

Université de Montréal

**Rôle de l'AmtB dans la régulation de la nitrogénase et la production
d'hydrogène chez la bactérie *Rhodobacter capsulatus*.**

Par :

Narimane Boukharouba

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine pour l'obtention d'une maîtrise en microbiologie
et immunologie.

Décembre 2013

Narimane Boukharouba, 2013

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Mémoire intitulé :

Rôle de l'AmtB dans la régulation de la nitrogénase et la production d'hydrogène chez la bactérie *Rhodobacter capsulatus*.

Présenté par : Narimane Boukharouba

Travail évalué par le jury suivant :

George Szatmari, président rapporteur.

France Daigle, membre du jury.

Patrick C. Hallenbeck, directeur de recherche.

Résumé :

L'azote est l'élément le plus abondant dans l'atmosphère terrestre avec un pourcentage atteignant 78 %. Composant essentiel pour la biosynthèse des matériels organiques cellulaires, il est inutilisable sous sa forme diatomique (N_2) très stable par la plupart des organismes. Seules les bactéries dites diazotrophiques comme *Rhodobacter capsulatus* sont capables de fixer l'azote moléculaire N_2 par le biais de la synthèse d'une enzyme, la nitrogénase. Cette dernière catalyse la réduction du N_2 en ammonium (NH_4) qui peut alors être assimilé par d'autres organismes. La synthèse et l'activité de la nitrogénase consomment beaucoup d'énergie ce qui implique une régulation rigoureuse et son inhibition tant qu'une quantité suffisante d'ammonium est disponible. Parmi les protéines impliquées dans cette régulation, la protéine d'intérêt AmtB est un transporteur membranaire responsable de la perception et le transport de l'ammonium. Chez *R. capsulatus*, il a été démontré que suite à l'addition de l'ammonium, l'AmtB inhibe de façon réversible (*switch off/switch on*) l'activité de la nitrogénase en séquestrant la protéine PII GlnK accompagnée de l'ajout d'un groupement ADP ribose sur la sous unités Fe de l'enzyme par DraT. De plus, la formation de ce complexe à lui seul ne serait pas suffisant pour cette inactivation, ce qui suggère la séquestration d'une troisième protéine, DraG, afin d'inhiber son action qui consiste à enlever l'ADP ribose de la nitrogénase et donc sa réactivation.

Afin de mieux comprendre le fonctionnement de l'AmtB dans la régulation et le transport de l'ammonium à un niveau moléculaire et par la même occasion la fixation de l'azote, le premier volet de ce mémoire a été d'introduire une mutation ponctuelle par mutagenèse dirigée au niveau du résidu conservé W237 de l'AmtB.

La production d'hydrogène est un autre aspect longtemps étudié chez *R. capsulatus*. Cette bactérie est capable de produire de l'hydrogène à partir de composés organiques par photofermentation suite à l'intervention exclusive de la nitrogénase. Plusieurs études ont été entreprises afin d'améliorer la production d'hydrogène. Certaines d'entre elles se sont intéressées à déterminer les conditions optimales qui confèrent une production maximale de gaz tandis que d'autres s'intéressent au fonctionnement de la bactérie elle-même. Ainsi, le fait que la bioproduction de H_2 par fermentation soit catalysée par la nitrogénase cela implique la régulation de l'activité de cette dernière par différents mécanismes dont le *switch off* par ADP ribosylation de l'enzyme. De ce fait, un mutant de *R. capsulatus* dépourvu d'AmtB (DG9) a

été étudié dans la deuxième partie de cette thèse en termes d'activité de la nitrogénase, de sa modification par ADP ribosylation avec la détection des deux protéines GlnK et DraG qui interviennent dans cette régulation pour connaître l'influence de différents acides aminés sur la régulation de la nitrogénase et pour l'utilisation future de cette souche dans la production d'H₂ car *R. capsulatus* produit de l'hydrogène par photofermentation grâce à cette enzyme. Les résultats obtenus ont révélé une activité de la nitrogénase continue et ininterrompue lorsque l'AmtB est absent avec une activité maximale quand la proline est utilisée comme source d'azote durant la culture bactérienne ce qui implique donc que l'abolition de l'activité de cette protéine entraîne une production continue d'H₂ chez *R. capsulatus* lorsque la proline est utilisée comme source d'azote lors de la culture bactérienne. Par ailleurs, avec des Western blots on a pu déterminer l'absence de régulation par ADP ribosylation ainsi que les expressions respectives de GlnK et DraG inchangées entre *R. capsulatus* sauvage et muté.

En conclusion, la nitrogénase n'est pas modifiée et inhibée lorsque l'*amtB* est muté ce qui fait de la souche *R. capsulatus* DG9 un candidat idéal pour la production de biohydrogène en particulier lorsque du glucose et de la proline sont respectivement utilisés comme source de carbone et d'azote pour la croissance.

Mots clés : AmtB, ADP ribosylation, nitrogénase, fixation d'azote, production d'hydrogène.

Abstract:

Nitrogen is the most abundant element in the Earth's atmosphere with a percentage of 78 %. This element is essential for the biosynthesis of cellular organic material and is unusable in its stable diatomic form (N_2) by most organisms. Only bacteria called diazotrophs such as *Rhodobacter capsulatus* are able to fix molecular nitrogen N_2 through the synthesis of the nitrogenase enzyme. The latter catalyzes the reduction of N_2 to NH_4 which can then be absorbed by other organisms. The synthesis and activity of nitrogenase consumes a lot of energy and therefore implies a strict regulation and its inhibition when a sufficient amount of ammonium is available. Among the proteins involved in this regulation, is the membrane transporter AmtB which is responsible for the sensing and transportation of ammonia. In *R. capsulatus*, it was shown that following the addition of ammonium, AmtB reversibly inhibits (*switch off / switch on*) nitrogenase activity by sequestering the PII protein GlnK accompanied by the addition of an ADP ribose group onto the Fe subunit of the enzyme by DraT. In addition, the formation of this complex alone would not be sufficient for this inactivation, suggesting the sequestration of a third protein, DraG is required to inhibit its action of removing the ADP ribose from the nitrogenase and therefore its reactivation.

To better understand the role of the AmtB in the fixation of nitrogen, regulation and transport of ammonium at the molecular level, the first part of this study was to introduce a point mutation by directed mutagenesis in the conserved residue W237 of AmtB .

Hydrogen production is another property of *R. capsulatus* that has been studied for a long time. This bacterium is capable of producing hydrogen from organic compounds following photofermentation and the exclusive enzymatic intervention of nitrogenase. Several studies have been undertaken to improve the production of hydrogen. Some of them were involved in determining the optimum conditions that give maximum gas production while others were interested in improving the growth of the bacterium itself. Thus, since the bio-production of H_2 by fermentation is catalyzed by the nitrogenase, it is important to study the regulation of the activity of this enzyme by different mechanisms such as the *switch off* by ADP ribosylation. Therefore, a mutant of *R. capsulatus* (DG9) lacking AmtB was studied in the second part of this thesis for its nitrogenase activity, its modification by GlnK-DraG, and to see the effects of different amino acids used in the growth medium on the regulation and therefore the future use of this strain for the production of H_2 . The results showed a

continuous and uninterrupted activity of the nitrogenase when AmtB was absent with a maximum activity when proline was used as a nitrogen source for bacterial growth. In addition, Western blots were used to demonstrate the effect of ADP ribosylation on regulation and that the expression of GlnK and DraG were unchanged between the wild –type and mutant *R. capsulatus*.

In conclusion, nitrogenase is not modified or inhibited when mutated *amtB* what makes the *R. capsulatus* strain DG9 an ideal candidate for biohydrogen production especially when glucose and proline are respectively used as source carbon and nitrogen for growth.

Keywords : AmtB , ADP ribosylation, nitrogenase , nitrogen fixation, hydrogen production.

Table des matières :

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiv
Chapitre I : Revue de littérature	1
1. Introduction	2
2. Étude de la régulation de la nitrogénase chez <i>Rhodobacter capsulatus</i>	3
2. 1. Assimilation de l'azote	3
2. 2. La fixation de l'azote	4
2. 3. La nitrogénase	5
2. 4. <i>Rhodobacter capsulatus</i>	6
2. 5. Principaux gènes et protéines de la fixation d'azote et sa régulation	7
2. 5. 1. Gènes de la fixation d'azote	7
2. 5. 2. Protéines de la fixation de l'azote	7
2. 5. 2. 1. Système Ntr : NtrB/NtrC	8
2. 5. 2. 2. L'AmtB	9
2. 6. Les protéines PII : GlnK, GlnB, GlnD	11
2. 7. Régulation de la fixation de l'azote	14
2. 7. 1. Régulation transcriptionnelle de la fixation de N ₂	14
2. 7. 1.1. Régulation par le système NtrB/NtrC	14
2. 7. 1. 2. Contrôle de l'activité de NifA/AnfA	14
2. 7. 2. Régulation post traductionnelle de la fixation de N ₂	15
3. Production de biohydrogène chez <i>R. capsulatus</i>	17
3. 1. Les hydrogénases	18

