase réductase
<i>nifS</i>	NifS, stabilisation de la dinitrogénase réductase
<i>nifV</i>	NifV, encode une homocitrate synthase (composé organique du cofacteur MoFe)
<i>nifE</i>	NifE, biosynthèse du cofacteur MoFe
<i>nifN</i>	NifN, biosynthèse du cofacteur MoFe
<i>nifB</i>	NifB, biosynthèse du cofacteur MoFe
<i>nifQ</i>	NifQ, transformation du molybdène
<i>nifW</i>	NifW, transformation de l'homocitrate
<i>nifZ</i>	NifZ, accumulation de la dinitrogénase active
<i>nifA</i>	NifA, régulateur positif
<i>nifL</i>	NifL, régulateur négatif
<i>nifX</i>	NifX, régulateur négatif
<i>nifT</i>	NifT, fonction inconnue
<i>nifY</i>	NifY, fonction inconnue

1.4.3 Les diazotrophes

Les diazotrophes sont des microorganismes capables de fixer l'azote atmosphérique. Ils peuvent se retrouver dans le sol libre ou en association, ainsi que dans la mer. Parmi ceux que l'on retrouve libre dans le sol, on compte des bactéries aérobies tels les *Azotobacter*, *Beijerinckia* et les cyanobactéries ainsi que les genres anaérobies facultatifs et anaérobies stricts comme *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, vertes sulfureuses et pourpres. Les microorganismes symbiotiques qui vivent en association avec des plantes ou des légumineuses font partie des espèces de *Rhizobium*, *Frankia*, *Anabaena* et *Azospirillum*. Tous ces diazotrophes ainsi que les autres qui figurent dans le tableau II jouent un rôle essentiel dans la biosphère en permettant d'avoir des sources d'azote physiologiquement utilisables et surtout disponibles en tout temps pour le maintien de la vie sur terre.

1.4.4 Adaptations physiologiques contre O₂

Le complexe enzymatique de la nitrogénase est fortement sensible à l'oxygène. Il est inactivé lorsque O₂ réagit avec les composés de Fer des sous-unités protéiques. Les diazotrophes ont développé certaines astuces pour contrecarrer les effets néfastes de l'O₂ sur la nitrogénase. La plupart possèdent généralement un mécanisme de contrôle de l'expression des gènes de la fixation de l'azote alors qu'une minorité réussit à obtenir un environnement anaérobie grâce à leur physiologie adaptée. En voici quelques exemples. Chez *Klebsiella pneumoniae* on retrouve une protéine NifL qui lie l'activateur de transcription des gènes *nif* (NifA) en présence d'O₂. Ceci empêche NifA de lier l'ADN et l'inhibition de la synthèse de la nitrogénase en résulte. Par contre, d'autres moyens ont été élaborés pour les espèces aérobies. Par exemple, les *Azotobacter* sont capables d'obtenir un environnement intracellulaire anaérobie grâce à des cytochromes oxydases très efficaces. Ils ont le taux de respiration métabolique le plus élevé du monde biologique, ce qui leur permet de maintenir un très bas niveau d'oxygène dans leurs cellules. De plus, cette espèce produit une très grande quantité de polysaccharides extracellulaires ce qui limite la

vitesse de diffusion de l'oxygène dans les cellules. On retrouve également des genres comme *Rhizobium* qui obtiennent un environnement adéquat en vivant dans des nodules de racines de certaines plantes. Effectivement, on retrouve à l'intérieur de ces nodules des pigments rouges appelés leghémoglobine qui lient l'oxygène permettant à la nitrogénase de travailler dans des conditions anaérobies. Chez les cyanobactéries, il existe des cellules spécialisées appelées hétérocystes dans lesquelles la fixation de l'azote a lieu. Ces cellules sont étanches à l'oxygène grâce à la barrière physique de l'enveloppe et une respiration accrue. Finalement, le dernier exemple se classe parmi les membres du groupe des bactéries pourpres non sulfureuses, *Rhodobacter capsulatus*. C'est une bactérie photosynthétique qui possède une versatilité métabolique remarquable. Elle est capable de s'adapter à n'importe quel type d'environnement. En absence d'oxygène et en présence de lumière, elle utilise un photosystème qui se situe dans la membrane plasmique interne. Celui-ci est muni de pigments antennaires qui en absorbant la lumière, génèrent de l'énergie sous forme d'ATP qui est ensuite utilisée pour fixer le carbone ou bien l'azote.

Tableau II. Microorganismes diazotrophes

Groupe Phylogénétique	Genre
<i>Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium, Chloroberpeton, Pelodictyoon, Prosthecochloris</i>
<i>Firmibacteriaceae</i>	<i>Bacillus, Clostridium, Desulfotomaculum</i>
<i>Thallobacteriaceae</i>	<i>Arthobacter, Frankia, Streptomyces, Propionibacterium</i>
<i>Heliobacteriaceae</i>	<i>Heliobacillus, Heliobaterium, Heliospirillum</i>
Cyanobactéries	<i>Anabaena, Synechococcus, Synechocystis, Xenococcus, Nostoc</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter</i>
α -Proteobacteria	<i>Acetobacter, Agrobacterium, Ancylobacter, Azorhizobium, Azospirillum, Beijerinckia, Bradyrhizobium, Methylocystis, Methylosinus, Mycoplana, Photorhizobium, Renobacter, Rhizobium, Rhodobacter, Rhodomicrobium, Rhodopila, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Xanthobacter</i>
β -Proteobacteria	<i>Alcaligenes, Azoarcus, Derrxia, Herbaspirillum, Lignobacter, Rhodocyclus, Thiobacillus</i>
γ -Proteobacteria	<i>Amoebobacter, Azomonas, Azotobacter, Beggiatoa, Chromatium, Citrobacter, Ectothiorhodospira, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Lamprobacter, Methylobacter, Methylococcus, Methylomonas, Pseudomonas, Thiocapsa, Thiocystis, Vibio</i>
δ -Proteobacteria	<i>Desulfobacter, Desulfovibrio</i>
Archaea	<i>Halobacterium, Methanobacterium, Methanococcus, Methanolobus, Methanoplanus, Methanosarcina, Methanothermus</i>

1.5 RÉGULATION DE LA FIXATION DE L'AZOTE PAR NH_3

Nous avons vu dans l'équation précédente que la conversion de N_2 en NH_3 est un processus qui demande plusieurs molécules d'ATP, donc hautement énergétique. Pour éviter la perte inutile d'énergie, par exemple en présence d'une source azotée dans le milieu, la fixation de l'azote doit être fortement régulée. Gest et ses collaborateurs (1950) ont démontré que la présence de NH_3 dans le milieu inhibait l'utilisation du N_2 chez les bactéries photosynthétiques. Au cours des années suivantes, une méthode de détection de l'activité de la nitrogénase a été mise au point par Scheider et ses collaborateurs ce qui a fait avancer rapidement les recherches sur la fixation de l'azote. Suite à cette découverte, des études sur divers microorganismes ont démontré qu'il existe plusieurs systèmes de régulation efficaces et complexes qui permettent un contrôle précis du processus de fixation de l'azote. À ce jour, nous savons que la concentration en azote intracellulaire contrôle la transcription de *nifA*, l'activité de NifA et l'activité de la nitrogénase. Les trois niveaux de régulation de la nitrogénase chez *R. capsulatus* sont schématisés à la figure 8.

1.5.1 Régulation de la transcription de *nifA* par NtrC

La protéine NifA est un activateur de transcription requis pour l'expression de tous les autres gènes *nif*. Cet activateur amorce la transcription avec l'aide du facteur σ -54 (RpoN) et de l'ATP. La protéine NifA se classe parmi les protéines de type NtrC. Elle possède une région centrale activatrice qui constitue le site de liaison de l'ATP et du facteur σ -54, un domaine C-terminal qui lie l'ADN ainsi qu'une partie régulatrice N-terminale. NifA n'a pas besoin d'être phosphorylée pour être active contrairement à NtrC. De plus, cette protéine est sensible à l'oxygène, donc inactive dans un environnement aérobie.

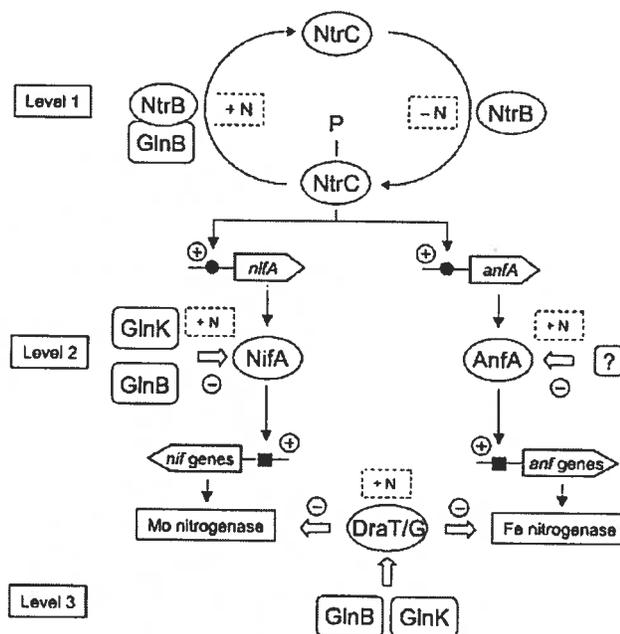


Figure 8. Trois niveaux de régulation de la fixation de l'azote chez *R. capsulatus*. (Drepper, 2003)

Contrairement aux autres diazotrophes, *R. capsulatus* possède deux copies fonctionnelles de *nifA* (Klipp *et al.*, 1988; Masepohl *et al.*, 1988). Les deux protéines NifA1 et NifA2 diffèrent seulement dans les premiers 19 acides aminés en N-terminal. Pour le reste, elles sont identiques et peuvent se substituer l'une et l'autre (Hübner *et al.*, 1993 ; Paschen *et al.*, 2001). Le contrôle de la transcription des gènes *nif* est possible en régulant l'expression ou l'activité de NifA en présence d'ammonium ou d'oxygène.

Chez *K. pneumoniae* et *R. capsulatus*, la transcription de *nifA* est médiée par NtrC selon la concentration en azote présent dans le milieu. Exceptionnellement, NtrC de *R. capsulatus* ne fonctionne pas avec l'aide de RpoN (Foster-Hartnett et Kranz, 1994) comme chez les autres diazotrophes mais plutôt avec sigma 70. Dans les deux cas, les protéines GlnB et GlnK semblent jouer un rôle important dans la transduction du signal. En carence d'azote, PII est uridylylée et ne peut lier NtrB qui conserve son activité kinase. NtrB transfère son phosphate à NtrC qui peut alors

activer la transcription du gène *nifA*. Une fois NifA exprimé, elle peut à son tour activer la transcription de tous les gènes *nif* de la nitrogénase nécessaires pour fixer l'azote atmosphérique. Par contre, il existe des microorganismes tels que *Rhodospirillum rubrum* et *Azospirillum brasilens* pour lesquelles la transcription de *nifA* n'est pas régulée. Leur protéine activatrice NifA est synthétisée dans des conditions favorables ou défavorables à la fixation de l'azote et elle est présente soit dans sa forme active ou inactive en réponse aux conditions environnementales (présence ou non de NH_4^+).

1.5.2 Régulation de l'activité de NifA

Chez la plupart des diazotrophes, l'activité de NifA est régulée de différentes manières par les protéines PII en réponse à l'ammonium. Tout d'abord, chez *A. brasilens* et *R. rubrum*, l'activation de NifA en condition de carence en azote est strictement sous le contrôle de GlnB-UMP (Arsène *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 2000). Le mécanisme de l'activation de NifA est cependant inconnu dans les deux cas. Inversement, pour *A. caulinodans* et *R. capsulatus*, les deux protéines GlnB et GlnK sont nécessaires pour inactiver NifA en présence d'ammonium, mais elles sont aucunement impliquées dans son activation (Drepper *et al.*, 2003 ; Masepohl *et al.* 2002 ; Michel-Reydellet et Kaminski, 1999). Finalement, chez certains organismes tels qu'*Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Azoarcus* sp. souche BH27 qui sont membres du groupe des γ -protéobactéries, l'activité de NifA est inhibée en présence de NH_3 et d'oxygène par une deuxième protéine de régulation, NifL. NifL est connue comme étant une flavoprotéine possédant une dinucléotide flavide adénine (FAD) comme cofacteur. Cette protéine lie directement le domaine catalytique central de NifA ce qui inhibe son activité. Chez *K. pneumoniae*, ce système implique également la protéine GlnK qui est la seule protéine sous le contrôle de NtrC qui empêche directement l'inhibition par NifL en absence d'azote (He *et al.*, 1998 ; Arcondéguy *et al.*, 1999). Étrangement, la modification de GlnK n'est pas requise ni pour l'inhibition ni pour la réactivation de NifL et ce, même dans les conditions où la protéine est habituellement uridyliée.

1.5.3 Régulation de l'activité de la nitrogénase par «switch off/switch on»

Plusieurs études ont démontré que l'ajout d'ammonium cause habituellement une inhibition complète de l'activité de la nitrogénase et que cette activité est rétablie après quelques minutes. On appelle ce type de régulation «switch off/switch on». Par définition, ce système consiste en une modulation réversible à court terme de l'activité *in vivo* de la nitrogénase en réponse à différents stimuli environnementaux.

1.5.3.1 «Switch off» par modification post-traductionnelle

L'activité de la nitrogénase peut être inhibée par modification post-traductionnelle. Le type de modification covalente le plus étudiée est l'ADP-ribosylation réversible de la dinitrogénase réductase qui a été observé dans un premier temps chez *R.rubrum*. Ce processus est possible grâce à la région génique *draTG*. L'ADP-ribosylation de l'enzyme est médiée par DraT, une dinitrogénase réductase ADP-ribosyltransférase (Lowery et Ludden, 1988). Suite à l'ajout de NH_3 ou la disparition de lumière, celle-ci retire l'ADP-ribose du NAD avec l'aide du MgADP et le lie de façon covalente à un résidu arginine (Arg-101) sur une sous-unité de la dinitrogénase réductase Fe. Ceci cause une inhibition de l'activité de la nitrogénase, car la présence de l'ADP sur Fe empêcherait la formation du complexe de la nitrogénase (Fe-MoFe). Comme cette modification est réversible, une protéine dinitrogénase réductase activant une glycohydrolase appelée DraG catalyse l'enlèvement du groupement ADP (Saari *et al.*, 1984). Cette réaction s'effectue grâce à l'ATP, le Mg^{2+} et Mn^{2+} dans des conditions où le signal est absent, c'est-à-dire lorsque le NH_3 est limitant ou que la lumière est présente. Ceci permet la réactivation ou le «switch on» de la nitrogénase. Le processus est illustré à la figure 9.

Ce type régulation covalente a été également démontré chez *Rhodobacter capsulatus* (Hallenbeck, 1992 ; Masepohl *et al.*, 1993 ; Pierrard *et al.*, 1993), chez des espèces *Azospirillum* (Fu *et al.*, 1989) et chez *Azotobacter chroococcum* (Ludden et Roberts, 1989). *Klebsiella pneumoniae* et *Rhodospirillum sphaeroides* ne posséderaient pas ce système puisque les gènes *draTG* semblent être absents. Par contre, Zhang et ses collaborateurs (2001) ont démontré que l'expression hétérologue

des protéines DraT/DraG de *R. rubrum* chez *K. pneumoniae* permettait la régulation de la nitrogénase par ADP-ribosylation. Quelques années plus tard, Yakunin et ses collaborateurs (2001) ont démontré le même type de régulation chez *R. sphaeroides* qui contenait les gènes *draTG* et *nifHDK* de *R. capsulatus*. Ainsi, *K. pneumoniae* et *R. sphaeroides* semblent posséder tous les composés métaboliques nécessaires au contrôle de l'activité de DraT et DraG en présence de NH_3 et de noirceur, et ce, même en absence des gènes *draT/G*.

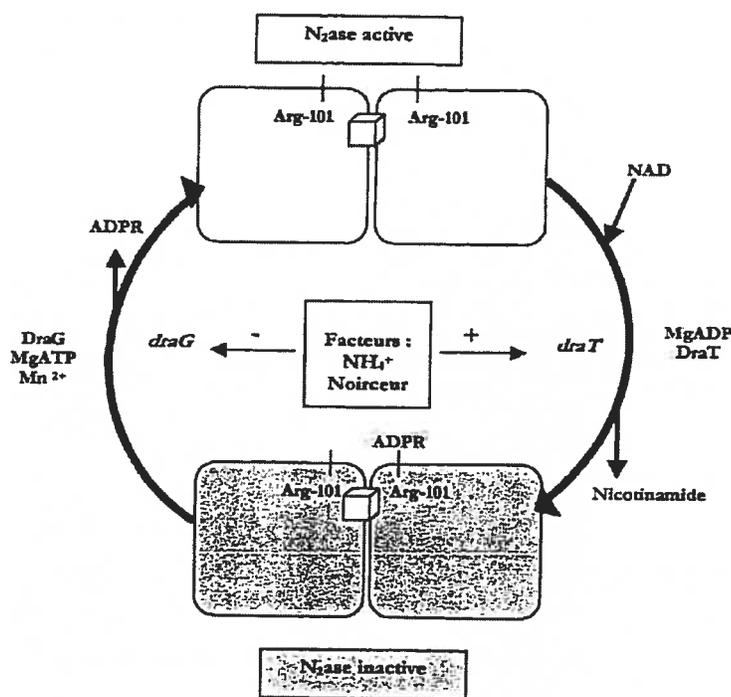


Figure 9. Modèle d'ADP-ribosylation réversible chez *R. rubrum* (Ludden et Roberts, 1995)

La figure 10 montre les résultats obtenus par Yakunin et Hallenbeck (1998) à propos des effets de l'ammonium sur l'activité et la modification de la nitrogénase pour des cultures de *R. capsulatus* hautement limitées en azote. On remarque que la quantité de protéines Fe modifiée par ADP-ribosylation est directement proportionnelle à la concentration en NH_4^+ présent dans le milieu (Yakunin *et al.*, 1998, 1999). Au début lorsque la source d'azote se situe entre faible et modérée, aucune protéine n'est ADP-ribosylée. L'ajout de NH_4^+ provoque une inhibition rapide et réversible de l'activité de la nitrogénase dans les 2 à 3 minutes qui suivent. On remarque alors la présence de protéines ADP-ribosylées et l'état modifié diminue après environ 40 minutes. La vitesse de la réapparition complète de l'activité de l'enzyme est observée dans une période relativement courte et dépendante de la quantité d'ammonium ajoutée (Yakunin *et al.*, 1998).