3. 1. 1. Les [Fe- Fe] hydrogénases	18
3. 1. 2. Les [Ni- Fe] hydrogénases	19
3. 2. Processus de production de biohydrogène	20
3. 2. 1. Production d'H ₂ photobiologique oxygénique	21
3. 2. 1. 1. La biophotolyse directe	21
3. 2. 1. 2. La biophotolyse indirecte	22
3. 2. 2. Production d'H ₂ photobiologique anoxygénique ou photofermentation	23
3. 2. 3. La bio production de H ₂ par fermentation à la noirceur	24
4. Description du projet de recherche	29
Chapitre II : Matériels et méthodes	31
1. Souches bactériennes et plasmides	31
2. Culture bactérienne	31
3. Plasmide extraction (Miniprep)	33
4. Mutagénèse dirigée par PCR	33
5. Digestions	35
6. Migration et extraction de l'ADN à partir du gel d'électrophorèse	35
7. Phosphorylation des extrémités 3' et 5' du plasmide pAY98	36
8. Ligation	36
9. Séquencage	37
10. Préparation des cellules compétentes	37
11. Transformation	37
12. Clonage de <i>RcamtBW237F</i> dans pJB3Tc20	
13. Conjugaison	38
14. Dosage de l'activité de la nitrogénase <i>switch on/off</i>	38
15. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	39

16. Migration sur gel de polyacrylamide SDS-Page et transfert sur PVDF	39
17. Western blot	40
17. 1. Transfert sur la membrane	40
17. 2. Hybridation des anticorps primaires et secondaires	40
18. Étude de l'effet de NH ₄ sur l'activité de la glutamine synthétase (GS)	41
Chapitre III : Résultats	43
1. Étude du rôle de la protéine AmtB dans la régulation de l'activité de la nitrogénase chez <i>R. capsulatus</i> :	
1. 1. Création de mutants d'AmtB par mutagenèse dirigée	43
1. 2. Étude de la régulation de l'activité de la nitrogénase chez les souches de <i>R. capsulatus</i> DG9 et JP91	46
1. 3. Modification de la protéine Fe par ADP ribosylation	49
1. 4. Détection de la protéine PII (GlnK) chez <i>R. capsulatus</i> JP91	50
1. 5. Détection de la protéine DraG chez <i>R. capsulatus</i> JP91 et DG9	51
Chapitre VI : Discussion	53
Conclusion	59
Chapitre V : Références bibliographiques	60

Liste des tableaux:

Tableau I : Avantages et inconvénients des voies métaboliques de production d'hydrogène indépendants de la lumière	27
Tableau II : Avantages et inconvénients des voies métaboliques de production d'hydrogène dépendants de la lumière	28
Tableau III : Caractéristiques des souches bactériennes et plasmides utilisés	31

Liste des figures :

Figure 1 : Les deux voies d'assimilations de l'azote : GS/GOGAT et GDH	3
Figure 2 : Le cycle de l'azote	4
Figure 3 : Structure de la nitrogénase	5
Figure 4 : Mécanisme d'action de la nitrogénase	6
Figure 5 : Structure du trimère AmtB avec deux monomères colorés en violet et bleu et un autre représenté en rubans	9
Figure 6 : Représentation en 3 dimensions d'un monomère d'AmtB montrant des résidus impliqués dans le transfert d'ammonium	10
Figure 7 : Structure du trimère GlnB	12
Figure 8 : (a) La protéine PII : GlnK (b) Illustration du blocage du canal AmtB par la boucle T de GlnK chez <i>Escherichia coli</i>	13
Figure 9 : Régulation de la fixation de l'azote par le système Ntr	15
Figure 10: Régulation post traductionnelle par ADP ribosylation	16
Figure 11: Régulation post traductionnelle sans ADP ribosylation	17
Figure 12 : Structure de la [Fe] hydrogénase de <i>Desulfovibrio</i>	19
Figure 13 : Structure de la [Ni-Fe] hydrogénase de <i>Desulfovibrio</i>	19
Figure 14 : Représentation schématiques de la biophotolyse directe	21
Figure 15: Représentation schématique de la biophotolyse indirecte	23
Figure 16: Représentation schématique de la photofermentation	24
Figure 17: Fermentation à la noirceur	24
Figure 18 : Représentation schématique de la fermentation du glucose et le métabolisme du pyruvate chez les Entérobactéries	25
Figure 19: Schéma de la production d'hydrogène par fermentation chez <i>Clostridium</i>	26
Figure 20: Produit de PCR digéré par DpnI dans un gel d'agarose de 0.7%	43

Figure 21: Double digestion du plasmide pAY98 avec EcoRI et PstI	44
Figure 22: Vecteur pJB3Tc20 digéré par les enzymes de restriction EcoRI et PstI dans un gel d'agarose à 0.7%	45
Figure 23: Effet de l'addition d'ammonium in vivo sur l'activité de la nitrogénase (réduction de C ₂ H ₂) chez <i>R. capsulatus</i> JP91 (type sauvage)	47
Figure 24: Effet de l'addition d'ammonium in vivo sur l'activité de la nitrogénase (réduction de C ₂ H ₂) chez <i>R. capsulatus</i> DG9	47
Figure 25: Activité de la nitrogénase (réduction de C ₂ H ₂) chez <i>Rhodobacter capsulatus</i> JP91 & DG9 cultivées sur différents acides aminés (Barres d'erreur affichées pour la série de graphique sélectionnée avec la valeur d'erreur de 5%)	48
Figure 26: Western Blot pour l'ADP-ribosylation de la Nitrogenase Fe	49
Figure 27: Western Blot pour la détection de la protéine GlnK produite sous différentes conditions de culture des souches JP91 et DG9 de <i>R. capsulatus</i>	50
Figure 28: Western Blot pour la détection de la protéine DraG produite sous différentes conditions de culture des souches JP91 et DG9 de <i>R. capsulatus</i>	51

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucélique.

ADP : Adénosine diphosphate.

ATase : Adénylyltransférase.

ATP : Adenosine triphosphate.

BSA : Sérum albumin bovin.

°C : Degrés Celcius.

CaCl₂ : Chlorure de calcium.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

C₂H₂: Acétylène.

C₂H₄ : Ethylène.

DO : Densité optique.

dNTP : Désoxyribonucléosides triphosphate.

EDTA :Ethylène diamine tetra acétique acide.

F: Phénylalanine.

Fe: Fer.

FeSO₄: Sulfate ferreux.

FdxN: Férredoxine.

g: gramme.

xg : Force de gravité.

GDH : Glutamate déshydrogénase.

Gln : Glutamine.

Glu : Glutamate.

GOGAT: Glutamate synthase.

GS: Glutamine synthétase.

H⁺: Proton.

H₂ : Hydrogène.

HCl: Acide chlorhydrique.

Kb: Kilobase.

kDa: KiloDalton.

L : Litre.

LB: Luria Bertani.

M: Molaire.

ml : millilitre.

mM : milli Molaire.

Mb : Méga base.

MgCl₂ : Chlorure de magnésium.

MgSO₄ : Sulfate de magnésium.

Mob : Mobilisation.

N₂ : Azote.

NaCl: Chlorure de sodium.

NaOH: Hydroxyde de sodium.

NH₃ : Ammoniaque.

NH₄⁺: Ammonium.

NH₄Cl: Chlorure d'ammonium.

(NH₄)₂SO₄⁺: Sulfate d'ammonium.

nm: Nano mètre.

NO₂⁻: Nitrite.

NO₃⁻: Nitrate.

O: Oxygène.

P: Phosphate.

PAGE : Gel d'électrophorèse de polyacrylamide.

PCR : Réaction en chaîne de polymérase.

PVDF : Polyvinyle difluoride.

SDS : Sodium dodécyl sulfate.

TAE: Tampon tris-acetate EDTA.

TBS: Tris buffered saline.

TBST: Tampon tris *buffer* tween.

TEG: Tris-Cl EDTA glucose

Tra: Transfert.

UMP: Uracile monophosphate.

UR: Uridyl *removing*.

UTase: Uridyltransférase.

V: Volt.

W: Tryptophane.

YPS: Yeast peptone salts.

Remerciements:

Je tiens tout d'abord à remercier Professeur **Patrick C. Hallenbeck** de m'avoir accordé l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire afin d'effectuer mon projet de maîtrise. Je le remercie également pour ses précieux conseils, sa patience et son soutien au cours de ces deux années.

Un grand merci à mes proches et ami(e)s, en particulier à mes parents **Said** et **Nadia** ainsi que mes frères **Mehdi** et **Yacine** pour m'avoir encouragée et soutenue toute ma vie afin d'atteindre mes objectifs.

Je remercie mes collègues de laboratoire : **Zahra, Mona, Ahmed, Dips, Gustavo, Yuan, Kiran** et **Hannah** pour leur sympathie et leur aide, en particulier Dips de qui j'ai beaucoup appris.

Enfin, je tiens à exprimer mon respect et mes remerciements aux membres du jury **Dr George Szatmari** et **Dr France Daigle** qui ont accepté d'évaluer mon mémoire.

Chapitre I : Revue de littérature

1. Introduction :

La régulation de la fixation de l'azote et la production de biohydrogène sont des sujets de recherche qui font l'objet de beaucoup d'études jusqu'à ce jour.

D'une part, différents aspects des voies métaboliques majeures ont été étudiés chez les bactéries photosynthétiques en particulier chez la bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodobacter capsulatus* qui représente l'organisme de choix dans ces investigations.

D'autre part, il a été démontré qu'il existe un lien direct entre la photoproduction d'hydrogène (H₂) et la nitrogénase chez *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* et d'autres bactéries photosynthétiques.

Ceci ajouté aux pressions économiques croissantes pour trouver des alternatives aux hydrocarbures incitent les chercheurs à étudier d'avantage ces deux phénomènes chez la bactérie photosynthétique *R. capsulatus*.

2. Étude de la régulation de la nitrogénase chez *Rhodobacter capsulatus* :

2. 1. Assimilation de l'azote:

C'est le processus par lequel toute source d'azote inorganique est incorporée dans le matériel cellulaire. Pour cela, cette source doit nécessairement être convertie en ammonium (NH_4^+) pour pouvoir être assimilée. L'azote moléculaire (N_2) est réduit en NH_4^+ par la fixation de l'azote (Moréno Vivian et al., 2011).

Deux voies permettent l'assimilation de l'azote : la voie principale GS/GOGAT (glutamine synthétase /glutamate synthase) et la voie GDH (glutamate déhydrogénase). Dans la première voie, GS catalyse l'amination du glutamate (Glu) en glutamine (Gln). Ensuite, la GOGAT transfère le groupe amino de la glutamine au 2 oxoglutarate (2 ox ou kétoglutarate) produisant deux glutamines. La voie alternative GDH produit de la glutamine à partir de NH_3 et 2 oxoglutarate (voir Figure 1). Elle n'est favorisée que lorsque la GOGAT est inactive (Helling., 1994 et 1998).

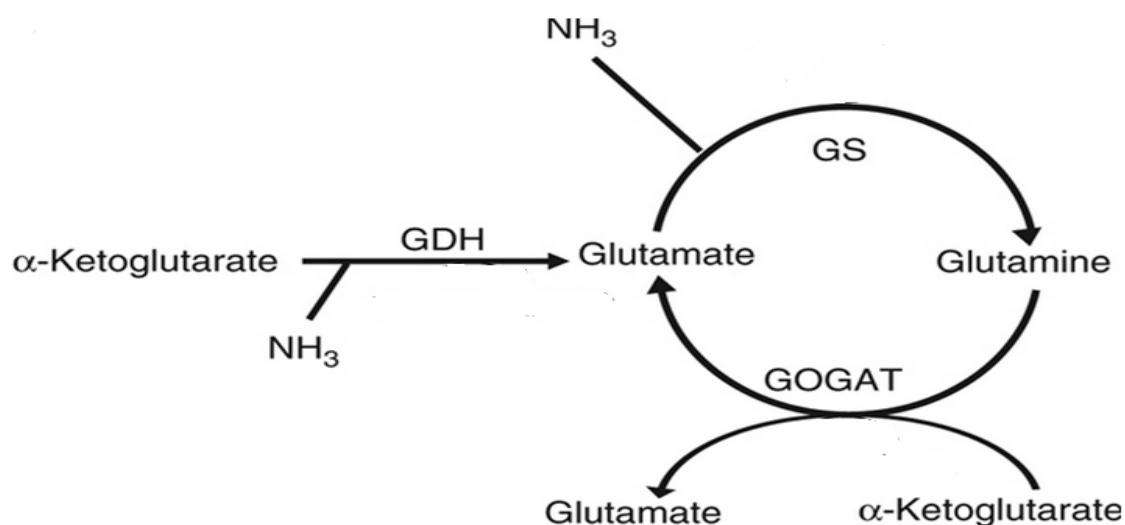
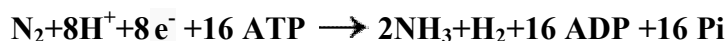


Figure 1 : Les deux voies d'assimilations de l'azote : GS/GOGAT et GDH (Figure adaptée de Yuan et al., 2009).

2. 2. La fixation de l'azote :

La fixation de l'azote moléculaire a été découverte par Beijerinck en 1901. Effectuée par un groupe spécialisé de procaryotes (Dixon et al., 2004), ce phénomène a largement été étudié notamment chez les bactéries pourpres non sulfureuses. C'est un processus essentiel à la vie sur terre car même si l'atmosphère terrestre est très riche en azote sous sa forme diatomique (Cheng., 2008), ce dernier ne peut être utilisé que s'il est fixé. En effet, l'ammonium est la source d'azote inorganique préférée chez les microorganismes (Masepohl et Hallenbeck., 2010).

Les diazotrophes, les seuls microorganismes capables de fixer le diazote, possèdent une enzyme hautement conservée : la nitrogénase. Elle catalyse la réduction de l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium (NH_3/NH_4) (Masepohl et Hallenbeck., 2010; Tremblay et Hallenbeck., 2007).



Le N_2 fixé est incorporé dans les molécules organiques essentielles des plantes suite à l'assimilation de l'azote fixé qui passe ensuite chez les animaux. Enfin, l'azote est libéré sous forme de N_2 pour alimenter l'atmosphère. Cette chaîne recommence pour constituer le cycle de l'azote (voir Figure 2).

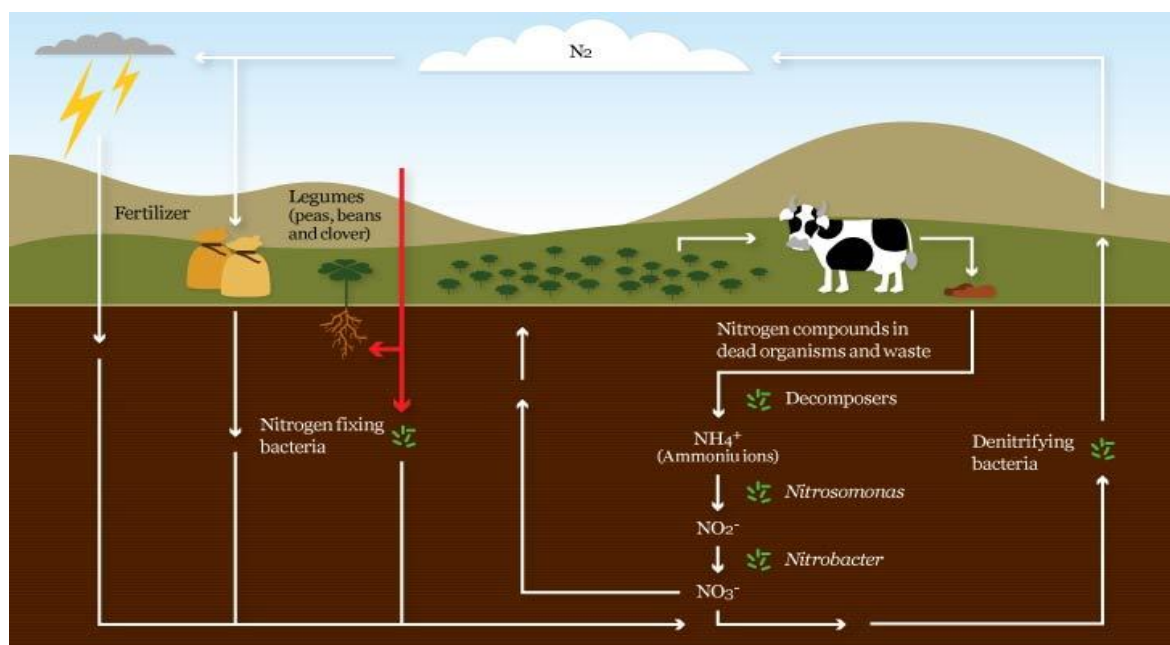


Figure 2 : Le cycle de l'azote (Figure tirée de <http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/microbes-and-the-outdoors/nitrogen-cycle>).

2. 3. La nitrogénase :

Enzyme hautement conservée et synthétisée par tous les diazotrophes (Masepohl et Hallenbeck., 2010), elle est responsable de la conversion de N_2 en NH_3 . Cette réduction consomme une grande quantité d'énergie : chaque mole de N_2 nécessite l'hydrolyse de 20 à 30 moles de MgATP et le transfert de 8 moles d'électrons (Tremblay et al., 2007). La nitrogénase constitue un complexe enzymatique composé de deux métalloprotéines : la protéine MoFe (dinitrogénase ou NifDK) et la protéine Fe (dinitrogénase réductase ou NifH) (Tremblay et al., 2007; Moure et al., 2012). La protéine MoFe est codée par les gènes *nifD* et *nifK*. C'est un tétramère $\alpha_2 \beta_2$ de 240 kDa avec deux facteurs fer-molybdène (FeMoco). Elle contient le site actif de fixation et réduction de la nitrogénase. La protéine Fe codée par *nifH* constitue un homodimère de 64 kDa dont chaque unité est liée par un pont formé par une région [4Fe-S4] (voir Figure 3). Son rôle est de transférer à la dinitrogénase les électrons nécessaires à la réduction de N_2 en NH_4^+ (voir Figure 4) (Schuddekopf., 1993; Moure et al., 2012).