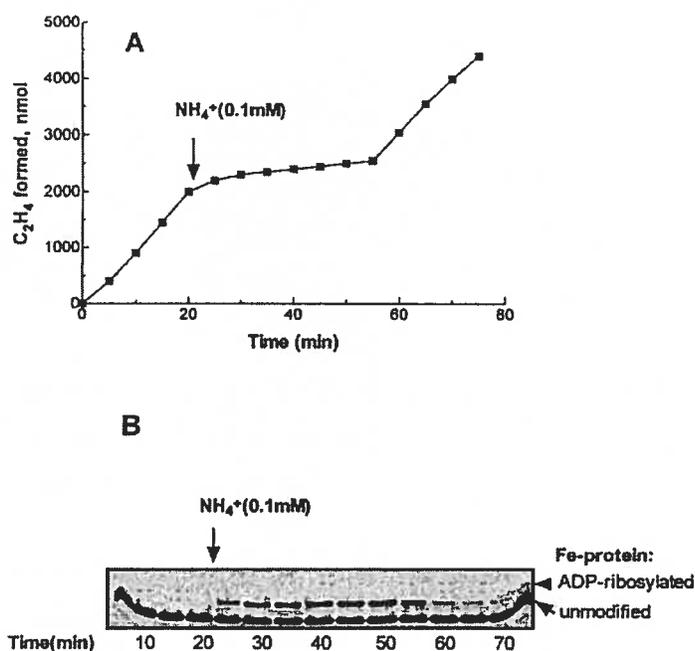


Figure 10. Effets de l'ammonium sur A) l'activité de la nitrogénase in vivo et B) l'ADP-ribosylation de la nitrogénase pour des cultures de *R. capsulatus* hautement limitée en azote. (Réponse «switch off») (Yakunin et Hallenbeck, 1998)

1.5.3.2 Réponse de magnitude chez *R. capsulatus*

Il a été observé par Yakunin et ses partenaires (1998) que dépendamment de la sévérité de la limitation en azote dans le milieu initial, *R. capsulatus* démontre des réponses différentes suite à l'ajout d'ammonium. Comme mentionné, dans des conditions où l'azote est limitant, on observe un effet «switch off» au niveau de l'activité de la nitrogénase. Cependant, lorsque les cultures ont une source azotée initiale modérée à forte, quelques protéines sont sous la forme ADP-ribosylée. On peut voir à la figure 11 que l'effet «switch off» est alors complètement perdu. On observe à la place une «réponse de magnitude» qui est en fait une inhibition partielle de l'activité de la nitrogénase qui apparaît à long terme (Yakunin *et al.*, 1998). Le degré d'inhibition (magnitude) dépend de la concentration en ammonium ajoutée et il n'y a pas de réactivation à court terme de l'enzyme. Ceci représente une nouvelle réponse de la nitrogénase qui n'a pas été observé chez d'autres organismes.

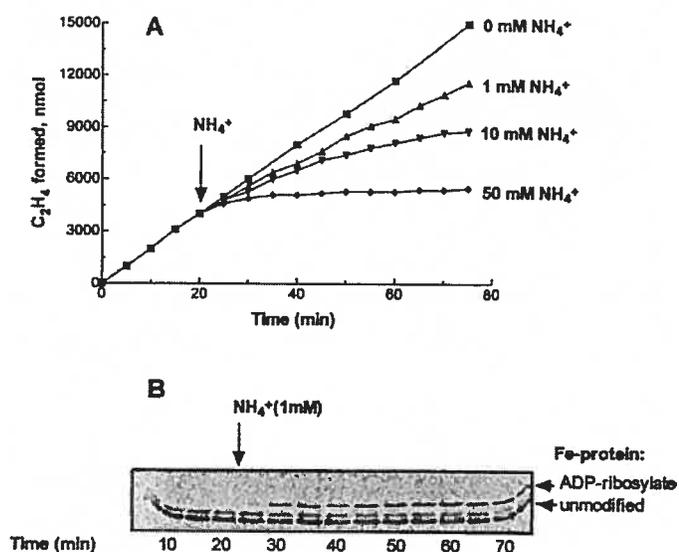


Figure 11. Effets de l'ammonium sur A) l'activité de la nitrogénase in vivo et B) l'ADP-ribosylation de la nitrogénase pour des cultures de *R. capsulatus* modérément limitée en azote. (Réponse de magnitude) (Yakunin et Hallenbeck, 1998)

1.5.3.3 «Switch off» indépendant de l'ADP-ribosylation

Dans l'intention de démontrer l'implication réelle de l'ADP-ribosylation dans le phénomène de «switch off/switch on», Pierrard et ses collaborateurs (1993) ont étudié chez *R. capsulatus* l'effet d'une dinitrogénase réductase mutante incapable d'ADP-ribosylation. Pour ce faire, le résidu arginine, site de la modification covalente, a été changé pour une tyrosine ou une phénylalanine. Ils ont alors remarqué que les souches de *R. capsulatus* contenant ces protéines mutantes montraient encore une réponse de type «switch off» en présence de NH_4^+ ou de noirceur. En 1998-1999, Yakunin, Förster et leurs équipes ont également démontré que des souches mutantes pour les protéines DraT et DraG étaient capables de répondre aux stimuli par l'inactivation rapide de l'activité de la nitrogénase. De plus, cette inhibition était réversible puisque l'apparition de la lumière réactivait très rapidement la nitrogénase (Förster et al., 1999). Ensemble, ces résultats démontrent la présence d'un deuxième mécanisme indépendant de l'ADP-ribosylation qui serait aussi responsable du «switch off» de la nitrogénase chez *R. capsulatus*. Celui-ci est à ce jour encore inconnu. Il a été suggéré par plusieurs équipes de recherche qu'en présence de NH_3 , l'activité de la nitrogénase pourrait être diminuée par une baisse du flux d'électron vers l'enzyme (moins de réductants) et/ou la faible source en ATP causée par l'assimilation non contrôlée subséquente de l'ammonium. Ces hypothèses restent cependant obscures.

1.5.4 Implication des protéines PII et AmtB dans le système «switch off»

Les protéines PII et AmtB semblent impliquées dans la régulation de l'activité de DraT et DraG. Chez *R. capsulatus*, un double mutant *glnBglnK* et un mutant *amtB* inhibe l'ADP-ribosylation en présence de NH_3 dans le milieu (Klipp *et al.*, 2000 ; Drepper *et al.*, 2003 ; Yakunin et Hallenbeck, 2002). Inversement, la modification post-traductionnelle en réponse à la noirceur n'est pas affectée chez ces mutants. Ceci indique que les PII et AmtB jouent des rôles essentiels dans le premier système de signalisation (présence de NH_3) mais pas dans le deuxième (noirceur). D'autres études effectuées sur les protéines PII de *R. rubrum* et de la souche *Azoarcus* sp.

BH72 ont démontré des résultats similaires quant à l'implication de PII au niveau de la régulation de l'activité de la nitrogénase par ADP-ribosylation (Martin *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2001). De plus, elles seraient également impliquées dans l'inhibition de l'activité de la nitrogénase indépendamment de la modification post-traductionnelle chez *R. capsulatus* (Drepper *et al.*, 2003).

Des recherches plus poussées sur l'interaction GlnK-AmtB ont été réalisées récemment chez *E.coli* et *Azotobacter vinelandii*. Coutts et ses partenaires (2003) ont prouvé que l'ajout d'ammonium dans le milieu inhibe l'activité de transport d'AmtB. Ceci serait causé par la formation d'un complexe avec GlnK au niveau de la membrane. La liaison de GlnK avec AmtB serait grandement favorisée lorsque GlnK est non uridylée et aurait lieu lors d'une augmentation extracellulaire de la concentration en azote de l'ordre du micromolaire. Cette régulation serait contrôlée par le niveau d'uridylation/déuridylation de PII en réponse à un changement dans le pool intracellulaire de glutamine. De plus, dans des conditions physiologiques, l'activité de AmtB est requise pour déuridylyler GlnK (Javelle *et al.*, 2004). Le modèle qu'il propose est illustré à la figure 12 et il permet d'affirmer que le transporteur d'ammonium AmtB joue un rôle de senseur d'ammonium et qu'il est impliqué dans la cascade de régulation du métabolisme de l'azote.

Il a été suggéré que le transporteur d'ammonium pourrait servir de senseur dans la détection des changements de la concentration extracellulaire de NH_4^+ et transmettrait le signal à GlnK via son interaction à la membrane. Cette dernière modulerait le métabolisme de l'azote par ses propriétés de transducteur de signal. De plus, GlnK pourrait réguler l'activité de transport d'AmtB en réponse aux besoins en ammonium de la cellule. Finalement, il est aussi possible qu'AmtB régule le niveau de GlnK dans le cytoplasme en le séquestrant à la membrane. Toutes ces hypothèses restent à être vérifiées.

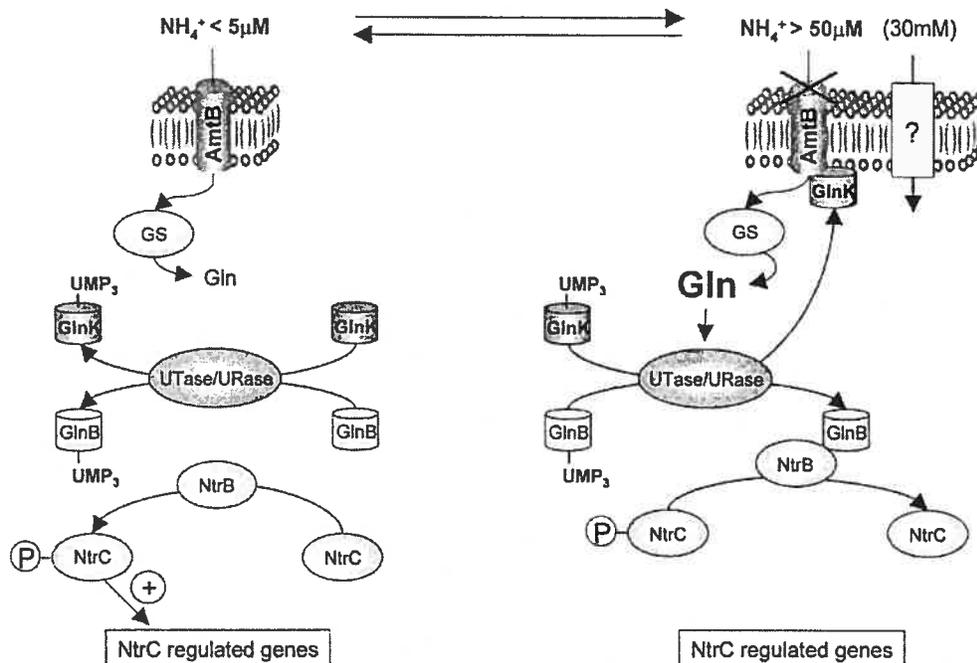


Figure 12. Modèle proposé pour la fonction d'AmtB et GlnK dans le transport d'ammonium et leur intégration dans le système ntr de *E.coli*. (Javelle *et al.*, 2004)

1.6 PROJET DE RECHERCHE

Le travail consistait à étudier les rôles de GlnK et GlnB dans la régulation de l'activité et de l'état de modification de la nitrogénase chez *Rhodobacter capsulatus*. Premièrement, dans le but de vérifier l'effet de l'uridylation des protéines PII sur la régulation de la nitrogénase, des mutants Y51F ont été créés par mutagenèse dirigée par PCR et l'activité de la nitrogénase a été détectée par chromatographie en phase gazeuse. De plus, le niveau d'ADP-ribosylation de la nitrogénase a été analysé par immunobuvardage. Dans une deuxième étape, nous avons tenté de démontrer la séquestration de GlnK via AmtB à la membrane en effectuant une séparation des compartiments cellulaires et une détection après immunobuvardage avec des anticorps que nous avons produits spécialement pour ce projet.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES UTILISÉS

Les tableaux III et IV représentent la liste et la description des souches bactériennes et des plasmides qui ont été utilisés et construits dans cette étude.

Tableau III. Caractéristiques et provenances des souches bactériennes utilisées.

Souches	Caractéristiques	Références
<i>E.coli</i>		
DH5 α	ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) <i>recA endA hsdR supE</i>	GIBCO-BRL
S17.1	rp4-2 (Tc ^r :: Mu) (Km ^r :: Tn7) intégré dans le chromosome	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) gal(DE3)	Stratagene
<i>R.capsulatus</i>		
SB1003	Rif ^r ; souche sauvage	Yen et Marrs, 1976
PHU332	<i>glnB</i> :: Km ^r	P. Hübner, Basel
SG21	<i>glnK</i> :: Gm ^r	Drepper <i>et al.</i> , 2003
TD166	<i>glnB</i> :: Km ^r , <i>glnK</i> : pSG2.1	Drepper <i>et al.</i> , 2003
RCAY63	<i>amtB</i> :: Km ^r	Yakunin A., 2002
RCAP7	PHU332 portant pAP7	Cette étude
RCAP8	SG21 portant pAP8	Cette étude
RCKGM	SB1003 Δ <i>glnK</i> :: Gm ^r	Cette étude
ECAP6	BL21 portant pAP6	Cette étude

Tableau IV. Caractéristiques et provenances des plasmides utilisés.

Plasmides	Caractéristiques	Références
pMECA	Ap ^r , SCM dans <i>lacZ</i> , (2860 pb)	Thomson J.M., 1998
pBluescript IKS-	Ap ^r ; <i>lacPOZ</i> , SCM, (2960 pb)	Stratagene
pJB3Tc20	Ap ^r , Tc ^r , vecteur conjugaison, (7069 pb)	Blatny J., 1997
pUC18	Ap ^r , SCM dans <i>lacZ</i> , (2960 pb)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUCGm	Gm ^r , cassette Gm ^r dans pUC1918, (3500 pb)	Schweizer H.P., 1993
pSUP202	Ap ^r , Tc ^r , Cm ^r ; <i>mob</i> , vecteur suicide, (8 kb)	Simon <i>et al.</i> , 1983
pGEX4-T1	Ap ^r , vecteur expression/purification, (4969 pb)	Smith D.E., 1988
pAY98	Ap ^r , Rc <i>glnKamtB</i> (2,4 kb), dans pMECA aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Yakunin A., 2000
pAY132	Ap ^r , Rc <i>glnB</i> (1,1 kb), dans pBS aux sites <i>BamHI/PstI</i>	Yakunin A., 2000
pAP1	Ap ^r , Rc <i>glnKY51F</i> (700 pb) dans pMECA aux sites <i>PstI/BamHI</i>	Cette étude
pAP2	Ap ^r , Tc ^r , Rc <i>glnKY51F</i> (700 pb) dans pJB3Tc20 aux sites <i>PstI/BamHI</i>	Cette étude
pAP3	Ap ^r , Rc <i>glnKamtB</i> (2,4 kb) dans pBSIIKS- aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Cette étude
pAP5	Ap ^r , <i>glnBY51F</i> (1,1 kb) dans pMECA aux sites <i>XbaI/KpnI</i>	Cette étude
pAP6	Ap ^r , <i>glnK</i> (400 pb) dans pGEX4-T1 aux sites <i>EcoRI/NotI</i>	Cette étude

pAP7	Ap ^r , Tc ^r , <i>glnBY51F</i> (1,1 kb) dans pJB3Tc20 aux sites <i>XbaI/KpnI</i>	Cette étude
pAP8	Ap ^r , Tc ^r , <i>amtB</i> (1,4 kb) dans pAP2 aux sites <i>BamHI/KpnI</i>	Cette étude
pAP9	Ap ^r , Tc ^r , <i>glnK</i> (700 pb) dans pJB3Tc20 aux sites <i>PstI/BamHI</i>	Cette étude
PBSKABGM	Ap ^r , Gm ^r , Δ <i>glnK::Gm^r</i> (2,9 kb) dans pBSIIKS- aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Cette étude
pAP11	Tc ^r , Gm ^r , Δ <i>glnK::Gm^r</i> (2,9 kb) dans pSUP202 aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Cette étude

2.2 CONDITIONS DE CULTURE

Les souches de *Rhodobacter capsulatus* ont été cultivées dans des tubes de 17 ml remplis de YPS (yeast extract, peptone, sels), en conditions anaérobies sans agitation à 30°C et en présence de lumière toute la nuit. Un incubateur Biotronette mark III environmental chamber (Labline instruments) muni de trois ampoules incandescentes de 150 W a permis d'obtenir ces conditions. Le milieu de culture YPS

Pour les études sur la régulation de la nitrogénase, les cultures en YPS dont la croissance était optimale ont été transférées dans 17 ml de RCV (Na-lactate, sels, tampon K-phosphate), milieu minimal ne contenant pas de source d'azote. Pour obtenir un milieu avec une concentration faible en azote, on a ajouté du (NH₄)₂SO₄ pour une concentration finale de 4 mM (RCV NH₄⁺ 4mM) et pour un milieu riche en azote, on a besoin de 30 mM de (NH₄)₂SO₄ (RCV NH₄⁺ 30 mM).

Dans les cultures de *R.capsulatus*, nous avons utilisé des concentrations d'antibiotiques de l'ordre de 1,5 µg/ml pour la tétracycline, 5 µg/ml pour la gentamycine et 25 µg/ml pour la kanamycine.

2.3 MANIPULATION DE L'ADN

2.3.1 Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique appelée mini-préparation permet d'isoler un plasmide à partir d'une culture de bactéries. La transformation, le clonage ainsi que l'analyse de clone nécessite cette technique de purification. La méthode a consisté en premier lieu à centrifuger à 10000 rpm une culture de nuit de 5 ml pendant 15 minutes. Une fois le surnageant enlevé, nous avons resuspendu le culot dans 100 μ l de solution Tris-EDTA-Glucose et l'avons incubé sur glace pendant 5 minutes. Ensuite, 200 μ l d'une solution de NaOH 0.2M-SDS 1%, a été ajouté et mélangé doucement par inversion. Une incubation de 5 minutes sur glace a précédé l'addition de 150 μ l d'acétate d'ammonium 3M pH 4.5. Le tout a été mélangé et déposé sur glace pendant 5 minutes. Nous avons ensuite transféré le contenu de ce tube dans un eppendorf de 1,5 ml que nous avons centrifugé 10 minutes. Le surnageant a été transféré dans un nouvel eppendorf et de l'éthanol 100 % froid a été ajouté et vortexé. Une autre centrifugation de 15 minutes a suivi puis le culot a été lavé avec de l'éthanol 70 %. Celui-ci a été séché à l'air ambiant puis resuspendu dans 40 μ l d'eau distillée stérile contenant de la RNase A(40 μ g/ml).

2.3.2 Amplification d'ADN par PCR

Le PCR pour «polymerase chain reaction» permet l'amplification de fragments d'ADN in vitro. L'appareil GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) a été utilisé avec l'enzyme de polymérisation Pfu produite dans le laboratoire du Dr. Patrick Hallenbeck. Plusieurs réactions de PCR ont été effectuées afin d'obtenir des souches mutantes par mutagenèse dirigée ou par délétion ainsi que pour amplifier des gènes intacts destinés à être cloné. Pour ce faire, différentes amorces ont été utilisées à une concentration finale de 1 μ M selon la nature du fragment à amplifier. La liste et la description de celles-ci figurent au tableau V. Nous avons également eu besoin de dNTP à 0.2 mM, une solution tampon avec MgSO₄ 1X, de l'eau stérile et d'ADN.

Tableau V. Amorces utilisées lors de différentes réactions de PCR

Pr	Code	Nom	Po	Séquence 5'-3'
A	U	plAMTBPstI	5'	CGCCTGCAGTGATGCGTAGC
	R	APGlnKBamHI	3'	CCCTGGATCCCCTGTGGTTCTT
	1	APGlnKA1	3'	ATCACCGCGAATTCGGCGCC
	2	APGlnKB2	5'	CGCGGCGCCGAATTCGCGG
B	U	APAmtBBamHI	5'	GAACCACAGGGATCCAGGG
	R	APAmtB2KpnI	3'	GGGCCTTTCGATCTTGGGTACC
C	U	glnB-upBamHI	5'	AAGCGGATCCACGACCAGATCGG
	R	glnB-downPstI	3'	ACGTGCTGCAGCTTGCCACGCGG
	1	APglnBA1	3'	CGACGACGAATTCGGCC
	2	APglnBB1	5'	CGGGGCCGAATTCGTCTG
D	U	APGlnK5'EcoRI2	5'	GGAATTCATGATGGTGACG
	R	PLAmtBEcoRI	3'	CCGAATTCGAGTGGTAGGCG
E	U	plAMTBPstI	5'	CGCCTGCAGTGATGCGTAGC
	R	plAMTBEcoRIB	3'	GGCGAATTCTGGGCGGTGGT
	1	glnKBamHI2	3'	GGATCCCGGTCAGCGCCTCGCGGA
	2	glnKBamHI3	5'	GGATCCAAGCGCTGTAAGAACC

Légende : Pr : produit, Po : position, A : *glnKY51F*, B : *amtB*, C : *glnBY51F*, D : *glnKamtB*, E : *glnK* délété, U : amorce universelle, R : amorce inverse, 1 : première amorce mutagène, 2 : deuxième amorce mutagène

Les nucléotides soulignés sur les séquences représentent les sites de restriction introduits dans l'ADN. Les amorces ont été fabriquées par la compagnie alpha DNA.

2.3.3 Mutagenèse dirigée par PCR

Cette méthode permet de faire des mutations ponctuelles en utilisant 4 amorces au total : les amorces U (universelle) et R (inverse) qui se fixent aux extrémités du gène à amplifier ainsi que 2 amorces (1 et 2) qui serviront à faire la mutagenèse (voir Annexe I). Cette procédure implique 3 rondes de PCR. La première réaction d'amplification utilise les amorces U et 1 pendant 25 cycles et la deuxième utilise les amorces R et 2 pendant 25 cycles. Les produits des 2 réactions sont mis sur gel d'agarose à faible point de fusion, découpés du gel et chauffés à 55 °C. Les 2 fragments d'ADN serviront de matrice à la troisième ronde de PCR. Encore fondus, ils sont mélangés dans le même tube avec les amorces U et R. Lors du premier cycle, les molécules se renaturent dans la partie centrale et il y a une synthèse d'ADN dans le sens 5'-3'. À ce moment, une molécule complète est formée. Les autres réactions de synthèse sont initiées dans les cycles suivants à partir des deux amorces qui se lient à la molécule complète. Le produit final est un fragment d'ADN qui possède la mutation ponctuelle voulue. Comme toutes les amorces utilisées ont introduit des sites de restriction, le fragment est digéré avec les enzymes appropriés et ligué dans un vecteur coupé avec les mêmes enzymes. Cette technique a été utilisée pour construire les souches mutantes *R.capsulatus* RCAP8 (*glnKY51F*) et RCAP7 (*glnBY51F*) dans lesquelles la tyrosine (Y) en position 51 a été remplacée par une phénylalanine (F) au niveau des gènes *glnK* et *glnB*. La séquence des amorces figure au tableau V (produits A et C) alors que plus de détails seront donnés aux sections 2.4.1 et 2.4.2 sur la construction de ces mutants.

2.3.4 Digestion par des enzymes de restriction

Toutes les digestions enzymatiques ont été faites à 37 °C pendant 1 heure en utilisant différents enzymes de restriction et tampons provenant de la compagnie Invitrogen.

2.3.5 Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose

Pour purifier des molécules d'ADN à partir d'un gel d'agarose, la bande voulue a été découpée du gel et mise dans un tube eppendorf. Pour procéder à l'extraction, le QuiaexII Gel Extraction Kit (Quiagen) dont la méthode consiste à faire l'élution avec de la poudre de verre a été utilisé selon le protocole du manufacturier. Souvent, cette technique est utilisée pour purifier un insert et un vecteur en vue d'un clonage.

2.3.6 Méthode de ligation

Pour liquer un fragment d'ADN dans un vecteur, on doit préalablement les digérer avec des enzymes de restriction compatibles. Pour qu'une ligation soit efficace, un ratio de 4 : 1 (insert : vecteur) est requis. Lors de nos recherches, les réactions de ligation ont été faites avec l'aide de la T4 ADN ligase provenant d'Invitrogen pendant minimum 1 heure à la température ambiante.

2.4 STRATÉGIES DE CLONAGE

2.4.1 Clonage de *glnKY51F* et *amtB* dans pJB3Tc20

Le fragment d'ADN *glnKY51F* a été obtenu par mutagenèse dirigée par PCR à partir de pAY98 selon la méthode décrite à la section 2.3.3. Il a été cloné en premier lieu dans le vecteur pMECA aux sites *PstI/BamHI* (pAP1) pour des fins de séquençage. Son introduction subséquente aux sites *PstI/BamHI* dans le vecteur de conjugaison pJB3Tc20 a produit le plasmide pAP2. Dans un deuxième temps, nous avons introduit le gène *amtB* amplifié par PCR dans le plasmide pAP2 aux sites *BamHI/KpnI* en aval de *glnKY51F*. Le plasmide pAP8 résultant contenant alors les gènes *glnKY51F* et *amtB* a été transformé dans des cellules de conjugaison S17.1 et conjugué dans *R.capsulatus* SG21.

2.4.2 Clonage de *glnBY51F* dans pJB3Tc20

Le fragment d'ADN *glnBY51F* a été obtenu par PCR selon la même technique que *glnKY51F* mais en utilisant pAY132 comme matrice d'ADN. Ce gène muté a été sous-cloné dans le vecteur pBSIIKS- aux sites *BamHI/PstI* dans une orientation inversée ce qui a donné pAP3. Ensuite, il a été cloné à partir de ce plasmide dans pMECA avec l'aide des enzymes *XbaI* et *KpnI* pour former le plasmide pAP5. Cette stratégie a permis de remettre l'insert dans la bonne orientation et de permettre le séquençage à partir de pAP5. Finalement, le plasmide pAP7 a été obtenu en digérant pAP5 avec *XbaI* et *KpnI* et en introduisant le fragment *glnBY51F* dans pJB3Tc20 coupé avec les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide pAP7 a finalement été transformé dans S17.1 et conjugué dans *R.capsulatus* PHU332.

2.4.3 Création d'une protéine de fusion GlnK-GST

Pour purifier la protéine GlnK, le protocole de Smith et Johnson (1988) a été suivi. Le système est basé sur l'expression inductible du gène *glnK* fusionné avec une glutathione S-transférase (GST). Le vecteur d'expression et de purification pGEX4-T1 a été utilisé pour la création de la protéine recombinante. L'opéron *glnKamtB* a d'abord été amplifié par PCR à partir de pAY98 avec l'aide des amorces D-U et D-R (voir tableau V). Le fragment obtenu par PCR contenait seulement la séquence codante et non la séquence promotrice de l'opéron. Il a été digéré avec les enzymes *EcoRI* et *NotI* pour permettre la séparation des deux gènes *glnK* et *amtB*. Les sites *EcoRI* avaient été introduits par les amorces de part et d'autre de l'opéron alors que le site *NotI* se trouvait déjà sur la séquence initiale à quelques paires de bases en aval du codon stop de *glnK*. Deux fragments correspondant à *glnK* et *amtB* ont été obtenus. Le gène *glnK* a pu être isolé et inséré aux sites *EcoRI/NotI* dans le vecteur pGEX4-T1 en amont de la séquence codant pour la protéine GST. La région codant pour la protéine de fusion GlnK-GST se trouvait alors sous le contrôle d'un promoteur *tac* inductible par IPTG. La construction a été nommée pAP6 et a été transformée dans BL21(DE3) pour l'expression de la protéine de fusion.

2.4.4 Création d'une souche de *R.capsulatus* $\Delta glnK :: Gm^r$

Un PCR a d'abord été effectué sur pAY98 avec les amorces E-U et E-1 (tableau V) pour amplifier la partie en 5' de l'opéron *glnKamtB* (région promotrice). Un second PCR a été fait aussi sur pAY98 avec les amorces E-2 et E-R (tableau V) pour amplifier la partie en aval de l'opéron à partir du codon stop de *glnK* en 5'. Par la suite, le 1^e et 2^e fragments ont été souscloné dans pUC18 aux sites *PstI/BamHI* et *BamHI/EcoRI* respectivement, produisant un gène *glnK* délété au niveau de 264 pb. Cette délétion qui ne change pas le cadre de lecture commence à partir de la 60e pb en aval de son codon de départ jusqu'à une dizaine de pb en amont de son codon stop. La molécule obtenue contient alors la séquence promotrice de l'opéron, quelques nucléotides en 5' et 3' du gène *glnK* ainsi que le gène *amtB* en entier. Cette molécule d'ADN a été clonée (*PstI/EcoRI*) dans pBSIIKS- pour procéder à l'insertion d'une cassette de résistance à la gentamicine. Celle-ci a été enlevée de pUCGM avec *SmaI* et a été insérée en amont de la séquence promotrice de *glnK* au site *AsuII*. Pour permettre ce clonage, les extrémités de l'insert et du vecteur ont été rendues franches à l'aide de la Klenow. Le plasmide contenant $\Delta glnK :: Gm^r$ a été nommé pBSKABGM. Pour cloner ce fragment dans le vecteur suicide pSUP202, celui-ci a dû être amplifié par PCR avec les amorces E-U et E-R. De cette façon, il a pu être cloné aux sites *PstI/EcoRI* dans pSUP202 et le plasmide pAP11 obtenu a été mobilisé à partir des cellules *E.coli* S17.1 dans la souche sauvage SB1003. Le repiquage des transconjugants sur pétris YPS+Gm et YPS+Tc a permis de trouver un double recombinant possédant le phénotype Gm^r et Tc^s . Cette souche dans laquelle le gène *glnK* sauvage a été remplacé par *glnK* délété et la cassette Gm^r possède un gène chromosomique *amtB* intact.

2.5 SÉQUENÇAGE

Le séquençage des plasmides pAP1 et pAP5 a été effectué par le service de séquençage du centre de recherche CHUM.

2.6 TRANSFORMATION D'*ESCHERICHIA COLI*

2.6.1 Préparation de cellules thermocompétentes congelées

Afin de rendre les cellules DH5 α d'*E.coli* compétentes, le traitement au chlorure de calcium avec un choc au froid est la technique la plus couramment utilisée. Le protocole développé par Mandel et Higa (1970) a été suivi. La première étape a consisté à incuber une culture de 25 ml de cellules DH5 α d'*E.coli* dans du LB, une nuit à 37 °C. Le lendemain, nous avons dilué 1/50 la culture de nuit dans 1 L de LB et l'avons incubée à 37 °C. Lorsque la DO₆₀₀ a atteint 1.0, la culture a été mise dans la glace. Cette étape est très importante. À partir de ce point, toutes les étapes ont été effectuées à 4 °C, sinon, l'efficacité de la transformation aurait diminué. Après 15 minutes de centrifugation à 5000 rpm, les cellules ont été resuspendues dans une solution froide de CaCl₂ 0,1 M et conservées dans la glace 10 minutes. Une seconde centrifugation a suivi et les cellules ont été resuspendues dans 1/5^e du volume original avec la solution de CaCl₂. Finalement, nous avons aliquoté les cellules à raison de 200 μ l de suspension par tube et les avons conservées à -80 °C.

2.6.2 Préparation de cellules thermocompétentes fraîches

Des cellules compétentes fraîches S17.1 ont également été produites grâce à un protocole fourni par les étudiants du Dr. Marc Drolet. Pour ce faire, une culture de *E.coli* S17.1 a été incubée à 37 °C pendant la nuit. Le lendemain, les cellules ont été diluées 1/50 dans 5 ml de LB et incubées 2h à 37 °C. On les a ensuite gardées sur glace 15 minutes et centrifugées à 2500 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant obtenu a été enlevé et le culot de cellules a été resuspendu dans 1 ml de CaCl₂ froid. Celui-ci a été transféré dans un eppendorf froid et centrifugé une dernière fois à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C. Le surnageant a été enlevé à nouveau et les cellules resuspendues dans 200 μ l de CaCl₂ 0,1 M froid. Celles-ci ont finalement été conservées sur glace pendant 30 minutes avant d'être transformées.

2.6.3 Transformation chimique

La transformation est une méthode qui consiste à introduire de l'ADN plasmidique dans des cellules compétentes en les mettant en contact. La transformation des plasmides a été faite dans *E.coli* DH5 α (clonage), S17.1 (conjugaison) ou BL21 (expression) selon un protocole modifié du Current Protocols in Molecular Biology. Tout d'abord, 10 μ l d'ADN (après ligation) ou 1 μ l d'ADN (plasmide) ont été ajoutés à 100 μ l de cellules compétentes. Le mélange a été incubé pour un minimum de 15 minutes sur glace. Ensuite, un choc thermique de 2 minutes à 42 °C a été donné, suivi d'une incubation sur glace de 2 minutes. À ce moment, nous avons ajouté 500 μ l de LB avant de mettre le tube sous agitation à 37 °C pendant 1 heure. Pour terminer, nous avons étalé les cellules transformées sur un pétri LB contenant les antibiotiques appropriés et l'avons incubé une nuit à 37 °C. Les transformants ont été récupérés ou analysés en inoculant une ou plusieurs colonies dans un tube de LB que nous avons ensuite incubé à 37 °C toute une nuit. Le lendemain, les cultures ont pu être congelées dans du glycérol pour conservation ou les plasmides extraits pour analyse des clones.

2.6.4 Électroporation

L'électroporation consiste en une transformation sauf qu'elle est provoquée par un courant électrique. L'avantage de cette méthode sur la transformation induite par les produits chimiques est essentiellement l'efficacité de transformation de l'ordre de 10^{10} transformants par μ g d'ADN bactérien. Dans ces conditions, environ 1 cellule sur 100 est transformée. Nous avons donc utilisé cette méthode lorsque l'obtention d'un bon rendement était nécessaire. Techniquement, des cellules électrocompétentes décongelées (gracieuseté de A. Yakunin) et l'ADN ont été déposés dans une cuvette ayant des électrodes. Avec l'aide d'un électroporateur Micropulser (Biorad), nous les avons soumises à un choc électrique durant quelques millisecondes suivit de l'ajout immédiat de 500 μ l de LB. Après ce traitement, les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 1 heure puis étalées sur un milieu sélectif qui a été mis à 37 °C toute la nuit.