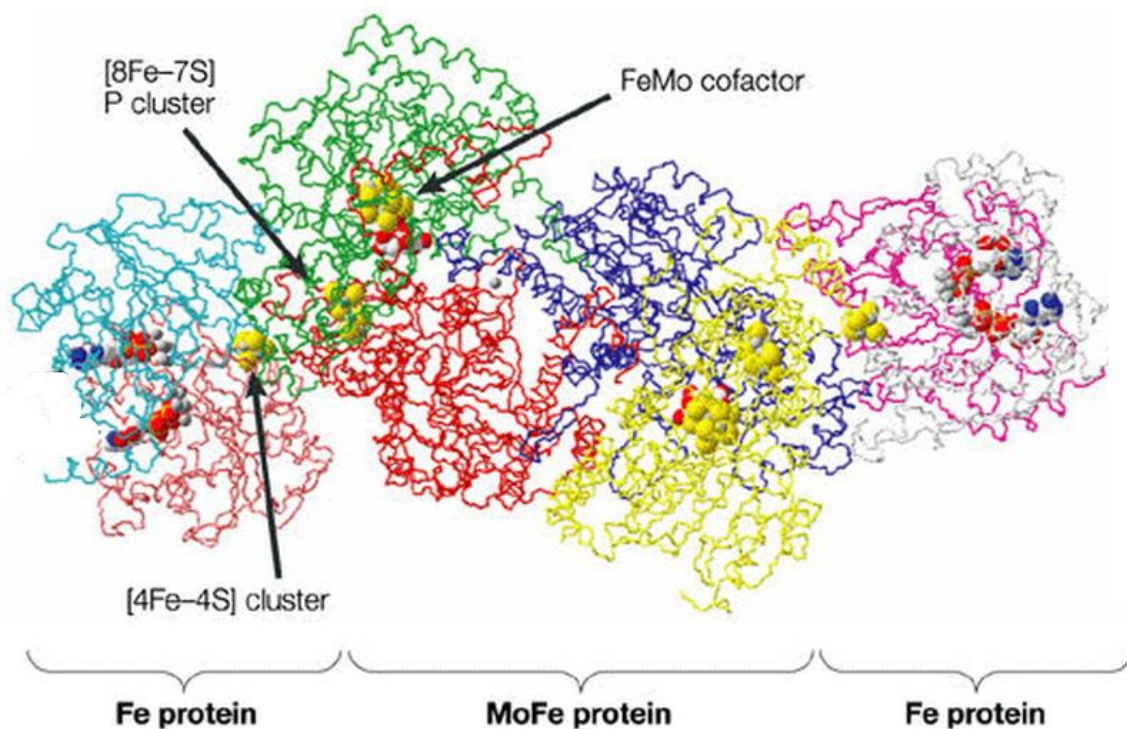


Figure 3 : Structure de la nitrogénase : les deux sous unités de la protéine Fe représentées en couleurs bleu, brun, magenta et gris. Les sous unités de la protéine MoFe sont colorées en jaune et vert (sous unité α) et en rouge et bleu (sous unité β) (Dixon et Kahn., 2011). Figure utilisée avec permission.

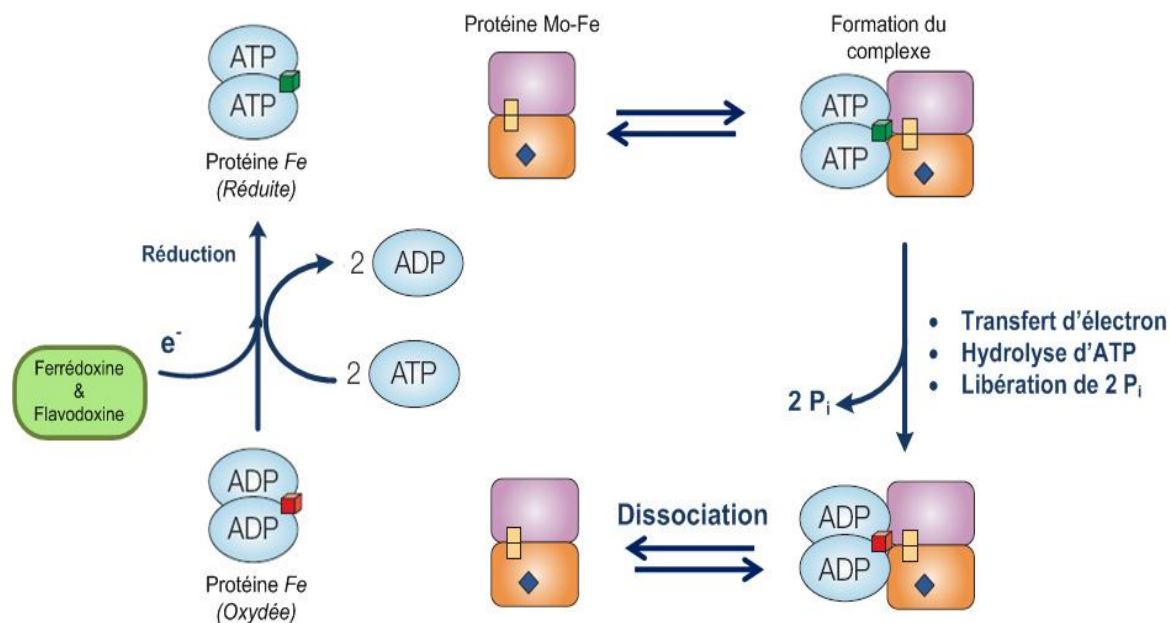


Figure 4 : Mécanisme d'action de la nitrogénase (Dixon et al., 2004). Figure utilisée avec permission

2. 4. *Rhodobacter capsulatus* :

C'est une bactérie Gram - photosynthétique (anoxygénique) pourpre non sulfureuse de la famille des alpha protéobactéries (Richard et al., 2004). Sous forme de bacille, elle constitue des chaînes en culture (Imhof., 1984; Van Niel., 1944). Plusieurs de ses propriétés font d'elle un excellent outil de recherche : Elle se caractérise par une croissance rapide en milieu synthétique anaérobie à la lumière et en aérobie à la noirceur à une température optimale de 30 C° (Weaver et al., 1975). Elle est très versatile du point de vue nutritionnel (Madigan et al., 2001). De plus, elle présente l'avantage de pouvoir être conservée longtemps (Weaver et al., 1975). Son génome se compose d'un chromosome circulaire de 3.7 Mb et un plasmide de 133 kb. Il code pour des gènes impliqués dans la photosynthèse, la fixation de l'azote, l'utilisation de substrats organiques xénobiotiques et la synthèse de polyhydroxyalkanoates. Depuis la découverte du premier système de recombinaison génétique chez *R. capsulatus* en 1974, elle a été en première ligne dans la recherche de la biologie moléculaire de la photosynthèse (Madigan et al., 2001).

2. 5. Gènes et protéines de la fixation de l'azote chez *Rhodobacter capsulatus* :

2. 5. 1. Principaux gènes de la fixation d'azote :

R. capsulatus implique plus de 50 gènes lors de la fixation de N₂, la plupart sont situés sur le chromosome. Ils sont divisés en quatre régions indépendantes : A, B, C et D. Dans la région A, on retrouve les gènes codant pour le système *rnf* (*rnfABCDEGH* et *rnfF*) et la férredoxine *fdxN* impliqués dans le transport d'électrons à la nitrogénase, les gènes de synthèse de FeMoco (*nifE*, *nifQ*, *nifSV*, *nifB1*) ainsi que *nifA1*, copie du gène codant pour l'activateur transcriptionnel NifA. La région B renferme les gènes de structure de la Mo nitrogénase (*nifHDK*), du cofacteur δ^{54} (*rpoN*), les deuxièmes copies des protéines NifA (*nifA2*) et NifB (*nifB2*), les gènes du système de transport de molybdène (*modABCD*), et ceux des répresseurs *mopA* et *mopB*. La région C code pour le système de régulation à deux composantes NtrB/C. Enfin, la région D renferme les gènes structuraux de la Fe nitrogénase (*anfHDGK*) et celui du régulateur AnfA. Les autres gènes du métabolisme de l'azote sont éparpillés sur le chromosome. Parmi eux : les gènes codant pour les protéines PII (GlnK et GlnB), le transporteur d'ammonium AmtB et la protéine GlnD impliquée dans la modification des transducteurs de signal PII et dans la régulation post traductionnelle de la nitrogénase (Masepohl et al., 2004; Masepohl et Hallenbeck., 2010).

2. 5. 2. Principales protéines de la fixation d'azote et sa régulation :

2. 5. 2. 1. Système Ntr :

Le système Ntr (*nitrogen regulating protein*) est un ensemble de protéines qui contrôle l'expression de plusieurs gènes du métabolisme de l'azote dont la fixation et l'assimilation de celui ci (Arcondéguy et al., 2001; Masepohl et al., 2002). C'est un senseur indirect de la présence d'azote au niveau intracellulaire, qui détecte la glutamine (résultat de l'assimilation d'azote) avec l'oxoglutarate et l'ATP contrairement à l'AmtB qui est un senseur extracellulaire d'ammonium (Jiang et al., 1998; Masepohl et Hallenbeck., 2010). Il implique cinq protéines : le système régulateur à deux composantes NtrB/NtrC et les protéines PII : GlnK, GlnB et GlnD.

Système NtrB/NtrC :

Ce système de transduction de signal joue un rôle de régulation dans la fixation de l'azote au niveau transcriptionnel. Il a longtemps été étudié chez *E. coli* (Merrick et al., 1983).

NtrB :

Protéine bifonctionnelle kinase/phosphatase (Ninfa et al., 1993), elle se présente sous forme d'un homodimère d'environ 36 kDa (Ninfa et al., 1996; Parkinson et al., 1992). Chaque monomère est constitué à l'extrémité N terminale d'un 'domaine senseur' transducteur de signal, un domaine central phosphotransférase /phosphatase/de dimérisation et d'un domaine C terminal qui lui permet de lier l'ATP et GlnB (Arcondéguy et al., 2001; Huergo et al., 2012). Cette enzyme catalyse la phosphorylation et la déphosphorylation de NtrC (Ninfa et al., 1993). Son action phosphatase commence lorsque chaque sous-unité de NtrB se lie à l'ATP, elle phosphoryle l'extrémité opposée de la deuxième sous-unité et la protéine tout entière s'autophosphoryle. Cet état de phosphorylation lui permet de transférer un groupement phosphate à l'activateur transcriptionnel NtrC qui est alors activé (Huergo et al., 2012).