2.7 CONJUGAISON

Les plasmides pAP7 et pAP8 ont été conjugués dans les souches de *Rhodobacter capsulatus* appropriées, soit PHU332, SG21 et SG21 respectivement. Les plasmides ont tout d'abord été transformés dans S17.1 (souche *E.coli* capable de conjugaison). Les transformants ont ensuite été cultivés dans du LB + Ab jusqu'à une DO_{600} de 1.0 (une nuit). Pendant ce temps, les souches de *R.capsulatus* ont été cultivées dans du YPS + Ab jusqu'à une DO_{600} de 1.0 (1 à 2 nuits). Les cellules *E.coli* S17.1 ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans 1 ml de YPS. Un mélange de 50 μ l de *E.coli* et de 50 μ l de *R.capsulatus* a été étalé sur 2 cm^2 d'un pétri YPS et incubé à 30°C pendant la nuit. Les colonies présentes ont été récupérées et resuspendues dans 1 ml de RCV et étalées sur pétri RCV+Ab. Cette gélose a été cultivée photosynthétiquement dans une jarre anaérobie à 30 °C pendant quelques jours. Lorsque des colonies de couleur brune sont apparues, celles-ci ont été transférées dans du YPS + Ab et incubées anaérobiquement à 30 °C à la lumière. Les souches RCAP7 et RCAP8 produites ont été conservées à -80 °C.

2.8 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA NITROGÉNASE

Le dosage de l'activité de la nitrogénase s'est fait par chromatographie en phase gazeuse avec un appareil Gas Chromatograph GC-8A (Shimadzu). Les cultures de *R. capsulatus* SB1003, RCAP7, RCAP8 et RCAY99 ont tout d'abord été parties dans du YPS puis transférées dans du RCV sans NH_4^+ . Lorsque la DO_{660} a atteint environ 1.0, la culture était prête pour la chromatographie. De l'argon a été ajouté à des vials vides de 25 ml ainsi qu'à un vial contenant du NH_4Cl 10 mM, et ce, pendant environ 10 minutes. Par la suite, on a ajouté 5 ml de culture au vial avec une seringue tout en gardant le milieu anaérobie. On a mis ces échantillons 15 minutes dans un bain agitateur éclairé et maintenu à 30°C. Une fois le temps écoulé, 2 ml d'acétylène a été ajouté à la culture et c'est à ce moment que la prise de résultats a débuté. Immédiatement, nous avons prélevé un échantillon de 50 μ l provenant de la phase gazeuse de la culture anaérobie et l'avons injecté dans l'appareil. Ceci a été répété à

toutes les 5 minutes d'intervalle pendant 1h30. Cependant, après 20 minutes seulement, 100 μ l de NH_4Cl 10 mM a été ajouté. La réduction de l'acétylène en éthylène a été détectée dans le chromatographe et les pics ont été analysés d'après l'équation suivante : hauteur du pic en mm x atténuation x 4,2 = éthylène produit en nmole.

2.9 MÉTHODES D'ANALYSE DES PROTÉINES

2.9.1 Expression et extraction des protéines

Une extraction rapide des protéines a été effectuée pour vérifier la surexpression de la protéine de fusion GlnK-GST. Pour ce faire, 5 ml de LB avec ampicilline a été inoculé avec une colonie de ECAP6 (pAP6 dans BL21) et mis à 37 °C pendant une nuit. Le lendemain, la culture a été diluée 1/40 dans 25 ml de LB+Ap et incubée à 30 °C jusqu'à une DO_{600} d'environ 0.6. Ensuite, nous avons séparé la culture en deux cultures de 10 ml. Une d'entre elles a été induite avec 0,1 mM d'IPTG et mise à 30 °C pendant 2h30 tandis que l'autre n'a pas subi d'induction mais a été incubée aussi longtemps. Finalement, 1 ml de chaque tube a été prélevé et centrifugé 10 minutes à 10000 rpm. Nous avons ensuite lysé les cellules en soniquant le surnageant 2 fois pendant 20 secondes sur glace à une amplitude de 39 %. Celui-ci a été centrifugé à 13000 rpm pour séparer les débris cellulaires de l'extrait de protéine et il a finalement été resuspendu dans du tampon d'échantillon Tris 100 mM. Quant au culot restant, il a été directement resuspendu dans du tampon d'échantillon SDS. Ces échantillons ont permis d'effectuer l'électrophorèse SDS afin d'observer le profil d'expression protéique.

Une deuxième extraction de protéine a été nécessaire afin de purifier la protéine de fusion GlnK-GST. Celle-ci comportait de plus gros volumes ainsi qu'une méthode un peu plus laborieuse. Une culture de nuit de ECAP6 a été utilisée pour ensemercer 1 L de LB+Ap (dilution 1/100). Cette culture a été incubée à 30 °C jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0.6. On a induit l'expression de la protéine avec IPTG 0.1 mM, pendant 3 heures à 30 °C. Les cellules ont ensuite été centrifugées à

une vitesse de 3500 rpm, pendant 20 minutes à 4 °C. Le culot obtenu a été resuspendu dans du PBS 1x et soniqué 5 fois pendant 1 minute avec une amplitude de 39 %. Pour aider le bris cellulaire mécanique, nous y avons ajouté du Triton X-100 afin d'avoir une concentration finale de 1% et l'avons mélangé sur un agitateur rotatif pendant 30 minutes à 4 °C. Finalement, les cellules brisées ont été centrifugées 20 minutes à 10000 rpm afin de récupérer le surnageant contenant les protéines.

Pour l'étude sur l'état de modification de la protéine Fe de la nitrogénase, nous avons utilisé une méthode d'extraction rapide et efficace avec du SDS. Elle consiste à retirer 50 µl de culture à des temps déterminés et à la transférer immédiatement dans du tampon d'échantillon SDS 1X suivit d'une incubation de 5 minutes dans un bain à 95 °C. Cette méthode évite les changements de modifications dues à des artefacts pouvant survenir au cours des manipulations. Elle lyse les cellules directement sans traitement antérieur et solubilise les protéines en vue d'une électrophorèse en gel SDS et d'une immunodétection subséquente.

2.9.2 Purification de la protéine de fusion

Pour procéder à la purification de la protéine GlnK, nous avons utilisé une colonne d'affinité dans laquelle du glutathion est immobilisé. Le glutathion est le substrat de GST et il permettra la capture des protéines de fusion GlnK-GST. La colonne a été préparée en y ajoutant 200 µl de glutathione sépharose 4B et équilibrée avec 5 ml de PBS froid. Le surnageant d'extrait cellulaire a été passé 2 fois à la colonne, ce qui a permis la liaison de GST. La colonne a ensuite été lavée avec du PBS froid pour enlever les impuretés. Comme la protéine recombinante possède un site de clivage à la thrombine, il a été facile d'éluer la protéine GlnK en ajoutant 1 ml de thrombine (100 un./ml) à la colonne que nous avons alors incubée à la température pièce pendant la nuit. Le lendemain, la protéine GlnK clivée et détachée de GST a été récupérée dans un eppendorf.

2.9.3 Production d'anticorps anti-GlnK de lapin

2.9.3.1 Préparation de l'antigène

Dans le but de récupérer la protéine antigénique pour des fins d'immunisation, l'éluat obtenu lors de la purification de GlnK a migré sur un gel de polyacrylamide qui a ensuite été coloré au bleu de coomassie. La bande correspondant à la protéine a été découpée du gel et fragmentée en petits morceaux dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon. La poudre résiduelle a été resuspendue dans 1 ml de PBS.

2.9.3.2 Immunisation et production d'anticorps

L'antigène GlnK contenu dans le PBS a été combiné à l'adjuvant complet de Freud et injecté à 2 lapins New Zealand White de 1.5 Kg (6 mois). L'immunisation a été effectuée par un technicien de la division de l'animalerie de l'Université de Montréal selon la procédure TEC-08 : Production d'anticorps polyclonaux. Trois semaines plus tard, une seconde immunisation a été faite avec l'antigène et l'adjuvant incomplet de Freud. Après 2 semaines, le sérum a été récupéré à tous les mois pendant une période de 5 mois.

2.9.4 Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS

L'électrophorèse est une technique qui consiste à séparer les molécules qui, lorsque soumises à un champ électrique en présence de SDS, migrent en fonction de leur taille à différentes positions dans une matrice. Nous avons utilisé l'appareil Mini-Protean II Electrophoresis cell (Biorad) pour effectuer l'électrophorèse. La séparation a été faite à partir d'un gel de polyacrylamide 15 %, à 200 V pendant 1 heure. Le marqueur utilisé est le Prestained Protein Marker Broad Range de NEB et le tampon d'électrophorèse est composé de Tris 4 mM, de glycine 39 mM et de SDS 0.1 %. La coloration du gel a été faite avec du bleu de coomassie pendant 30 minutes et une solution de méthanol et d'acide acétique a permis sa décoloration.

2.9.5 Transfert des protéines par Western blot

Pour l'analyse de la présence de protéines spécifiques telles que GlnK ou Fe, un transfert des protéines du gel de l'électrophorèse est nécessaire. Ce transfert a été effectué sur des membranes de PVDF, de nitrocellulose ou de nylon avec l'appareil Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad). L'électroéluion a été effectuée dans du tampon contenant 20 % de méthanol, du Tris 4 mM et de la glycine 39 mM à 40 V pendant la nuit.

2.9.6 Détection avec des anticorps

La membrane sur laquelle les protéines ont été transférées a été soumise à une hybridation avec des anticorps de lapin afin de permettre la détection de la protéine voulue. Pour ce faire, la membrane a subi 2 lavages dans du Tris-Buffered Saline avec Tween (TBST) pendant 5 minutes. Ensuite, elle a été bloquée pendant 1 heure avec du TBST contenant du lait en poudre 5% afin de réduire les sites non-spécifiques. Deux lavages au TBST ont précédé l'ajout de 20 ml d'anticorps primaires dilués 1/2000 dans la solution de blocage. Selon l'expérience, nous avons utilisé deux types d'anticorps : des anticorps anti-GlnK de lapin pour détecter la présence de GlnK à la membrane et les anticorps anti-Fe de lapin pour montrer la modification de la nitrogénase. Cette première hybridation de 2 heures a été poursuivie par deux autres lavages au TBST qui ont été effectués afin d'éliminer les anticorps non-liés. Finalement, 20 ml d'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugués à la peroxydase et dilués 1/25000 a été ajouté à la membrane pendant 2 heures et retiré par la suite par 2 lavages dans du TBST et un dans le TBS.

2.9.7 Détection de la présence de protéines

La détection des protéines fixées sur la membrane de PVDF, de nitrocellulose ou de nylon a été faite avec un kit d'Amersham Biosciences, le ECL Western Blotting Detection Reagents selon les directives du manufacturier.

2.9.8 Séparation des compartiments cellulaires

Pour vérifier la présence de la protéine GlnK au niveau de la membrane, les compartiments cellulaires (membrane et cytoplasme) de plusieurs souches de *Rhodobacter capsulatus* ont dû être séparé selon un protocole modifié de Merrick *et al*, 2002.

Les cultures de *R. capsulatus* SB1003, SG21, PHU332 et RCAY63 ont été parties dans 17 ml de YPS, à 30°C en condition anaérobies à la lumière. Le lendemain, les cultures ont été diluées 1/50 dans du RCV NH_4^+ 4 mM dans des bouteilles contenant 310 ml. À une DO_{600} de 1.6-1.8, les cellules ont été centrifugées à 3500 rpm, 20 minutes. Le culot a ensuite été resuspendu dans du tampon sodium-phosphate 50 mM et soniqué 3x, pendant 20 secondes à une amplitude de 39%. Une centrifugation à 16000 rpm pendant 30 minutes a ensuite été effectuée et 1 ml du surnageant obtenu a été récupéré et transféré dans des minis tubes de polycarbonate. Le reste a été conservé comme fraction entière. Afin d'isoler les membranes cellulaires, les tubes de polycarbonate contenant le surnageant ont été centrifugés à une vitesse de 100000 rpm, 30 minutes dans un appareil Air-Driven Ultracentrifuge (Beckman). Sur la surface, 0.1 ml du surnageant a été récupéré comme fraction cytoplasmique et le reste a été jeté. Le culot résiduel a été resuspendu dans 1 ml de tampon sodium-phosphate 50 mM et a été centrifugé à nouveau à 100000 rpm. Les étapes de resuspension et de centrifugation ont été effectuées pour une dernière fois. Finalement, le culot obtenu a été resuspendu dans tampon sodium-phosphate 50 mM, ceci correspondant à la fraction membranaire.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 ÉTUDE DU RÔLE DE L'URIDYLATION DES PII DANS LA RÉGULATION ET LA MODIFICATION DE LA NITROGÉNASE

3.1.2 Création d'un mutant *glnKY51F* par mutagenèse dirigée par PCR

Un premier fragment de 485 pb correspondant à la partie du gène en amont de l'acide aminé à muter a été obtenu par PCR sur pAY98 à l'aide des amorces A-U et A-1 (tableau V). La deuxième ronde de PCR a permis d'obtenir un deuxième fragment de 220 pb correspondant à la séquence en aval de la tyrosine 51. Celui-ci a été obtenu à partir de pAY98 avec les amorces A-2 et A-R (tableau V). La troisième ronde de PCR consistait à mélanger les fragments de 485 pb et 220 pb obtenus lors des premières rondes avec les amorces A-U et A-R. Les deux produits se sont alors liés au niveau de la séquence complémentaire (région de 17 pb de part d'autre de la mutation) et un fragment de 700 pb correspondant à *glnKY51F* a été synthétisé (figure 13). Celui-ci a été cloné dans pJB3Tc20 selon la méthode décrite en 2.4.1 ce qui a produit le plasmide pAP2 .

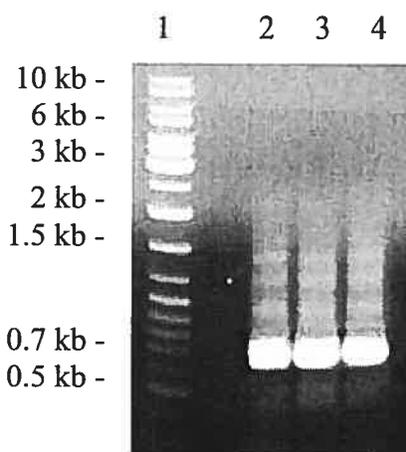


Figure 13. Fragment *glnK* de *R.capsulatus* muté par mutagenèse dirigée par PCR.

Puit 1: Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder Mix

Puit 2,3,4 : Fragment de 700 pb correspondant à *glnKY51F*

Au cours de nos recherches, nous avons remarqué que la souche de *R.capsulatus* SG21 déficiente en *glnK* n'était pas valable pour les expériences sur l'activité de la nitrogénase. En fait, l'insertion de la cassette de résistance à la gentamicine au niveau du gène *glnK* créait une mutation polaire sur le gène *amtB*, ceci rendant cette souche défectueuse au niveau de tout l'opéron *glnKamtB*. Afin de pallier à ce problème, nous avons amplifié par PCR et cloné le gène *amtB* en aval du gène *glnKY51F* dans le plasmide pAP2 aux sites *Bam*HI/*Kpn*I. On peut voir le résultat de l'amplification du gène *amtB* à la figure 14. Le plasmide produit nommé pAP8 a été conjugué dans la souche *R.capsulatus* SG21 à partir de *E.coli* S17.1. Ainsi, la protéine codée par *amtB* sur pAP8 complétera ainsi la protéine défectueuse de la souche hôte.

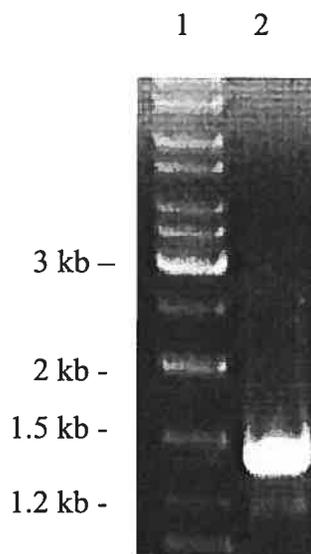


Figure 14. Gène *amtB* de *R.capsulatus* amplifié par PCR

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder Mix
 Puit 2 : Fragment de 1400 pb correspondant à *amtB*

3.1.3 Création d'une souche *R.capsulatus* Δ *glnK* :: Gm^r

Dans le même ordre d'idées, nous avons créé une souche *R.capsulatus* qui est déléetée de façon non polaire au niveau du gène *glnK*. La délétion de 264 pb ne

change pas le cadre de lecture d'*amtB*, donc il peut être exprimé à partir du promoteur NtrC-dépendant comme la souche sauvage SB1003. La description de la création de cette souche figure à la section 2.4.5. Brièvement, deux fragments de 394 pb (région promotrice de l'opéron *glnKamtB*) et 1615 pb (codon stop de *glnK* et *amtB* en entier) ont été amplifiés par PCR sur pAY98 avec les amorces E-U et E-1 ainsi que E-2 et E-R respectivement (tableau V). Ceux-ci ont été sousclonés ensemble dans pUC18 ce qui forme un fragment de 2014 pb correspondant aux gènes *glnK* délété et *amtB*. Il a ensuite été cloné dans pBSIIKS- et la cassette de résistance à la gentamicine de 850 pb a été insérée en amont de la séquence promotrice de *glnK*. La construction de ce plasmide nommé pBSKABGM a été vérifiée à l'aide d'enzyme de restriction. On peut voir à la figure 15A que son profil de restriction est adéquat si on se réfère à l'annexe I dans laquelle on retrouve la carte de restriction du plasmide.

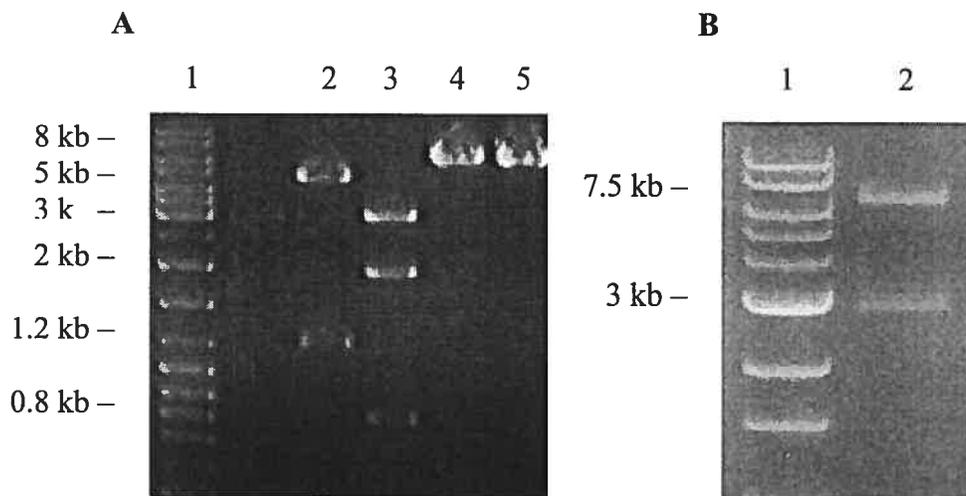


Figure 15. Vérification de la construction des plasmides A) pBSKABGM et B) pAP11

- A) Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder Mix
 Puit 2 : digéré *Bam*HI : Fragments de 4.6 kb et 1.2 kb
 Puit 3 : digéré *Kpn*I : Fragments de 3.3 kb, 1.7 kb et 0.85 kb
 Puit 4 : digéré *Pst*I : Fragment de 5.8 kb
 Puit 5 : digéré *Eco*RI : Fragment de 5.8 kb
- B) Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder Mix
 Puit 2 : digéré *Pst*I/*Eco*RI : Fragments de 7.5 kb et 2.9 kb

Pour procéder au clonage du fragment $\Delta glnK::Gm^r$ dans un vecteur de mobilisation, nous avons dû d'abord l'amplifier par PCR à partir du plasmide pBSKABGM. Le fragment obtenu (2864 pb) a été intégré dans pSUP202 pour donner le plasmide pAP11. On peut voir à la figure 15B que l'insert (2864 pb) a bien été introduit au niveau du vecteur pSUP202 (7.5 kb).

3.1.4 Criblage et vérification des doubles recombinants

À la suite de la conjugaison du plasmide pAP11 dans la souche *R.capsulatus* SB1003, nous avons fait un criblage afin de trouver les doubles recombinants. Ceux-ci présentent un gène chromosomique *glnK* sauvage qui a été remplacé avec le gène inactivé sur le plasmide pAP11. Lors de la conjugaison, nous avons obtenu 60 colonies Gm^r/Rif^r sur gélose RCV. Sur ce pétri, les bactéries *R.capsulatus* ayant intégré la cassette de résistance ont été sélectionnées. Pour trouver les doubles recombinants, nous avons dans une première étape, repiqué 25 colonies résultant de la conjugaison sur un pétri YPS avec de la gentamicine. Afin de cribler celles qui ont perdu le vecteur suicide pSUP202 qui est Tc^r , nous avons repiqué les bactéries Gm^r sur un pétri YPS avec tétracycline. Les doubles recombinants RCKGM ont été sélectionnés par leur phénotype Gm^r et Tc^s et représentaient 60 % des colonies Gm^r .

La technique de PCR aurait dû éventuellement être utilisée afin de s'assurer que RCKGM est un double recombinant en démontrant que le gène sauvage *glnK* n'est plus dans le chromosome de la souche sauvage SB1003.

3.1.5 Création d'un mutant *glnBY51F* par mutagenèse dirigée par PCR

Les deux premiers PCR ont été faits sur pAY132. La première ronde a permis d'obtenir un fragment de 700 pb en utilisant les amorces C-U et C-1 (tableau V). La seconde ronde a nécessité les amorces C-R et C-2 et a donné un fragment de 365 pb. La dernière qui consistait à ajouter les amorces C-U et C-R au mélange des deux produits a permis l'obtention d'un produit final de 1100 pb correspondant à *glnBY51F* que l'on peut voir à la figure 16.

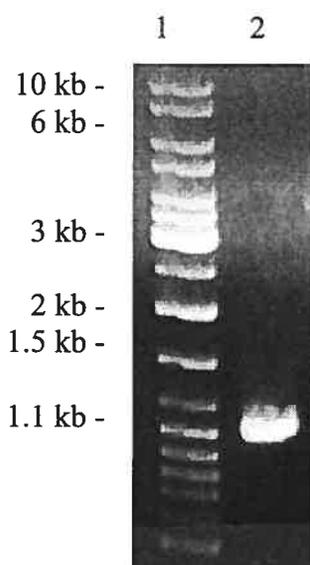


Figure 16. Fragment *glnB* de *R.capsulatus* muté par mutagenèse dirigée par PCR.

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder Mix.

Puit 2 : Fragment de 1100 pb correspondant à *glnBY51F*.

3.1.6 Vérification de la présence de la mutation Y51F dans les gènes *glnK* et *glnB*

Le changement du codon TAT (Y) en TTC (F) dans les gènes *glnK* et *glnB* a introduit un site de restriction *EcoRI*. Afin de vérifier la présence de la mutation Y51F créée par PCR, nous avons digéré les fragments de 700 pb et 1100 pb avec l'enzyme *EcoRI*. L'obtention de fragments de tailles égales aux deux premiers produits de PCR soit 485 pb et 220 pb pour *glnKY51F* ainsi que 1100 pb et 365 pb pour *glnBY51F* a confirmé la présence de la mutation. Donc le remplacement de l'acide aminé tyrosine à la position 51 en phénylalanine a bel et bien été fait. Pour valider ce résultat, les plasmides pAP2 et pAP7 ont été séquencés. Les résultats de séquençage ont démontré la présence de la mutation voulue ainsi que l'absence de mutations indésirées parfois introduites par l'enzyme polymérase lors des réactions de PCR.

3.1.7 Régulation de l'activité de la nitrogénase chez différentes souches de *R.capsulatus*

La chromatographie en phase gazeuse a permis de comparer les niveaux de régulation de l'activité de la nitrogénase entre la souche sauvage *R. capsulatus* SB1003, et les souches modifiées RCAP7 (pAP7 dans PHU332) et RCAP8 (pAP8 dans SG21). Les détails de cette expérience sont décrits à la section 2.8. Brièvement, les souches bactériennes ont été cultivées dans du RCV sans azote, en anaérobie et en présence de lumière pour que la fixation de l'azote atmosphérique soit maximale. Des échantillons ont été prélevés et analysés à toutes les 5 minutes à partir du début jusqu'à la fin de l'expérience alors que du NH_4Cl a été ajouté après 20 minutes d'incubation afin de vérifier la régulation de ce processus. Sur les graphiques qui sont présentés aux figures 17, 18 et 19, le niveau de fixation de l'azote se traduit par la quantité d'éthylène produit par les cellules bactériennes grâce à la réduction de l'acétylène par la nitrogénase.

À la figure 17, on peut voir que la régulation de la fixation de l'azote chez la souche sauvage SB1003 a bien lieu. En présence de 200 μM de NH_4Cl , l'activité de la nitrogénase semble être inhibée irréversiblement ou du moins sur une longue période. Dans ces conditions, la quantité d'éthylène dans le vial est fixe (1000 nmol) et s'observe par un plateau continu sur le graphique. Cependant, si on ajoute 100 μM de NH_4Cl à la souche sauvage, on observe un plateau pendant seulement 20 minutes et ensuite la quantité d'éthylène produite augmente à nouveau. Cette concentration en azote permet donc la régulation réversible de la nitrogénase qui est inhibée en présence de NH_4^+ et réactivée lorsque la source est épuisée.

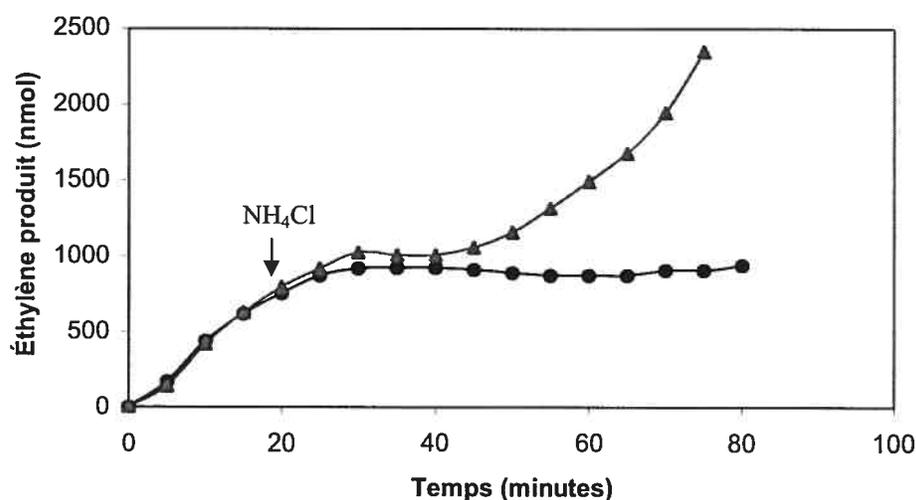
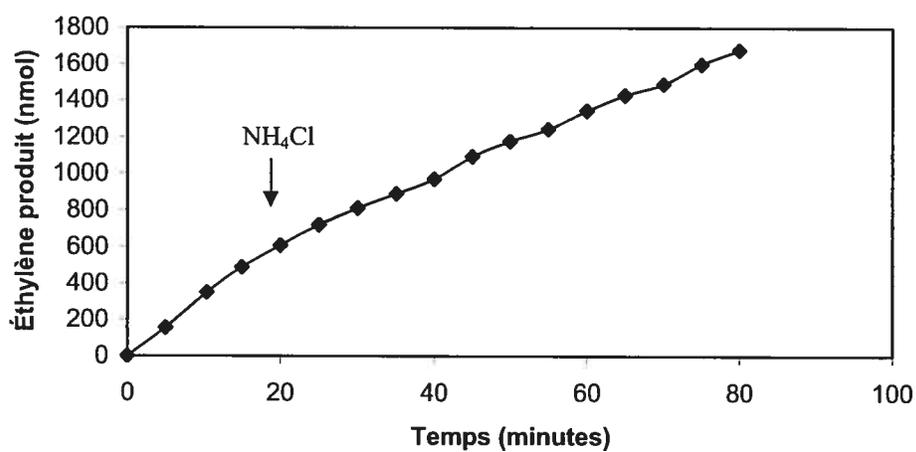


Figure 17. Régulation de l'activité de la nitrogénase en présence de 200 μM de NH_4Cl (●) ou de 100 μM de NH_4Cl (▲) chez *R. capsulatus* SB1003.

La figure 18 montre les résultats de chromatographie obtenus pour les mutants *glnKY51F* (RCAP8) et *glnBY51F* (RCAP7). Sur le graphique, on remarque une pente linéaire continue. Comme on ne retrouve pas de plateau après ajout de NH_4Cl , nous pouvons supposer qu'il n'y a pas de régulation de l'activité de la nitrogénase chez ces souches mutantes de *R.capsulatus*.

A



B

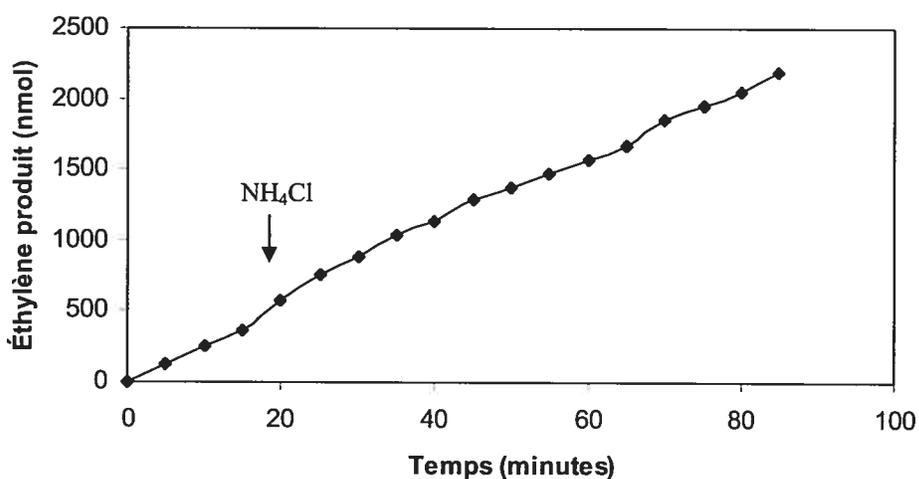


Figure 18. Régulation de l'activité de la nitrogénase en présence de $200 \mu\text{M}$ de NH_4Cl chez les mutants *R.capsulatus* A) *glnKY51F* et B) *glnBY51F*.

3.1.8 ADP-ribosylation de la protéine Fe de la nitrogénase chez différentes souches de *R.capsulatus*.

La vérification de la modification de la protéine Fe de la nitrogénase a été faite grâce à une extraction protéique rapide au SDS (voir section 2.9.1) à partir des cultures qui ont servi à faire la chromatographie en phase gazeuse. Les échantillons de SB1003, *glnBY51F* et *glnKY51F* ont été retirés du vial à toutes les 10 minutes pendant la période d'incubation pour la chromatographie. Les résultats des immunobuvardages sont présentés à la figure 19.

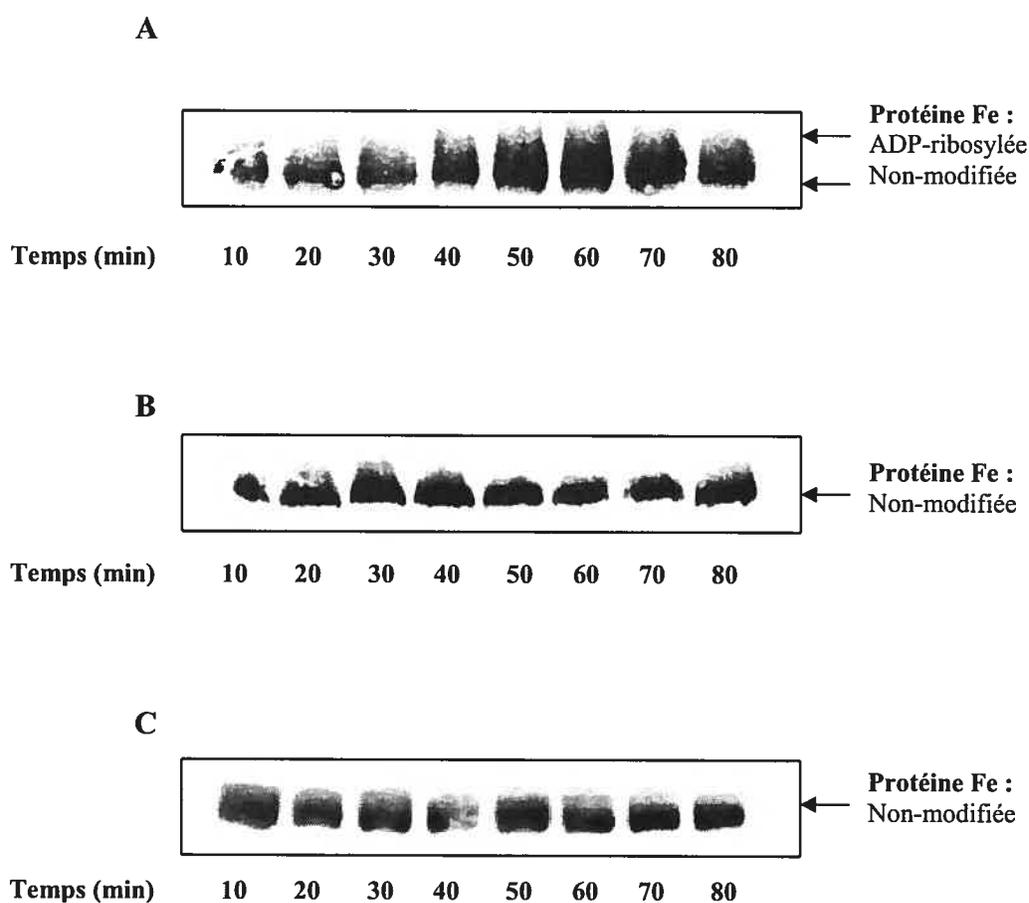


Figure 19. ADP-ribosylation de la protéine Fe chez les souches de *R.capsulatus*
A) SB1003, B) *glnBY51F* et C) *glnKY51F*.

Il est difficile de distinguer à la figure 19A que la protéine Fe de la souche sauvage *R.capsulatus* est modifiée après l'ajout du NH_4Cl . La résolution de l'image n'est pas satisfaisante, car il est impossible d'observer une bande distincte correspondant à la forme ADP-ribosylée de la protéine. Cependant, comme on remarque des taches plus grosses et plus intenses après 30 minutes, on peut supposer qu'il y a peut-être modification mais que celle-ci n'est pas évidente sur cette image. Plusieurs gels ont été fait mais aucun d'entre eux n'ont permis une meilleure résolution des bandes. Malheureusement, les conditions optimales pour l'obtention de ses bandes distinctes n'ont jamais été atteintes. D'autres essais devraient donc être effectués à ce niveau.

Pour les mutants *R.capsulatus glnBY51F* et *glnKY51F*, les figures 19B et 19C démontrent qu'il n'y a aucune modification de la protéine Fe après l'ajout de $200 \mu\text{M}$ de NH_4^+ . Chez les deux souches, les échantillons pris à un intervalle de 10 minutes présentent chacun une seule bande distincte et celles-ci sont toutes de taille égale dans le temps. La taille de ces bandes semble d'ailleurs similaire à celle des échantillons de la souche SB1003 avant l'ajout d'azote.