NtrC :

C'est un activateur transcriptionnel des gènes *ntr* qui dépendent du facteur sigma 54, elle est aussi considérée comme une *enhancer binding protein* car elle s'attache aux séquences *enhancer* des gènes qu'elle régule loin du promoteur (Pioszak et al., 2003). Protéine de 50 kDa, elle est constituée de trois domaines : un domaine N terminal qui comporte Asp 54, le résidu qui représente le site de phosphorylation, un domaine central hautement conservé responsable de l'activation transcriptionnelle et un domaine C terminal qui s'attache à l'ADN (Parkinson et al., 1992). Lorsque l'azote est limitant, NtrC est activé suite à une phosphorylation par NtrB ce qui permet à l'ARN polymérase avec sigma 54 de se fixer aux promoteurs des gènes régulés par NtrC.

Parmi les gènes régulés par le système NtrB/C figurent :

-*nifA* : son produit est l'activateur transcriptionnel majeur des gènes *nif* codant pour la nitrogenase ainsi que d'autres gènes (Missailidis et al., 1999; Dixon et al., 2004; Merrick et Edwards., 1995). *R. capsulatus* possède deux gènes *nifA* : *nifA1* et *nifA2* dont la transcription est activée par NtrC phosphorylé. Les protéines NifA 1 et NifA 2 représentent des activateurs transcriptionnels des gènes *nifHDK* (et d'autres gènes) et donc l'une de ces protéines va être à l'origine de la Mo nitrogenase (Masepohl et Hallenbeck., 2010).

-anfA : lorsque l'azote et le molybdène sont absents, NtrC-P active la transcription de *anfA*. AnfA active ensuite la transcription des gènes *anfHDK*. Donc, dans ces conditions *R. capsulatus* utilise la nitrogénase Fe pour fixer N₂ (Masepohl et Hallenbeck., 2010).

2. 5. 2. 2. L'AmtB :

Protéine de la famille des Amt/Mep (*ammonium/methyl-ammonium transporter*) qui constitue un trimère de 46.8 kDa (voir Figure 5) nécessaire à la croissance de certains micro-organismes quand la quantité d'azote fixé est limitée (Zheng et al., 2012; Tremblay et Hallenbeck., 2008). L'étude cristallographique en 3D a révélé que chaque sous-unité est formée de 11 hélices transmembranaires avec une extrémité COOH cytoplasmique et une extrémité N terminale extracytoplasmique. Cette organisation définit un pore étroit de 12 Å entre les vestibules périplasmique et cytoplasmique (Zheng et al., 2012). L'AmtB agit comme un canal hautement hydrophobique permettant le transport d'ammonium sous forme de NH₃. En effet, NH₄⁺ est recruté dans le vestibule périplasmique et ensuite déprotoné pour diffuser dans le canal à travers la membrane. À la surface cytoplasmique il est reprotoné pour reconstituer l'ammonium de départ (Khademi et al., 2006). En plus d'être un senseur détectant la présence extracellulaire de NH₄⁺ en quantité suffisante ou non, cette perméase joue un rôle essentiel dans la régulation de la concentration interne d'ammonium et donc le maintien de l'homéostasie (Yakunin et Hallenbeck., 2002; Tremblay et Hallenbeck., 2008).

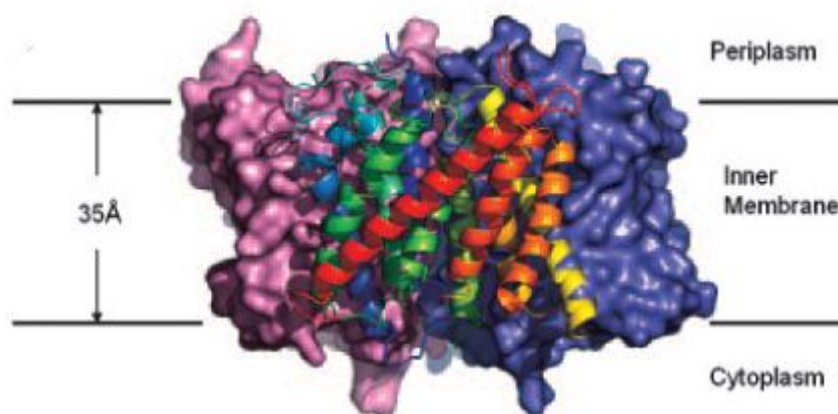


Figure 5 : Structure du trimère AmtB avec deux monomères colorés en violet et bleu et un autre représenté en rubans (Zheng et al., 2004). Figure utilisée avec permission.

Les études cristallographiques sur l'AmtB d'*E. coli* ont permis de déterminer la fonction de plusieurs acides aminés impliqués dans le recrutement et le transport d'ammonium et, étant donné le haut degré d'homologie, aussi pour *R. capsulatus* (voir Figure 6). Ainsi ces études ont révélé (respectivement du périplasma, à l'intérieur du canal AmtB, et au niveau cytoplasmique) que :

La cavité périplasmique de l'AmtB est constituée de deux acides aminés conservés F131 et F240 (correspondant à F107 et F215 chez *E. coli*) au site d'attachement de l'ammonium qui bloquent l'entrée du pore. Elles effectuent un changement conformationnel lors du transfert de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ (Javelle et al., 2008; Zheng et al., 2004). Le site de fixation S1 de NH_4^+ se situe à la base du vestibule périplasmique (Javelle et al., 2008), il est entouré par les chaînes aromatiques des résidus F127, F131, W172 et S244 (équivalents de F103, F107, W148, et S219) (Zheng et al., 2004).

A l'intérieur du pore hydrophobe, deux aspartates conservés D148 et D335 (D160 et D310 chez *E. coli*) jouent un rôle dans les interactions par liaison hydrogène et ont un rôle supposément structurel. S'ensuit deux histidines hautement conservées H193 et H342 (H168 et H318 chez *E. coli*), qui peuvent accepter des protons et donc permettre la déprotonation de NH_4^+ pour son passage à travers AmtB. Chez *R. capsulatus*, les résidus hydrophobiques W237, F127 et F240 tapissent le pore d'AmtB et son entrée, il font partie des acides aminés les plus conservés (Zheng et al., 2004). Enfin, le résidu D334 (D309 chez *E. coli*) qui est situé à la sortie cytoplasmique du pore agit comme donneur de proton au NH_3 (par conséquent à la reformation de NH_4^+). Il participe aussi au réarrangement d'AmtB lors de sa fixation à GlnK (Nygaard et al., 2006).

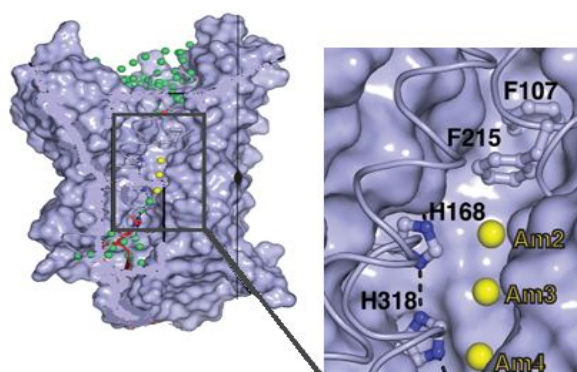


Figure 6 : Représentation en 3 dimensions d'un monomère d'AmtB montrant des résidus impliqués dans le transfert d'ammonium (Gruswitz et al., 2007). Figure utilisée avec permission.

2. 6. Les protéines PII :

La superfamille des protéines PII est l'une des familles de protéines de transduction de signal les plus anciennes et les plus répandues dans la nature (Sant'ana et al., 2009; Huergo et al., 2012). Cette famille inclue les protéines GlnK et GlnB. Ce sont des homotrimères dont le rôle est de réguler le métabolisme de l'azote en réponse à la disponibilité intracellulaire en azote, énergie et carbone. Ils sont sujets à une modification conformationnelle et aussi à une régulation métabolique médiée par des molécules effecteurs (ATP, ADP, 2 oxoglutarate (Pedro et al., 2013; Moure et al., 2012).

GlnK et GlnB :

Homotrimères (voir Figures 7 et 8) compactes de 12 à 14 kDa dont chaque sous-unité est composée de 120 acides aminés ainsi que de 3 boucles T, B et C (Rajendran et al., 2011; Pedro-Roig et al., 2013).

La boucle T est constituée de 20 acides aminés, elle est très flexible et participe aux interactions des protéines PII et leur cibles. Chez *E. coli* et *R. capsulatus* cette boucle contient le résidu Tyr 51 cible d'uridylylation réversible par GlnD en réponse à l'azote intracellulaire et représente donc le site de modification post traductionnelle qui influence le métabolisme d'azote et de carbone (Noindorf et al., 2011; Rajendran et al., 2011).

GlnB :

Le gène GlnB fait partie de l'opéron *glnB-glnA*, il est donc lié à la transcription de la glutamine synthétase (*glnA*) (Huergo et al., 2012). Exprimée constitutivement (Van Heeswijk et al., 1996), cette protéine joue un rôle central dans la régulation du métabolisme de l'azote.

GlnB est essentiel à la régulation transcriptionnelle de la Mo nitrogénase. En présence d'une haute concentration d'ammonium, elle s'associe à NtrB formant un complexe qui empêche l'activation de NtrC et donc inhibe l'expression des promoteurs Ntr et par la même occasion la synthèse de la Mo nitrogénase (Drepper et al., 2003). Elle interagit avec DraT, une dinitrogénase réductase ADP ribosyltransférase impliquée dans l'ADP ribosylation et l'inactivation de NifH. De plus, GlnB participe à la régulation de l'activité de la glutamine synthétase via l'interaction et la régulation de l'ATase (adenyl transférase) qui inhibe par modification covalente l'activité de cette enzyme (Vivian et al., 2013).