3.2 ÉTUDE SUR LA SÉQUESTRATION DE GLNK À LA MEMBRANE

3.2.1 Création d'une protéine de fusion GlnK-GST

Afin d'obtenir des anticorps spécifiques anti-GlnK, on a créé une protéine de fusion pour en faciliter la purification avec une colonne d'affinité. Les détails de la construction figurent à la section 2.4.3. En bref, nous avons amplifié par PCR l'opéron *glnKamtB* et avons obtenu un fragment de 1720 pb que l'on peut voir à la figure 20A. Ce fragment a été coupé avec les enzymes *EcoRI* et *NotI* afin d'isoler uniquement la séquence codante pour *glnK*. Cette étape a permis d'obtenir un fragment de 1270 pb (*amtB*) et un autre de 450 pb (*glnK*) (figure 20B) qui a été cloné dans le vecteur pGEX4-T1 aux sites *EcoRI/NotI*. Ceci a formé le plasmide pAP6.

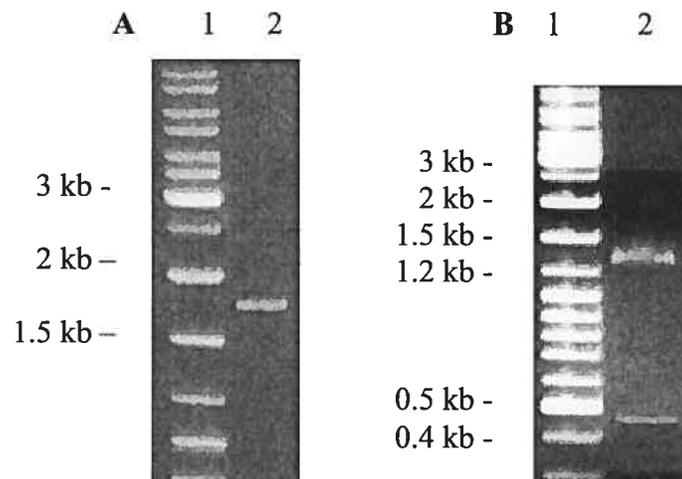


Figure 20. A) Fragment *glnKamtB* de *R.capsulatus* amplifié par PCR

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder Mix

Puit 2 : Fragment de 1720 pb représentant *glnKamtB*

B) Fragment *glnKamtB* digéré *EcoRI/NotI*

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder Mix

Puit 2 : Fragment de 1270 pb et 450 pb correspondant à *amtB* et à la séquence codante de *glnK* respectivement

3.2.2 Surexpression de la protéine de fusion GlnK-GST

Le plasmide pAP6 a ensuite été transformé dans des cellules d'*E.coli* BL21 qui ont la particularité d'être déficientes en protéases, ce qui permet une expression protéique adéquate, exempt de dégradation. La souche produite se nomme ECAP6. L'expression qui a été induite par l'ajout d'IPTG a été observée sur gel de polyacrylamide suite à une électrophorèse de l'extrait cellulaire avant et après induction (voir section 2.9.1 pour plus de détail sur l'expression et l'extraction protéique). La figure 21 montre les résultats de la surexpression de la protéine de fusion GlnK-GST. On peut observer au niveau du lysat cellulaire après induction qu'une bande d'intensité prédominante apparaît aux environs de 38 kDa. Cette taille concorde parfaitement avec celle des deux protéines, soit, 26 kDa plus 12 kDa pour GST et une sous-unité de GlnK respectivement. Cette bande d'intensité plus faible avant induction démontre que la surexpression a réussi.

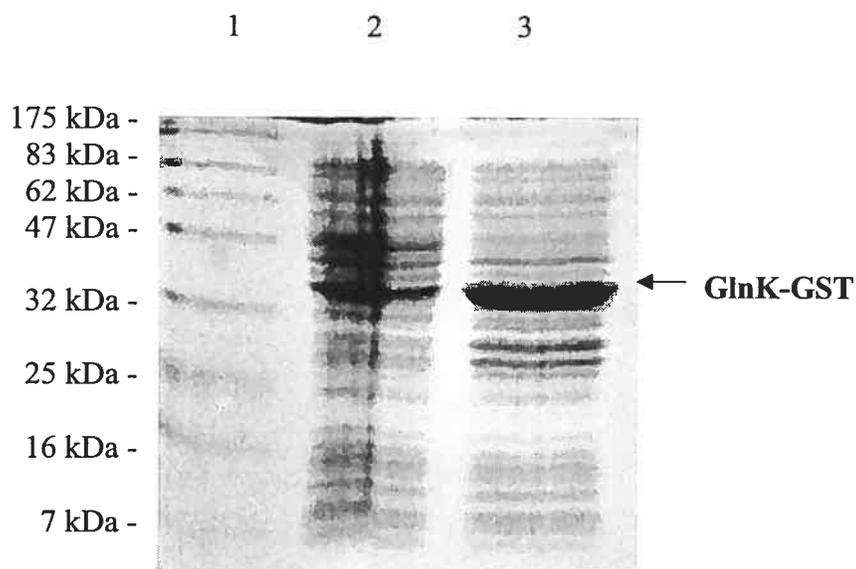


Figure 21. Surexpression de la protéine de fusion GlnK-GST

- Puit 1 : Marqueur de protéines
- Puit 2 : Extrait cellulaire avant induction
- Puit 3 : Extrait cellulaire après induction

3.2.3 Purification de la protéine GlnK

Pour procéder à la purification, nous avons utilisé une colonne d'affinité dans laquelle du glutathion est immobilisé. La description détaillée de la purification est donnée à la section 2.9.2. La figure 22 montre GlnK purifiée sur un gel de polyacrylamide ainsi que d'autres profils de protéines obtenus suite à une électrophorèse SDS. Le deuxième puit démontre que la protéine GlnK-GST ne se retrouve pas dans le culot résultant de l'extrait cellulaire car aucune bande ne correspond à sa taille. Par contre, on peut voir dans le troisième puit que la protéine recombinante a été produite en grande quantité dans le lysat cellulaire après induction par l'IPTG puisqu'une bande d'environ 38 kDa prédomine par rapport à toutes les autres bandes. Le quatrième puit représente le surnageant récupéré après purification. Comme on peut le voir, la bande de 38 kDa qui représente la protéine de fusion est beaucoup moins grosse qu'avant la purification, ce qui veut dire qu'elle a été fixée à la colonne via le glutathion. Toutes les autres bandes ont une intensité similaire avant et après la purification comme prévu. Finalement, les deux derniers puits contiennent la protéine GlnK clivée par la thrombine et éluée de la colonne. La taille de la bande majeure observée correspond bien à celle d'une sous-unité de la protéine GlnK, c'est-à-dire 12 kDa. Cependant, cette bande est d'intensité moindre que ce que nous croyions observer après purification. On peut également remarquer de faibles bandes apparaissant vers les 38 kDa et 30 kDa. Celles-ci pourraient correspondre aux protéines GlnK-GST et GST seule. La pression exercée par la seringue pour récupérer l'éluat de la colonne après clivage pourrait expliquer la présence de ces bandes. Cette pression serait suffisante pour faire détacher les protéines GST de leur substrat. Les protéines GlnK-GST qui n'ont pas été coupées par la thrombine ont pu de cette façon être éluées de la colonne avec la protéine GlnK seule.

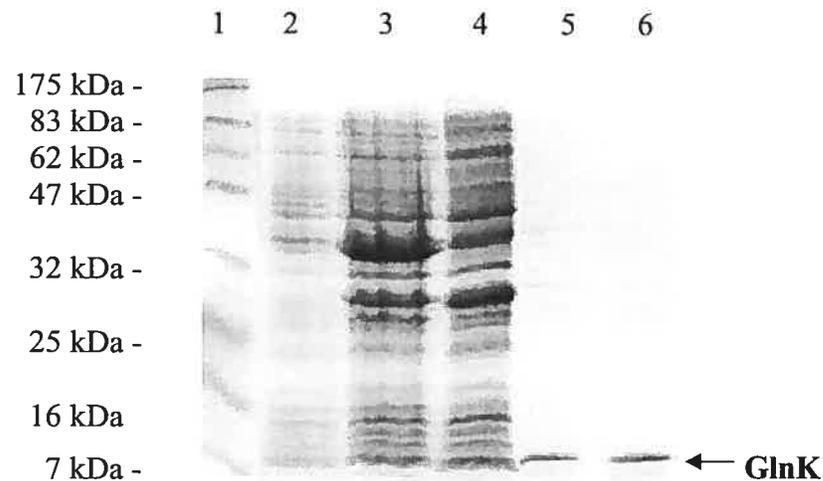


Figure 22. GlnK purifié coloré au bleu de coomassie.

- Puit 1 : Marqueur de protéine
- Puit 2 : Culot cellulaire après IPTG
- Puit 3 : Surnageant après IPTG
- Puit 4 : Surnageant après purification
- Puit 5-6 : GlnK après purification

3.2.4 Production d'anticorps anti-GlnK de lapin

Les bandes de 12 kDa que nous avons observées à la figure 22 ont été découpées et ont servi à immuniser les lapins selon la technique élaborée à la section 2.9.3 sur la production d'anticorps. Un mois après la deuxième immunisation, nous avons récupéré le sérum et avons testé les anticorps sur l'éluat obtenu après le clivage de la protéine GlnK fixée à la colonne d'affinité. Les résultats sont concluants. Sur la figure 23, on peut observer deux taches qui correspondent à des protéines bactériennes ayant de l'affinité pour les anticorps contenus dans le sérum de lapin. Les tailles de ces protéines correspondent à 38 kDa et 12 kDa. Celle du haut représente la protéine GlnK encore fusionnée à GST qui n'a pas été clivée. On pouvait d'ailleurs l'observer dans la figure 22. Celle du bas correspond à GlnK clivé. Ce résultat nous permet de confirmer la spécificité des anticorps de lapin envers GlnK.

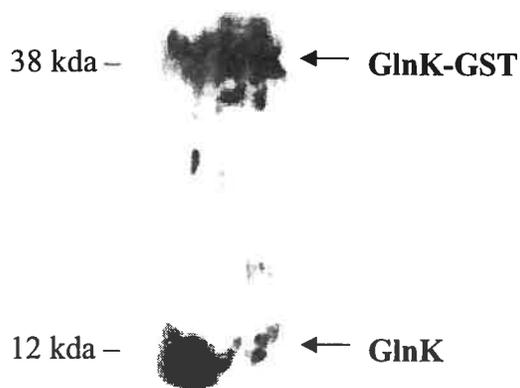


Figure 23. Détection de la protéine GlnK purifiée (0.32 mg/ml) avec les anticorps anti-GlnK de lapin produits. La bande du haut correspond à GlnK-GST qui n'a pas été clivée et la bande du bas correspond à GlnK seul.

3.2.5 Séparation et analyse des compartiments cellulaires

Les compartiments cellulaires de différentes souches de *R.capsulatus* ont été séparés selon la méthode décrite à la section 2.9.8. Pour déterminer la présence de GlnK à l'aide des anticorps produits, les échantillons des différents compartiments cellulaires ont subi une électrophorèse SDS sur un gel de polyacrylamide de 20 % pour séparer les protéines. Ensuite, le transfert des protéines a été fait sur des membranes de PVDF. Finalement, les anticorps anti-GlnK de lapin que nous avons produits ont été utilisés pour l'hybridation primaire tandis que des anticorps anti-IgG conjugués-HRP de lapin ont servi pour la détection avec un kit ECL d'Amersham. Les résultats obtenus se sont avérés peu satisfaisants. Chez toutes les souches de *R.capsulatus* (SB1003, PHU332, SG21) et dans tous les compartiments cellulaires, aucune bande correspondant à la protéine GlnK n'a été détectée. L'expérience a été répétée à plusieurs reprises sans aucun succès, les résultats erronés étant très reproductibles.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Depuis un certain temps, la biotechnologie en agriculture est devenue une avenue intéressante pour établir un équilibre entre la nutrition globale et les préoccupations environnementales. On voit cet intérêt grandissant au désir d'obtenir une production agricole abondante et saine. Il est connu que l'azote diatomique limite encore cette production. Cependant, la fixation de celui-ci permet à plusieurs organismes de se nourrir plus aisément, ceci permettant une augmentation des ressources alimentaires ainsi qu'une diminution de l'utilisation des engrais. Il est donc important de comprendre le processus de fixation de l'azote afin de trouver différentes méthodes permettant de l'améliorer. Dans ce contexte, notre participation a été d'étudier le rôle des protéines PII impliquées dans la régulation de ce processus. C'est par des études d'interactions entre protéines et par la création de protéines mutantes que nous avons exploité cette approche.

Dans le but de vérifier l'effet de l'uridylation des PII sur la régulation de l'activité et de l'ADP-ribosylation de la nitrogénase chez *R.capsulatus*, nous avons créé des protéines GlnB et GlnK mutantes au niveau de la tyrosine en position 51. Cet acide aminé est très conservé chez les PII et constitue le site d'uridylation par GlnD. Le remplacement de la tyrosine par la phénylalanine ne change pas la conformation de la loupe C mais change sans aucun doute la séquence en nucléotide du codon (TAT → TTC) ce qui rend impossible l'uridylation à cette position. La substitution de la tyrosine en phénylalanine devrait altérer la régulation de l'activité de PII.

Pour l'analyse de la réponse au niveau de l'activité et de la modification de la nitrogénase, nous avons utilisé des cultures hautement limitées en azote et l'extraction des protéines s'est faite avec une méthode d'ébullition rapide qui évite l'ADP-ribosylation de la protéine Fe due à la noirceur. Sous ces conditions expérimentales, la souche sauvage *R.capsulatus* a montré une régulation de l'activité de la nitrogénase de type «switch off» en présence de 100 μM d'ammonium et une inhibition irréversible de l'enzyme en présence de 200 μM de NH_4^+ (figure 17). Dans un même temps, on distingue faiblement sur la figure 19A, l'ADP-ribosylation de la protéine Fe. Sur cette figure, la bande correspondante à Fe-ADP se confond avec celle correspondant à Fe après la détection. Plusieurs électrophorèses et

immunobuvardages ont été effectuées, mais nous ne sommes jamais parvenus à obtenir une résolution parfaite. Au lieu de retrouver deux bandes distinctes, nous observons une seule bande plus grosse et plus intense qui représente les deux formes de protéines qui n'ont pas été séparées suffisamment pendant leur migration dans le gel. Comme ces bandes plus intenses apparaissent après l'ajout d'ammonium, nous pouvons tout de même affirmer que la souche sauvage a bien montré une modification de la protéine Fe en présence d'azote dans le milieu. Des essais d'optimisation pourraient être effectués pour obtenir une meilleure résolution. Nous pourrions augmenter la grosseur du gel ainsi que le temps de migration ou modifier certaines conditions par exemple. Malgré ce détail, la souche sauvage *R. capsulatus* SB1003 montre un patron de régulation conforme à nos attentes.

Chez les mutants *R. capsulatus* RCAP7 (*glnBY51F*) et RCAP8 (*glnKY51F*), les résultats démontrent que contrairement à la souche sauvage, les souches mutantes n'ont montré aucune régulation de l'activité (figure 18) et aucune modification de la nitrogénase (figure 19BC). En fait, elles ont obtenu plutôt un niveau de fixation de l'azote élevé et constant même après l'ajout de 200 μM d'ammonium. Ceci signifie que l'ADP-ribosylation de Fe de même que le «switch off» indépendant de DraT/DraG sont complètement abolis en présence de protéines PII mutées. Selon ce que nous avons obtenu, nous pourrions croire que l'uridylation de GlnB et GlnK serait essentielle à la régulation de ces processus chez *R. capsulatus*.

En ce qui concerne la souche RCAP7 (*glnBY51F*), ces résultats nous laissent perplexes. Théoriquement, chez *R. capsulatus*, GlnB est la seule protéine PII qui interagit avec NtrB en présence d'azote. Cette interaction permet à NtrB d'inhiber NtrC et donc d'empêcher la transcription des gènes NtrC dépendants, ce qui résulte en l'inactivation de la nitrogénase. En absence d'azote, GlnB-UMP ne peut lier NtrB qui peut alors garder son activité kinase et activer NtrC. La transcription des gènes par NtrC permet à la nitrogénase d'être active et de réduire le N_2 . Pour une souche telle que RCAP7 qui contient protéine GlnBY51F, la situation se doit d'être différente. Dans un milieu où les sources azotées sont manquantes, ces cellules devraient se comporter comme si elles étaient en présence d'azote puisque GlnB ne pourra jamais être uridyliée. Nous savons que dans ces conditions, il n'y a pas de

fixation de l'azote et la protéine Fe de la nitrogénase est complètement ADP-ribosylée. D'après la littérature, aucune production d'éthylène n'aurait dû être détectée par chromatographie. Nos résultats semblent donc aberrants puisque nous observons une réduction de l'acétylène très efficace même après l'ajout d'ammonium chez ce mutant. Nous ne sommes cependant pas en mesure d'expliquer ce phénomène. Nous aurions dû utiliser des techniques telles le PCR ou le southern blot pour vérifier si la souche est belle et bien mutante.