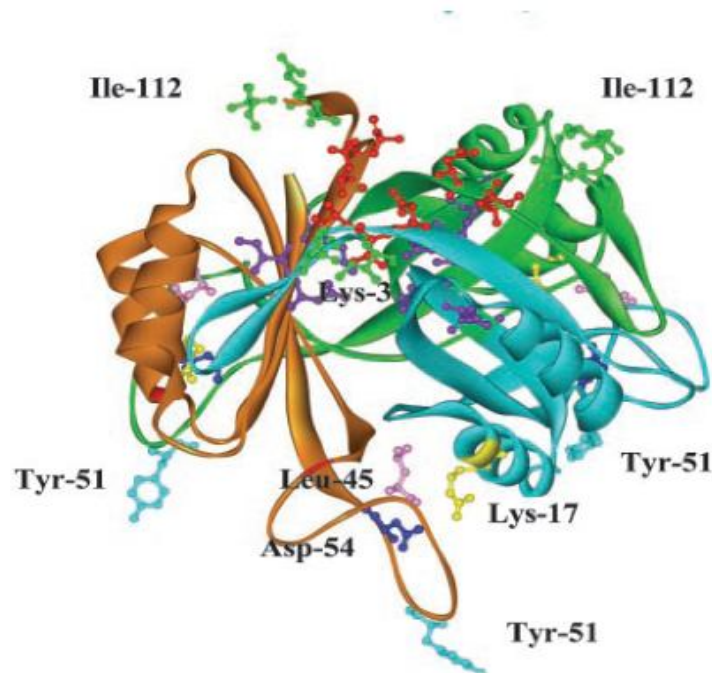


Figure 7 : Structure du trimère GlnB (Zhang et Pohlmann., 2004). Figure utilisée avec permission.

GlnK :

Tout comme GlnB, cette protéine est un acteur clé dans la régulation de l'expression de la Mo nitrogénase, son interaction avec NtrB lui permet de réguler l'activateur transcriptionnel NtrC. Cependant, chez *R. capsulatus* GlnB est le seul à assurer cette fonction. *glnK* se situe en aval du gène *amtB* (codant pour le transporteur d'ammonium) dans le même opéron. Cette proximité qui suggère une interaction entre leurs produits a poussé les chercheurs à étudier ce complexe. En effet les études cristallographiques à haute résolution du complexe AmtB-GlnK chez *E. coli* a permis de montrer le mécanisme par lequel les protéines GlnK et AmtB régulent le transport d'ammonium (Pedro-Roig et al., 2013). Lorsque la concentration extracellulaire d'ammonium est élevée, la boucle T de GlnK s'insère dans le canal d'AmtB (voir Figure 8) bloquant ainsi l'entrée de NH_4^+ et formant le complexe membranaire GlnK-AmtB (Zhang et al., 2004; Tremblay et al., 2007).

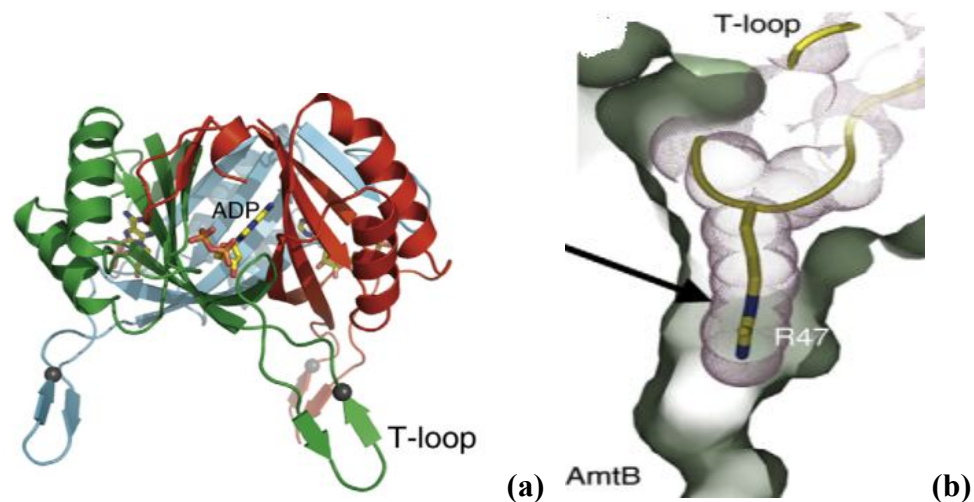


Figure 8 : (a) La protéine PII : GlnK. (b) Illustration du blocage du canal AmtB par la boucle T de GlnK chez *Escherichia coli* (Llacer et al., 2008). Figure utilisée avec permission.

GlnD :

GlnD est une protéine de 120 kDa qui possède quatre domaines : le domaine N terminal codant pour l'activité uridylyltransférase (UTase) et un domaine adjacent HD codant pour l'activité *uridylyl removing* (UR). Cette enzyme bifonctionnelle possède un seul site pour la fixation de la glutamine qui lorsque fixée stimule l'activité UR tandis qu'en absence de glutamine c'est l'activité UTase qui prédomine. C'est un senseur de glutamine et donc indirectement d'azote (Zhang et al., 2010), il régule l'activité de la glutamine synthétase et la fixation de l'azote par uridylation de Tyr 51 de GlnB et GlnK chez les protéobactéries (Teixeira et al., 2010). En absence de source d'azote fixé (ammonium ou glutamine), l'activité uridylyl transférase de GlnD change la conformation de GlnB et GlnK, NtrB reste libre et capable de phosphoryler NtrC qui va activer l'expression des NifA et par conséquent l'activité de la Mo nitrogénase. Lorsque NH_4^+ (ou la glutamine) est présent, il y a déuridylation des protéines PII et GlnB peut interagir avec NtrB résultant en un blocage de la nitrogénase (Bonatto et al., 2007).

2. 7. Régulation de la fixation de l'azote :

Le processus de la fixation de l'azote est rigoureusement régulé transcriptionnellement et post traductionnellement car ce phénomène est coûteux en termes d'énergie (Sarkar et al., 2012).

2. 7. 1. Régulation transcriptionnelle de la fixation de N₂:

La régulation de l'activité de la nitrogénase à ce niveau implique le système Ntr et le contrôle de l'activité de NifA.

2. 7. 1. 1. Régulation par le système NtrB/NtrC :

Dans des conditions de carence en azote (correspondant à une basse concentration intracellulaire de glutamine), GlnD uridyle le résidu Tyr de la boucle T de GlnB. Cette forme GlnB-UMP est incapable de se fixer sur NtrB et le désactiver. Par conséquent, NtrB s'autophosphoryle sur le résidu conservé H214 (chez *R. capsulatus*) (Cullen et al., 1993). Cette protéine devenue un régulateur positif phosphorylé NtrC qui par la suite active la transcription de *nifA1*, *nifA* et *anfA*, les activateurs transcriptionnels de la synthèse de la nitrogénase (Ninfa et al., 1993). Lorsque l'azote est abondant (correspondant à une haute concentration intracellulaire de glutamine), GlnB déuridylée par GlnD se fixe sur NtrB, inhibe son activité kinase et l'empêche de s'autophosphoryler. Ainsi, NtrB déphosphoryle l'activateur transcriptionnel NtrC qui ne peut plus activer la transcription de *nifA* et donc la synthèse de la nitrogénase ne peut pas avoir lieu (Masepohl et Hallenbeck., 2010).

2. 7. 1. 2. Contrôle de l'activité de NifA/AnfA:

Chez *R. capsulatus*, NifA déclenche la transcription des gènes *nif* en collaboration avec l'ARN polymérase (contenant le facteur sigma RpoN spécifique à l'azote) lorsqu'il s'attache aux régions *enhancer* en amont des régions promoteurs *nif* pour la synthèse de la Mo nitrogénase (Masepohl et Hallenbeck., 2010). Plusieurs études ont démontré que la régulation de l'activité de NifA indépendamment de NtrC implique: l'intervention combinée du statut de l'azote et le domaine GAF de l'extrémité N terminale de la protéine NifA (Paschen et al., 2001) et celles des protéines PII: GlnB et GlnK. En absence d'azote, l'activation de NifA nécessite sont interaction directe avec GlnB uridylé par GlnD (GlnB-UMP) (Drepper et al., 2003; Zhang et al., 2005). GlnK n'est pas impliqué dans ce phénomène mais il est, en association avec GlnB, nécessaire au blocage de l'activité de NifA en présence d'ammonium (Drepper et al., 2003).

L'activateur de la transcription des gènes de la Fe nitrogénase AnfA est produit seulement en conditions de carence en ammonium et molybdène. Son activité est inhibée par la présence d'azote mais cette inactivation est indépendante de GlnB et GlnK (voir Figure 9) (Masepohl et Hallenbeck., 2010).

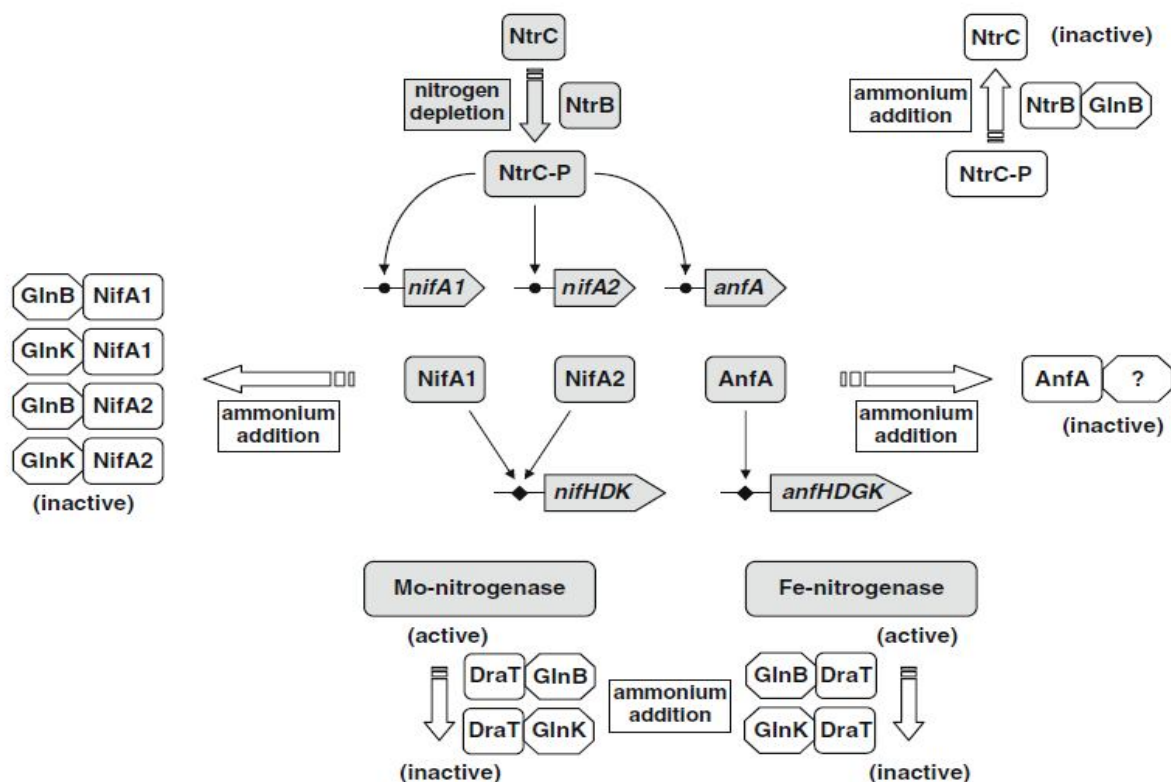


Figure 9 : Régulation de la fixation de l'azote par le système Ntr. (Masepohl et Hallenbeck., 2010). Figure utilisée avec permission.

2. 7. 2. Régulation post traductionnelle de la fixation de N₂:

En plus du mécanisme de régulation transcriptionnelle, *R. capsulatus* ainsi qu'un grand nombre de bactéries pourpres non sulfureuses ont développé un système de contrôle post traductionnel médié par DraT /DraG (dinitrogénase réductase *activating glycohydrolase*) qui contrôle l'activité de la nitrogénase par une ADP ribosylation réversible. (Tremblay et Hallenbeck., 2008; Pawloski et al., 2003). Quand de l'ammonium est ajouté dans le milieu (ou dans la noirceur), DraT (dinitrogénase reductase, *ADP ribosyl transferase*) transfère un groupement ADP ribose sur le résidu Arg 101 de la protéine NifH (sous unité Fe de la Mo nitrogénase) pour l'inactiver et inhibant ainsi son transfère d'électrons à la sous unité Mo de la nitrogénase (*switch off*) (Masepohl., 1993). En parallèle, GlnK et DraG sont séquestrés au

niveau de la membrane et forment avec AmtB un complexe ternaire qui bloque l'entrée de l'ammonium à travers ce canal et par la même occasion inhibe DraG dont la fonction est opposée à celle de DraT. Une fois l'azote consommé, DraG enlève l'ADP ribose de la protéine Fe et lui permet donc d'interagir avec la protéine Mo autrement dit ceci permet d'activer la nitrogénase (*switch on*) (voir Figure 10). Enfin, DraT interagit et s'attache avec GlnB et ou GlnK (Masepohl et Hallenbeck., 2010).

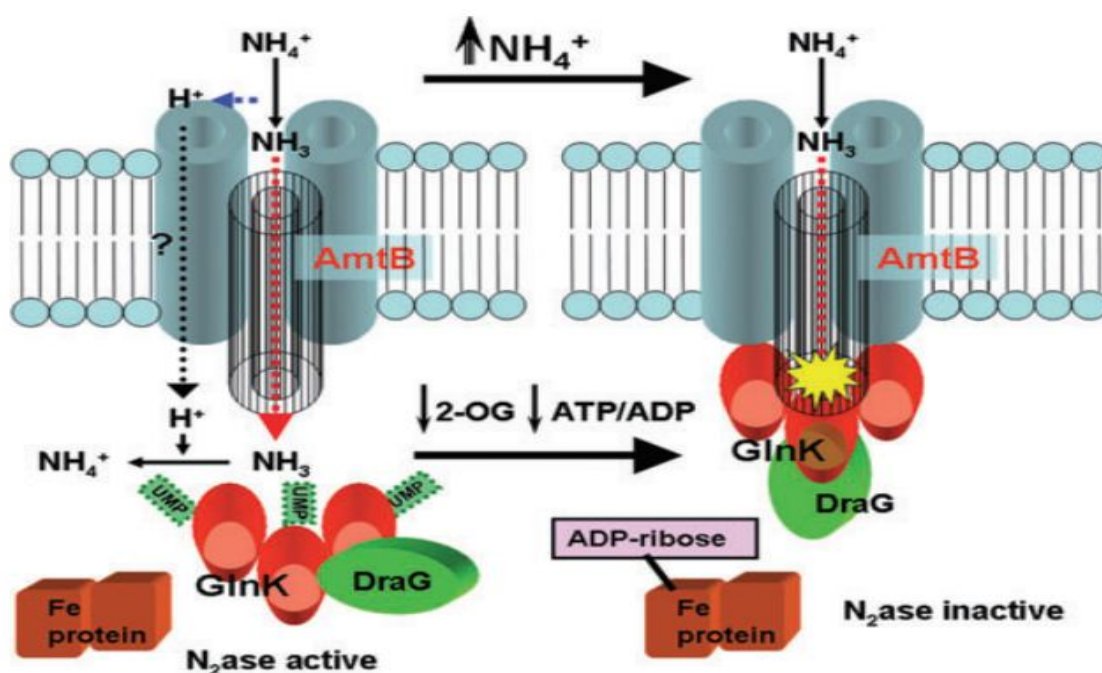


Figure 10 : Régulation post traductionnelle par ADP ribosylation (Tremblay et Hallenbeck., 2008). Figure utilisée avec permission.

Un deuxième système de régulation post traductionnelle encore mal connu a été identifié chez *R. capsulatus*. Indépendant de l'ADP ribosylation (voir Figure 11), on sait toutefois que les protéines AmtB ainsi que GlnK et GlnB sont impliqués dans ce processus. La découverte de ce type de régulation a été émise par (Pierrard et al., 1993), ils ont prouvé que les mutants de *draG* et *draT* privés donc de leur fonction d'*ADP/removing ribosylation* sont quand même capables d'inactiver la nitrogénase par *switch off*. Une autre étude a démontré qu'en mutant les allèles de la protéine Fe les souches de *R. capsulatus* ne peuvent plus être modifiés par ADP ribosylation (Yakunin et al., 1998).

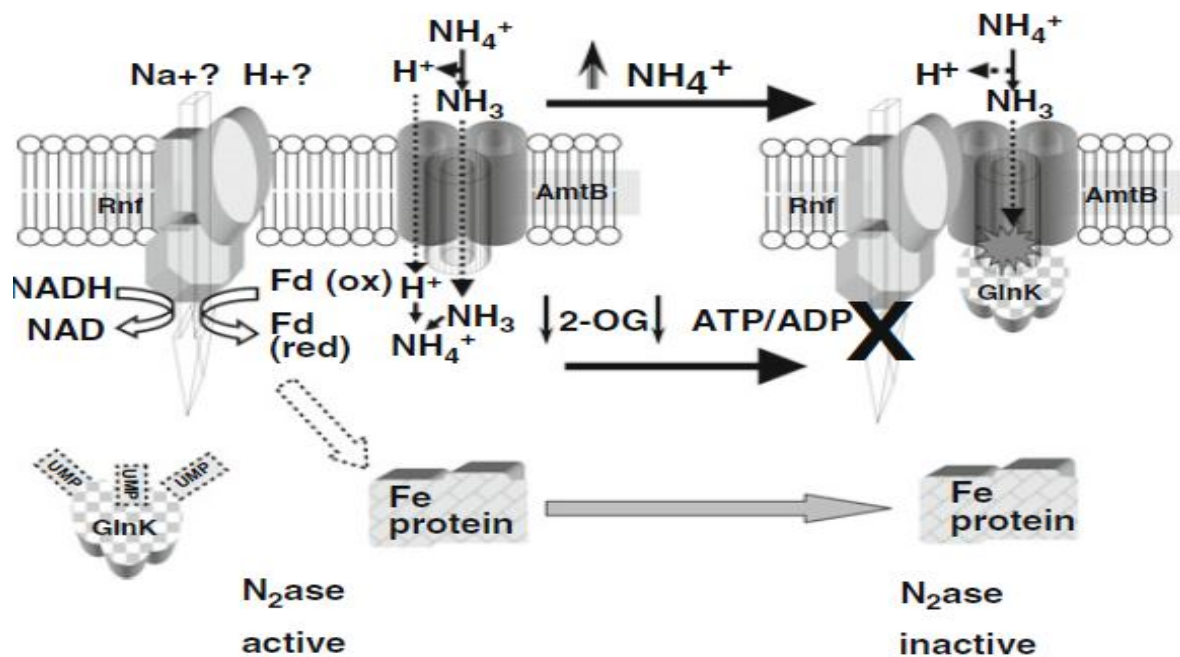


Figure 11 : Régulation post traductionnelle sans ADP ribosylation (Masepohl et Hallenbeck., 2010). Figure utilisée avec permission.