Heureusement, il nous a été possible d'interpréter les résultats obtenus pour la souche RCAP8 (*glnKY51F*). Ceux-ci s'expliquent entre autres par l'interaction entre GlnK et AmtB. Comme on peut le voir sur le modèle présenté par Javelle et ses collaborateurs (figure 12), GlnK de *E.coli* est uridylée en absence d'azote et permet à l'expression des gènes de régulation NtrC dépendants d'avoir lieu. En présence d'une source azotée, GlnK est non-uridylée. Sous cette forme, elle se lie à la membrane via AmtB. Cette liaison ne permet plus à AmtB de transporter de l'ammonium dans la cellule. Dans notre cas, comme nous sommes en présence d'une protéine GlnKY51F qui n'est jamais uridylée, nous croyons que celle-ci pourrait être liée à AmtB indépendamment de la concentration en azote extracellulaire. Cet attachement irréversible inhiberait alors complètement l'activité d'AmtB dans n'importe quelles conditions. Yakunin et Hallenbeck (2002) ont démontré que AmtB est nécessaire pour induire le «switch off» de la nitrogénase et l'ADP-ribosylation chez *R.capsulatus* en présence de NH_4^+ . Donc, si notre protéine mutante inhibe AmtB, il est normal d'observer une absence de régulation de l'activité et de l'ADP-ribosylation de la nitrogénase. Les résultats obtenus pour la souche RCAP8 répondent bien à nos attentes et nous pouvons penser que l'uridylation de GlnK est essentielle à la régulation du processus de fixation de l'azote ainsi qu'à la modification de la protéine Fe de la nitrogénase.

Afin d'être certain de ce que nous avançons, nous pourrions compléter la souche RCAP8 avec le plasmide pAP9 qui contient le gène *glnK* intact. Si le «switch off» ainsi que l'ADP-ribosylation se rétablissent après l'ajout de NH_4^+ , alors cela démontrerait que cet effet est véritablement dû à la mutation Y51F introduite. Il serait aussi intéressant de compléter la souche RCKGM ($\Delta\text{glnK} :: \text{Gm}^r$) avec le

plasmide pAP2 (*glnKY51F*). Cette souche a été récemment construite lors de nos travaux et remplace celle qui créait un effet polaire sur le gène *amtB* (SG21). Nous pourrions alors confirmer les résultats obtenus pour la souche RCAP8 que nous avons utilisée pour cette expérience. De plus, il serait essentiel de prouver que GlnK est séquestrée à la membrane via AmtB en présence d'azote chez *R.capsulatus*. Coutts et ses partenaires (2002) ont démontré que c'était le cas chez *E.coli* et Martin et ses collaborateurs (2002) l'ont également prouvé pour la souche BH72 d'*Azoarcus*.

Nous avons alors tenté de démontrer la liaison membranaire de GlnK en utilisant le protocole de Coutts *et al.* (2002). Malheureusement, les anticorps produits n'ont pas permis la détection de GlnK au niveau des différents compartiments cellulaires. Aucune protéine GlnK ne semblait faire partie de la membrane et même du cytoplasme des cellules de *R.capsulatus*. Les causes de ce problème peuvent être multiples.

La technique utilisée pour le fractionnement cellulaire ne ferait pas partie des causes, car selon nos observations, celle-ci semblerait fonctionner. Lors de la fractionnement, nous avons obtenu un culot de couleur brun ou rouge dans la fraction membranaire tandis que la fraction cytoplasmique était incolore. Nous savons que la membrane de *R.capsulatus* possède des pigments de la même couleur que celle du culot obtenu. Ceci indique avec évidence qu'il représente la fraction membranaire et donc que la séparation des compartiments cellulaires a été réussie. Alors, nous pensons que les difficultés survenues pourraient se situer plus au niveau de la qualité des anticorps et de la quantité de protéines extraites de ces compartiments.

La spécificité des anticorps est souvent attribuable à la qualité et la concentration de l'antigène injecté aux lapins. Une surexpression insuffisante ou une purification inadéquate de la protéine GlnK pourrait expliquer la faible concentration d'antigène utilisé pour l'immunisation ou le manque de spécificité des anticorps.

Au moment où l'expérience a été réalisée, nous avons considéré que la surexpression avait été réussie d'après les résultats obtenus à la figure 15. Sur cette figure, on voit que la bande correspondant à GlnK-GST est de loin plus intense que les autres. Selon nos observations, la quantité de protéines surexprimées semblait

suffisante, mais peut-être que celle-ci aurait dû être encore plus forte afin de purifier un plus grand nombre de protéines. Il se pourrait aussi que les cellules n'aient pas été lysées complètement, il faudrait donc augmenter le temps de sonication ou bien suivre un protocole qui permet une très grande solubilisation des membranes et qui permet une extraction protéique très efficace. Une alternative pour obtenir une plus forte expression de la protéine recombinante, serait d'utiliser les cellules BL21-CodonPlus de Stratagene qui permettent d'exprimer de très grandes quantités de protéines. La souche Codonplus contient des copies supplémentaires d'ARN de transfert qui sont nécessaires à la traduction des protéines dans la cellule hôte. Habituellement, ces ARNt sont abondants chez l'organisme dont provient la protéine (*R.capsulatus*) mais ceux-ci peuvent être limitant chez l'hôte. C'est pourquoi ces cellules pourraient pallier ce problème et permettre ainsi une plus grande production de protéines hétérologues qui sont normalement faiblement exprimées chez les BL21 classiques.

Advenant que la surexpression ne puisse pas résoudre le problème, nous pourrions soupçonner la qualité de la purification de faire partie des éléments à améliorer. D'après les résultats présentés à la figure 16, on peut affirmer que la purification de la protéine GlnK a été réussie puisque la taille de la bande observée après purification est d'environ de 12 kDa, tout comme celle de GlnK. Cependant, cette bande aurait dû être beaucoup plus intense que ce nous observons sur le gel. Habituellement, la technique de purification de protéines de fusion GST par la colonne d'affinité offre un rendement de protéines pures très élevé, de l'ordre de 2 mg/L de culture de *E.coli*. De toute évidence, nous n'avons pas obtenu ce rendement. La faible proportion de protéine récupérée pourrait être causée évidemment par la surexpression insuffisante, mais aussi par des facteurs externes qui auraient rendu la purification moins efficace. Comme la technique en soit a été effectuée avec précision, peut-être que la thrombine avait une activité trop faible ou que son temps d'incubation était trop court. Conséquemment, le total des protéines GlnK clivées serait plus faible. En effet, en plus de la bande de 12 kDa, nous observons à la figure 16 une bande faible de 38 kDa correspondant à GlnK-GST obtenue après la purification. Celle-ci a possiblement été récupérée dans l'éluat à cause de la pression

exercée par la seringue lors de l'élution des protéines GlnK de la colonne. Aussi, une température trop élevée entre les différentes manipulations aurait pu causer la dégradation de la protéine. Nous observons d'ailleurs cette dégradation sur la même figure, celle-ci étant représentée par de multiples bandes de tailles variées situées sous la bande de 12 kDa. Les manipulations concernant la purification pourraient donc être améliorées afin d'obtenir un rendement plus grand pour permettre la purification d'une plus grande quantité de protéines. Nous pourrions également construire un autre type de fusion tel que le His-tag pour tenter d'améliorer les résultats. Les bandes obtenues correspondant à GlnK après purification ont tout de même été découpées du gel et ont servi à l'immunisation des lapins.

Pour nous assurer de la spécificité des anticorps contenus dans le sérum de lapin, nous les avons préalablement testés sur l'éluat obtenu après la purification de GlnK. On peut voir à la figure 17 une tache de 12 kDa qui correspond à la détection de GlnK tandis qu'une autre à 38 kDa représente GlnK-GST qui n'a pas été clivée par la thrombine. Ces résultats indiquent que les anticorps sont spécifiques à GlnK. Nous ne savons pas s'ils le sont à GST seul car nous ne l'avons pas testé. Malgré leur spécificité envers GlnK, les anticorps n'ont pas permis la détection de cette protéine chez *R.capsulatus* alors que nous savons qu'elle est bien présente chez cet organisme. Ceci semble contradictoire mais nous avons une explication plausible. Il est important de constater que la protéine détectée lors du test était pure et avait préalablement été surexprimée et extraite à partir de 1 L de culture. Un très gros volume de celle-ci a également été soumis à l'électrophorèse donc transféré sur la membrane PVDF.

Pour notre expérience sur les souches de *R.capsulatus*, nous avons utilisé des fractions membranaires et cytoplasmiques qui provenaient de cultures de 250 ml dans lesquelles l'expression des protéines n'avait pas été induite. Le volume utilisé pour l'électrophorèse était également beaucoup plus faible que celui de la protéine pure. Alors, il n'est pas étonnant que les anticorps qui ont semblé spécifiques lors du test n'aient pas permis de détecter une concentration moindre de protéine GlnK extraite des cultures de *R.capsulatus*. Nous supposons alors que les anticorps que nous avons produits ne sont peut-être pas assez forts, abondants ou spécifiques pour la détection

de faibles quantités de protéines présentes sur une membrane d'immunobuvardage. Pour réaliser cette expérience, il faudrait en tout premier lieu de bons anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt. Nous pourrions également tenter d'augmenter la concentration de protéines dans le gel avec une précipitation au TCA et vérifier si la protéine est détectable dans les extraits bruts d'*E.coli* contenant le plasmide d'expression.

Lors d'expériences futures, il serait intéressant recommencer la construction de la souche *glnBY51F* et de refaire des tests de chromatographie. Ceci permettrait de vérifier si les résultats inattendus que nous avons obtenus proviennent d'une erreur de manipulation ou s'ils sont bel et bien véridiques. Ensuite, la production de nouveaux anticorps anti-GlnK pourrait être bénéfique pour réaliser l'expérience sur la séquestration membranaire de GlnK. Celle-ci devrait tenir compte des corrections que nous avons suggérées concernant la surexpression et la purification de la protéine.

CONCLUSION

Afin pouvoir étudier l'uridylation des protéines PII, nous avons changé l'acide aminé tyrosine en position 51 avec une phénylalanine. Les premiers résultats que nous avons obtenus montrent que l'uridylation de la protéine GlnK est essentielle pour réguler l'activité et la modification de la nitrogénase en présence d'azote chez *R.capsulatus*. Cependant, nous avons obtenu pour le mutant *glnBY51F* des résultats étonnants qui remettent en question ce qui est dit dans la littérature au sujet du rôle de GlnB chez *R.capsulatus*.

Pour démontrer la présence de GlnK au niveau de la membrane en présence d'azote, nous avons dû produire des anticorps qui lui étaient spécifiques. Malheureusement, même si ceux-ci semblaient spécifiques, ils n'ont pas permis la détection de GlnK au niveau de la fraction membranaire et même cytoplasmique. Donc, il serait primordial d'obtenir des anticorps efficaces pour réaliser cette expérience. Finalement, plusieurs recherches s'avèrent encore nécessaires afin de pouvoir déterminer le rôle précis des protéines PII et toutes les interactions protéine-protéine dans lesquelles elles sont impliquées.

BIBLIOGRAPHIE

Adler, SP., D. Purich et ER. Stadtman. 1975. *Cascade control of Escherichia coli glutamine synthetase : properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylylremoving enzyme.* J. Biol. Chem. 250: 6264-6272.

Atkinson, M. et AJ. Ninfa. 1998. *Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in Escherichia coli.* Mol. Microbiol. 29(2): 431-447.

Atkinson, M. et AJ. Ninfa. 1999. *Characterisation of the GlnK protein of Escherichia coli.* Mol. Microbiol. 32(2): 301-313.

Atkinson, M., ES. Kamberov, RL. Weiss et AJ. Ninfa. 1994. *Reversible uridylylation of the Escherichia coli PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcriptional factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC).* J. Biol. Chem. 269: 28288-28293.

Arcondeguy, T., WC. van Heeswijk et M. Merrick. 1999. *Studies on the role GlnK and GlnB in regulating Klebsiella pneumoniae NifL-dependent nitrogen control.* FEMS Microbiol. Lett. 180: 263-270.

Arcondeguy, T., R. Jack et M. Merrick. 2001. *P-II signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control [Review].* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65(1): 80-98.

Arp, DJ. 2000. *The nitrogen cycle.* P.1-14. In E.W. Triplett (eds.), *Prokaryotic Nitrogen Fixation : A Model System for Analysis of a Biological Process*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

Arsene, F., PA. Kaminski et C. Elmerich. 1996. *Modulation of NifA activity by PII in Azospirillum brasilens : Evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain.* J. Bacteriol. 178: 4830-4838.

Ausubel, FM., R. Brent, RE. Kingston, DD. Moore, JG. Seidman, A. Smith et K. Struhl. 1989. *Short protocols in molecular biology*. P.283. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Blatny, JM., T. Brautaset, HC. Winther-Larsen, K. Haugen et S. Valla. 1997. *Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 370-379.

Blauwkamp, TA. et AJ. Ninfa. 2002. *Physiological role of the GlnK signal transduction protein of Escherichia coli: survival of nitrogen starvation*. Mol. Microbiol. 46(1): 203-214.

Blauwkamp, TA. et AJ. Ninfa. 2003. *Antagonism of PII signalling by the AmtB protein of Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 48(4): 1017-1028.

Bowman, WC. et RG. Kranz. 1998. *A bacterial ATP-dependent, enhancer binding protein that activates the housekeeping RNA polymerase*. Genes Dev. 12: 1884-1893.

Carr, PD., E. Cheah, PM. Suffolk, SG. Vasudevan, NE. Dixon et DL. Ollis. 1996. *X-ray structure of the signal transduction protein PII from Escherichia coli at 1.9Å*. Acta Crystallogr. Sect. 52: 93-104.

Cheah, E., PD. Carr, PM. Suffolk, SG. Vasudevan, NE. Dixon et DL. Ollis. 1994. *Structure of the Escherichia coli signal transducing protein PII*. Structure. 2: 981-990.

Chisnell, JR., R. Premakumar et PE. Bishop. 1988. *Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain of Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 170 : 27-33.

Chiurazzi, M., R. Meza, M. Lara, A. Lahm, R. Defez, M. Iaccarino et G. Espin. 1992. *The Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli glnT gene, encoding glutamine synthetase III.* Gene. 1119: 1-8.

Coutts, G., G. Thomas, D. Blakey et M. Merrick. 2002. *Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB.* EMBO J. 21(4): 536-545.

Cullen, PJ., WC. Bowman, D. Foster-Hartnett, SC. Reilly et RG. Kranz. 1998. *Transcriptional activation by an NtrC enhancer-binding protein.* J. Mol. Biol. 278: 903-914.

Darrow, RA. et RR. Knotts. 1977. *Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 554-559.

Dean, DR., JT. Bolin et L. Zheng. 1993. *Nitrogenase metalloclusters : Structures, organization, and synthesis.* J. Bacteriol. 175: 6737-6744.

Dean, DR. et MR. Jacobson. 1992. *Biochemical genetics of nitrogenase.* P.763-834. In G. Stacey, R. H. Burris, H. J. Evans (eds.), Biological Nitrogen Fixation, Chapman and Hall, New York.

de Mel, VSJ., ES. Kamberov, PD. Martin, J. Zhang, AJ. Ninfa et BFP. Edwards. 1994. *Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from Escherichia coli.* J. Mol. Biol. 243: 796-798.

de Zamaroczy, M. 1998. *Structural homologues PII and Pz of Azospirillum brasilens provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions.* Mol. Microbiol. 29: 449-463.

Drepper, T., S. GroB, AF. Yakunin, PC. Hallenbeck, B. Masepohl et W. Klipp. 2003. *Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototropic bacterium Rhodobacter capsulatus.* Microbiology. 149: 2203-2210.

Drepper, T., S. GroB, B. Masepohl et W. Klipp. 2000. *Ammonium and molybdenum regulation of the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in Rhodobacter capsulatus.* P. 129. In F.O. Pedrosa, M. Hungria, G. Yates, and W. E. Newton (eds.), Nitrogen Fixation : From molecules to Crop Productivity, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

Eady, RR., RL. Robson, TH. Richardson, RW. Miller et M. Hawkins. 1987. *The vanadium nitrogenase of Azotobacter chroococcum. Purification and properties of the Vfe protein.* Biochem. J. 244: 197-207.

Engleman, E. et S. Francis.1978. *Cascade control of E.coli glutamine synthetase II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade.* Arch. Biochem. Biophys. 191: 602-612.

Foor, F., K. Janssen et B. Magasanik. 1975. *Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4844-4848.

Forchhammer, K. et N. Tandeau de Marsac. 1995. *Functional analysis of the phosphoprotein PII in the cyanobacterium Synechococcus sp. Strain PCC 7942.* J. Bacteriol. 177: 2033-2040.

Förster, B., K. Maner, F. Fassbinder et J. Oelze. 1999. *Reversible inactivation of nitrogenase in Rhodobacter capsulatus strain W1071 deleted in the draTG gene region.* FEMS Microbiol. Lett. 170: 167-171.

Foster-Hartnett D., PJ. Cullen, EM. Monika et RG. Kranz. 1994. *A new type of NtrC transcriptional activator.* J. Bacteriol. 176: 6175-6187.

Foster-Hartnett, D. et RG. Kranz. 1994. *The Rhodobacter capsulatus glnB gene is regulated by NtrC at tandem rpoN-independent promoters.* J. Bacteriol. 176(16): 5171-5176.

Fu, H., A. Hartman, R. Lowery, W. Fitzmaurice, G. Roberts, et R. Burris. 1989. *Postranslational regulatory system for nitrogenase activity in Azospirillum spp.* J. Bacteriol. 171: 4679-4685.

Gest, H., MD. Kamen et HM. Bregoff. 1950. *Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. V. Photoproduction of hydrogen and nitrogen fixation by Rhodospirillum rubrum.* J. Biol. Chem. 182: 153-170.

Gussin, GN., CW. Ronson et FM. Ausubel. 1986. *Regulation of nitrogen fixation genes.* Annu. Rev. Genet. 20: 567-591.

Hales, BJ., EE. Case, JE. Morningstar, MF. Dzeda et LA. Mauterer. 1986. *Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from Azotobacter vinelandii.* Biochemistry. 25: 7251-7255.

Hallenbeck, PC. 1992. *Mutations affecting nitrogenase switch-off in Rhodobacter capsulatus.* Biochim. Biophys. Acta 1118: 161-168.

He, L., E. Soupene, A. Ninfa et S. Kustu. 1998. *Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria : Relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions.* J. Bacteriol. 184(24) : 6661-6667.

Hill, R., J. Parker, H. Googman, D. Jones et D. Woods. 1989. *Molecular analysis of a novel glutamine synthetase of the anaerobe Bacteroides fragilis.* J. Gen. Microbiol. 135: 3271-3279.

Hübner, P., JC. Willison, PM. Vignais et TA. Bickle. 1991. *Expression of regulatory nif genes in Rhodobacter capsulatus.* J. Bacteriol. 173: 2993-2999.

Hübner, P., B. Masepohl, W. Klipp et TA. Bickle. 1993. *A nif gene expression studies in Rhodobacter capsulatus: NtrC-independent repression by high ammonium concentration.* Mol. Microbiol. 10: 123-132.

Jaggi, R., W. Ybarlucea, E. Cheah, PD. Carr, KJ. Edwards, D. Ollis et SG.Vasudevan. 1996. *The role of the T loop of the signal transducing protein PII from Escherichia coli.* FEBS Lett. 391: 223-228.

Javelle, A., E. Severi, J. Thornton et M. Merrick. 2004. *Ammonium sensing in Escherichia coli : Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation.* J. Biol. Chem. 279(10): 8530-8538.

Jiang, P, A. Peliska et AJ. Ninfa. 1998. *Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase / uridylyl-removing enzyme of Escherichia coli and its interactions with the PII protein.* Biochemistry. 37: 1278-12794.

Johansson, M. et S. Nordlund. 1997. *Uridylylation of the PII protein in the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum.* J. Bacteriol. 179(13): 4190-4194.

Jouanneau, Y., CM. Meyer et PM. Vignais. 1983. *Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion into an active and inactive form in Rhodospseudomonas capsulata.* Biochim. Biophys. Acta. 749: 318-328.

Klipp, W., T. Drepper, S. GroB, B. Masepohl, K. Raabe, KU. Riedel, AF. Yakunin et PC. Hallenbeck. 2000. *Genetics of nitrogen fixation in Rhodobacter capsulatus : Ammonium and molybdenum control of both nitrogenase systems.* P. 141-142. In F. O. Pedrosa, M. Hungria, G. Yates, and W. E. Newton (eds.), *Nitrogen Fixation : From molecules to Crop Productivity*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

Klipp, W., B. Masepohl et A. Pühler. 1988. *Identification and mapping of nitrogen fixation genes of Rhodobacter capsulatus : Duplication of a nifA-nifB region.* J. Bacteriol. 170: 693-699.

Kranz, RG. et D. Foster-Hartnett. 1990. *Transcriptional regulatory cascade of nitrogen-fixation genes in anoxygenic photosynthetic bacteria: Oxygen and nitrogen-responsive factors.* Mol. Microbiol. 4: 1793-1800.

Kranz, RG. et WC. Bowman. 1999. *Molecular biology and evolution of the Ntr system. Comparisons of phototrophs to other prokaryotes.* P. 501-508. In G.A. Peschek, W. Löffelhart, G. Schmetterer (eds.), *The phototropic prokaryotes*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Lowery, RG. et PW. Ludden. 1988. *Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum.* J. Biol. Chem. 263: 16714-16719.

Ludden, P. et G. Roberts. 1989. *Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP-ribosylation.* Curr. Top. Cell. Regul. 30: 23-56

Ludden, P., G. Roberts, R. Lowery, W. Fitzmaurice, L. Saari, L. Lehman, D. Lies, D. Woehle, H. Wirt, S. Murrel, M. Pope, et R. Kanemoto. 1988. *Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase.* P.

157-162. In H. Bothe, F. J. de Bruijn, and W. E. Newton (eds.), *Nitrogen fixation : Hundred years after*. Gustav Fisher, New York.

Martin, DE. et B. Reinhold-Hurek. 2002. *Distinct roles of the PII-like signal transmitter proteins and amtB in regulation of nif gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in Azoarcus sp. Strain BH72.* J. Bacteriol. 184(8): 2251-2259.

Masepohl, B., T. Drepper, A. Paschen, S. GroB, A. Pawlowski, K. Raabe, K. Riedel et W. Klipp. 2002. *Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium Rhodobacter capsulatus.* J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4(3): 243-248.

Masepohl, B., W. Klipp et A. Pühler. 1988. *Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated niA/nifB gene region of Rhodobacter capsulatus.* Mol. Gen. Genet. 212: 27-37.

Masepohl, B., R. Krey et W. Klipp. 1993. *The draTG gene region of Rhodobacter capsulatus is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase.* J. Gen. Microbiol. 139: 2667-2675.

Masepohl, B. et W. Klipp. 1996. *Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in Rhodobacter capsulatus.* Arch. Microbiol. 165: 80-90.

Martin, DE. et B. Reinhold-Hurek. 2002. *Distinct roles of PII-like signal transmitter proteins and amtB in regulation of nif gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in Azoarcus sp. BH72.* J. Bacteriol. 184: 2251-2259.

Merrick, M., et RA. Edwards. 1995. *Nitrogen control in bacteria.* Microbiological Reviews. 59(4): 604-622.

Michel-Reydellet, N. et PA Kaminski. 1999. *Azorhizobium caulinodans PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation.* J. Bacteriol. 181: 2655-2658.

Ninfa, AJ. et MR. Atkinson. 2000. *PII signal transduction proteins.* Trends Microbiol. 8: 172-179.

Paschen A., T. Drepper, B. Masepohl et W. Klipp. 2001. *Rhodobacter capsulatus nifA mutants mediating nif gene expression in the presence of ammonium.* FEMS Microbiol. Lett. 200: 207-213.

Pawlowski A., K. Riedel, W. Klipp, P. Dreidkemper, S. GroB, H. Bierhoff, T. Drepper et B. Masepohl. 2003. *Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium Rhodobacter capsulatus.* J. Bacteriol. 185(17): 5240-5247.

Pelmont, J. 1993. *Bactéries et environnement : Adaptations physiologiques,* Chapitres 20-21-23. Collection Grenoble Sciences, Presses Universitaires de Grenoble.

Pierrard, J., PW. Ludden et GP. Roberts. 1993. *Post-translational of nitrogenase in Rhodobacter capsulatus : Existence of two independent regulatory effects of ammonium.* J. Bacteriol. 175: 1358-1366.

Rapp, BJ., DC. Landrum et JD. Wall. 1986. *Methylammonium uptake by Rhodobacter capsulatus.* Arch. Microbiol. 146: 134-141.

Rudnick P., D. Meletzus et A. Green. 1997. *Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria.* Soil Biol. Biochem. 29(5/6): 831-841.

Saari, LL., E. Triplett et PW. Ludden. 1984. *Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum.* J. Biol. Chem. 259: 15502-15508.

Schneider, K., A. Muller, U. Schramm et W. Klipp. 1991. *Demonstration of a molybdenum and vanadium independent nitrogenase in a nifHDK deletion mutant of Rhodobacter capsulatus.* Eur. J. Biochem. 195: 653-661.

Schweizer, HP.1993. *Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis.* Biotechniques. 15: 831-834.

Shah, VK., G. Stacey et WJ. Brill. 1977. *Isolation of an iron-molybdenum cofactor (FeMo-co) from nitrogenase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 3249-3253.

Shapiro, BM. 1969. *The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from Escherichia coli : resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements.* Biochemistry. 8: 659-670.

Smith, DE. et KS. Johnson. 1988. *Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase.* Gene. 67: 31-44.

Simon, R., U. Priefer et A. Pühler. 1983. *A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria.* Biotechnology. 1: 784-791.

Son, HS. et RH. Burris. 1987. *Cascade control of Escherichia coli glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene.* J. Biol. Chem. 262: 8690-8695.

Soupe, E., H. Lee et S. Kustu. 2002. *Ammonium/methylammonium transport (Amt) proteins facilitate diffusion of NH₃ bidirectionally.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 3925-3931.

Thomas, G., G. Coutts et M. Merrick. 2000. *The glnKamtB operon : a conserved gene pair in prokaryotes.* Trends Genet. 16(1): 11-14.

Thomas, G., JGL. Mullins et M. Merrick. 2000. *Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters.* Mol. Microbiol.. 37(2): 331-344.

Thomson, JM. et WA. Parrott. 1998. *pMECA : A sized-based. Blue/white selection multiple common and rare-cutter general cloning and transcription vector.* Biotechniques. 24: 922-927.

Van Heeswijk, WC., S. Hoving, D. Molenaar, B. Stegeman, D. Kahn et HV. Westerhoff. 1996. *An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli.* Mol. Microbiol. 21: 133-146.

Vasudevan SG., C. Gedye et NE. Dixon. 1994. *Escherichia coli PII protein : purification, crystallisation and oligomeric structure.* FEBS letters. 337: 255-258.

Walker, JE., M. Saraste, MJ. Runswick et N. Gay. 1982. *Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.* EMBO. 1: 946-951.

Yakunin, AF., AS. Fedorov, TV. Laurinavichene, VM. Glaser, NS. Egorov, AA. Tsygankov, VV. Zinchenko et PC. Hallenbeck. 2001. *Regulation of nitrogenase in the photosynthetic bacterium Rhodobacter sphaeroides containing draTG and nifHDK genes from Rhodobacter capsulatus.* Can. J. Microbiol. 47(3): 206-12.

Yakunin, AF. et PC. Hallenbeck. 1998. *Short-term regulation of nitrogenase activity by NH_4^+ in Rhodobacter capsulatus-multiple in vivo nitrogenase responses to NH_4^+ addition.* J. Bacteriol. 180(23): 6392-6395.

Yakunin, AF. et PC. Hallenbeck. 2002 *AmtB is necessary for NH_4^+ - induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in Rhodobacter capsulatus.* J. Bacteriol. 184(15) : 4081-4088.

Yakunin, AF., TV. Laurinavichene, AA. Tsygankov et PC. Hallenbeck. 1999. *The presence of ADP-ribosylated Fe protein of nitrogenase in Rhodobacter capsulatus is correlated with cellular nitrogen status.* J. Bacteriol. 181(7): 1994-2000.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira et J. Messing. 1985. *Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.* Gene. 33: 103-119.

Yen, HC. et B. Marrs. 1976. *Map of the genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in Rhodospseudomonas capsulata.* J. Bacteriol. 126: 619-629.

Zhang YP., EL. Pohlmann, PW. Ludden et GP. Roberts. 2000. *Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum.* J. Bacteriol. 182 : 983-992.

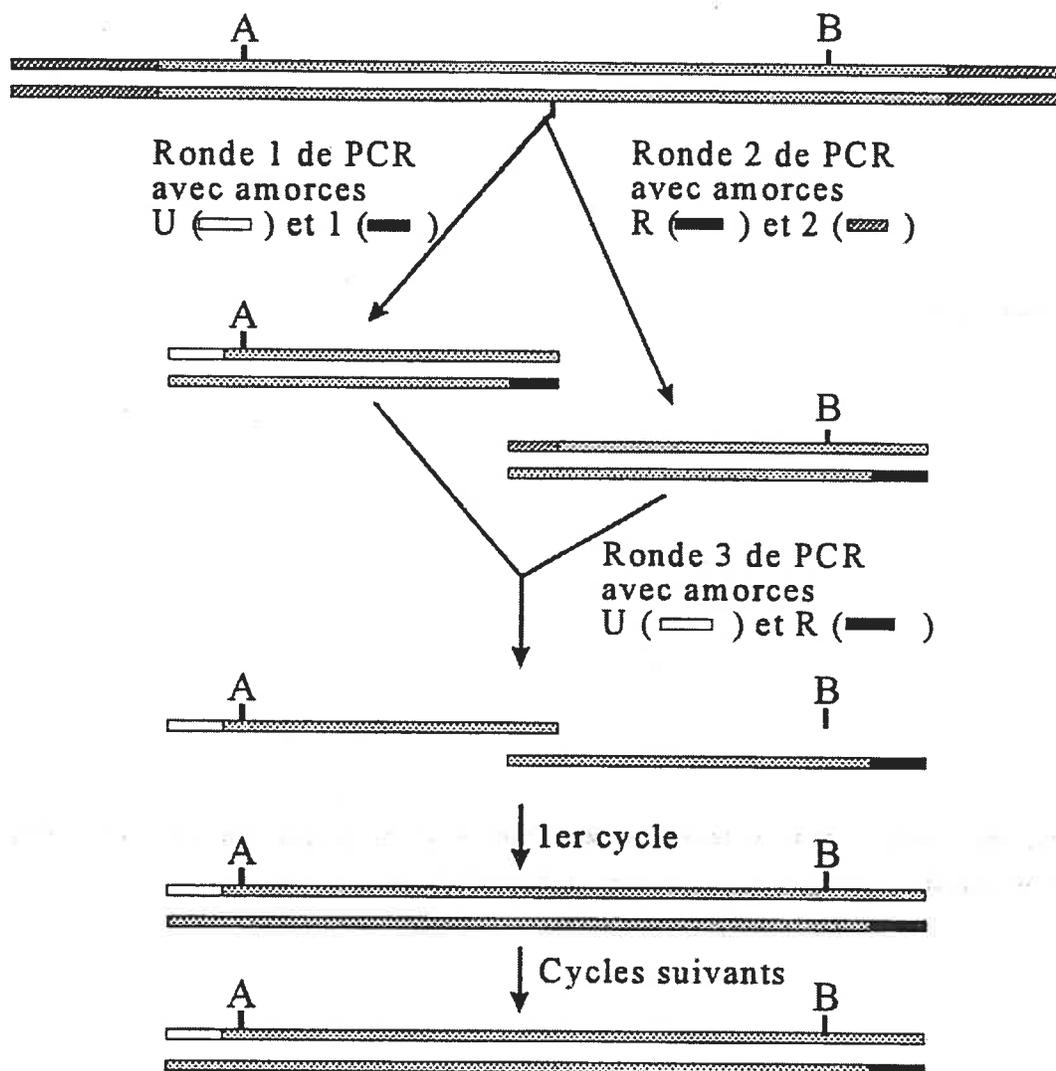
Zhang, YP., EL. Pohlmann, CM. Halbleib, PW. Ludden et GP. Roberts. 2001. *Effect of PII and its homolog GlnK on reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase by heterologous expression of the Rhodospirillum rubrum dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase-dinitrogenase reductase –activating glycohydrolase regulatory system in Klebsiella pneumonia.* J. Bacteriol. 183(5): 1610-1620.

Zhang YP., EL. Pohlmann, PW. Ludden et GP. Roberts 2001. *Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum: Roles in sensing ammonium and energy status.* J. Bacteriol. 183(21): 6159-6168.

Zinchenko, V., Y. Churin, V. Shestopalov et S. Shestakov. 1994. *Nucleotide sequence and characterization of Rhodobacter sphaeroides glnB and glnA genes.* Microbiology. 140: 2143-2151.

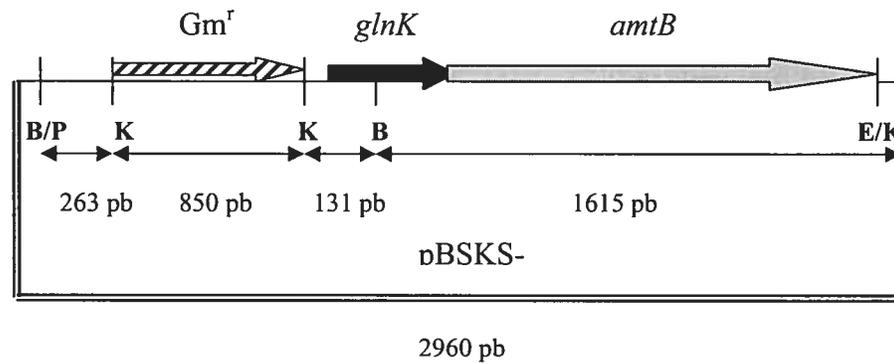
ANNEXE I

Schéma illustrant la technique de mutagenèse dirigée par PCR utilisée pour créer les gènes mutants *glnKY51F* et *glnBY51F*.



ANNEXE II

Carte de restriction du plasmide pBSKABGM. On y retrouve la cassette de résistance à la gentamicine, le gène *glnK* délété et le gène *amtB* clonés dans le vecteur pBSKS-.

**Légende :**

Flèche achurée : Cassette de résistance à la gentamicine de 850 pb

Flèche noire : Gène *glnK* délété au niveau de 264 pb

Flèche grise : Gène *amtB*

Ligne double : Plasmide pBSKS- de 2960 pb

B : *Bam*HI (site ayant servi à lier les 2 segments de *glnK* et présent dans pBSKS-)

P : *Pst*I (site ayant servi à cloner Δ *glnKamtB* dans le SCM de pBSKS-)

K : *Kpn*I (site présent aux extrémités de la cassette de résistance et dans pBSKS-)

E : *Eco*RI (site ayant servi à cloner Δ *glnKamtB* dans le SCM de pBSKS-)

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu mon directeur de recherche, Dr. Patrick C. Hallenbeck, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et supervisé tout au long de ma maîtrise.

Je tiens également à remercier mes partenaires de travail : Jonathan Turcot, Ariane Bisailon et Pierre-Luc Tremblay pour avoir créé une ambiance de travail agréable dans le laboratoire.

Un gros merci à mes parents Lorraine et Réjean ainsi qu'à mon copain Patrick pour les encouragements et le support moral qu'ils m'ont donné pendant ces deux années.