3. Production de biohydrogène chez *R. capsulatus* :

L'augmentation croissante du prix du pétrole, la limitation des réserves en énergies fossiles ainsi que les dégradations environnementales et climatiques résultants de leur utilisation sont à l'origine de l'expansion de la recherche en termes d'énergies 'vertes' renouvelables (Hallenbeck., 2009). Le but ultime des scientifiques étant de développer des méthodes de production de biodiesel et de biogaz qui ne libèrent pas de CO₂ et d'utiliser ces ressources au mieux (Androga et al., 2012). L'hydrogène est considéré comme la principale source énergétique pour le futur. Il peut être directement utilisé par les 'piles combustibles' et sa combustion selon la réaction $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ ne génère que de l'eau est non polluante (Tekucheva et al., 2011; Castillo et al., 2012). Sa bio-production utilise la biomasse dans des conditions ambiantes et donc ne consomme pas beaucoup d'énergie (Sevinc et al., 2012). Aussi, le cout d'investissement initial est bas car les matières premières utilisées sont renouvelables. Enfin, le rendement de conversion d'énergie est élevé (Akkose et al., 2009; Ozgur et al., 2010). Pour compenser voire remplacer la haute et rapide consommation en carburant, de nouvelles technologies basées sur l'énergie biologique doivent être utilisées pour produire du biohydrogène à grande échelle. Ceci constitue la stratégie clé du 21^{ème} siècle pour pallier à ce problème (Androga et al., 2012).

L'économie d'hydrogène est divisée en trois secteurs : la production, le stockage (avec transport) et l'utilisation. Dans chacun, un certain nombre de barrières techniques est retrouvé. Le stockage étant à lui seul le plus grand défi de cette économie du fait de la faible densité énergétique de l'hydrogène. A cet effet, toute la recherche est concentrée sur ce secteur afin d'élaborer la technologie idéale pour fournir et conserver l'H₂ dans le but de remplacer le carburant des véhicules (Hallenbeck., 2009). La production biologique d'hydrogène dépend nécessairement de la présence d'une enzyme qui produit du H₂. Deux classes de métalloprotéines sensibles à l'oxygène remplissent cette tâche : la nitrogénase (détaillée plus haut) et l'hydrogénase (Hallenbeck et Benemann., 2002; Skizim., 2012).

3. 1. Les hydrogénases:

Les hydrogénases sont les enzymes clés du métabolisme de l'hydrogène qui peuvent agir soit par oxydation et utilisation de H₂ comme pouvoir réducteur ou par réduction de protons aboutissant à la formation de ce gaz (Brazzolotto., 2006; Sun., 2005). Elles sont divisées en trois sortes selon le cofacteur présent dans leur site actif : les [Fe- Fe] hydrogénases et les [Ni- Fe] hydrogénases et une hydrogénase [Fe-S] *cluster free* (Androga et al., 2012; Hallenbeck et Benemann., 2002).

Parmi les plus étudiées il y a :

3. 1. 1. Les [Fe- Fe] hydrogénase: La plupart constituent des protéines monomériques de 45 à 48 kDa (voir Figure 12) qui au niveau de leur site actif contiennent un centre ferrique dinucléaire attaché à la protéine par une liaison unique entre la cystéine et un des deux atomes de fer (Barozzolato et al., 2006). Elles produisent du H₂ principalement par réduction de protons (Sun et al., 2005) et sont irréversiblement inactivées par l'O₂. Ce type d'enzyme est synthétisé par les algues vertes et les procaryotes anaérobies. Il est à noter que chez les bactéries pourpres non sulfureuses (BPNS), seule *R. palustris* possède une [Fe-Fe] hydrogénase (Androga et al., 2012).

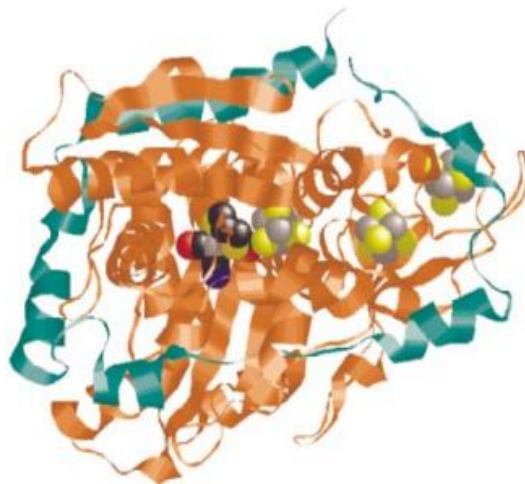


Figure 12 : Structure de la [Fe] hydrogénase de *Desulfovibrio* (Casalot et Rousset., 2001).
Figure utilisée avec permission.

3. 1. 2. Les [Ni- Fe] hydrogénase :

Ces enzymes sont des protéines hétérodimériques constituées de deux sous-unités (voir Figure 13). La grosse sous unité alpha de 60 kDa abrite un centre actif métallique unique constitué d'un complexe nickel-fer. La petite sous unité bêta de 30 kDa contient quant à elle deux régions [4Fe-4S] et un autre [3Fe-3S] (Androga et al., 2012; Hallenbeck et Bennemann., 2002). Elles sont retrouvées chez les cyanobactéries et les bactéries pourpres non sulfureuses (BPNS) (Androga et al., 2012).



Figure 13 : Structure de la [Ni-Fe] hydrogénase de *Desulfovibrio* (Casalot et Rousset., 2001).
Figure utilisée avec permission.

Les hydrogénases [Ni- Fe] peuvent être divisées en plusieurs groupes :

Le premier regroupe des hydrogénases membranaires pour la consommation de l' H_2 , le deuxième est constitué par les senseurs d'hydrogène, le troisième par les réducteurs de NADP et réducteurs bidirectionnels de NADP/NAD et enfin les hydrogénases associées à la membrane impliquées dans la conversion d'énergie et l'évolution de l' H_2 forment le dernier groupe. Les cyanobactéries contiennent des hydrogénases cytoplasmiques induites dans des conditions de fixation d'azote. Dans le cas contraire, autrement dit quand l'azote est en excès, elles utilisent l'hydrogénase bidirectionnelle NAD(P) pour la photoproduction de H_2 . Les BPNS oxydent l' H_2 en protons et électrons grâce à des hydrogénases membranaires aussi appelées Hup pour la consommation de H_2 . Ces enzymes sont attachées au *pool* de quinone de la chaîne respiratoire qui se trouve dans la membrane. Chez ces bactéries, les hydrogénases ont la particularité de posséder à l'extrémité N terminale de leur petite sous-unité un long peptide qui sert de signal de reconnaissance qui cible l'hétérodimère. Chez *R. capsulatus* et *R. palustris*, une [Ni-Fe] cytoplasmique est aussi retrouvée. Son rôle senseur de H_2 lui permet de déclencher une cascade de réactions dont le but est de réguler la synthèse des hydrogénases.

Enfin, une [Ni-Fe] nitrogénase induite par CO (CooLH) est aussi retrouvée chez *Rhodospirillum rubrum*. Elle produit en association avec la CO déhydrogénase du CO_2 et de l' H_2 . Ceci permet donc à cette bactérie d'utiliser le CO comme source énergétique pour sa croissance dans l'obscurité (Androga et al., 2012).

3. 2. Processus de production de biohydrogène :

Plusieurs organismes photosynthétiques tels que les algues et les bactéries sont utilisés dans le développement de cette source énergétique car l' H_2 est présent dans plusieurs de leurs voies métaboliques. Sur cette base, la biophotolyse, la photo-fermentation et la fermentation à la noirceur sont les trois processus de production qui offrent la perspective de produire de l'hydrogène biologiquement à partir de sources recyclables (Androga et al., 2012; Tekucheveva et al., 2012).

3. 2. 1. Production d'H₂ photobiologique oxygénique :

Appelée biophotolyse, c'est la voie qui génère de l'hydrogène suite à une photosynthèse oxygénique. Lors de ce mécanisme, les micro-algues et les cyanobactéries produisent du H₂ de manière photo-autotrophique avec l'eau comme donneur d'électrons, le CO₂ comme source de carbone et la lumière comme source d'énergie. La biophotolyse peut être directe ou indirecte (Androga et al., 2012).

3.2.1.1. La biophotolyse directe :

C'est le processus biologique qui convertit l'eau en hydrogène et oxygène (donc en énergie chimique) grâce à la lumière et les photosystèmes des micro-algues (Kirtay et al., 2001). Ainsi, le système réactionnel PSII utilise l'énergie lumineuse pour diviser l'eau en protons et électrons, ces derniers passent séquentiellement par PSII-PQ-cyt b6/f, PC et PSI pour arriver chez la ferrédoxine. Cet accepteur final délivre ensuite les électrons à la [Fe-Fe] hydrogénase qui catalyse la formation de H₂ par combinaison de protons et d'électrons précédemment produits (voir Figure 14) (Androga et al., 2012).

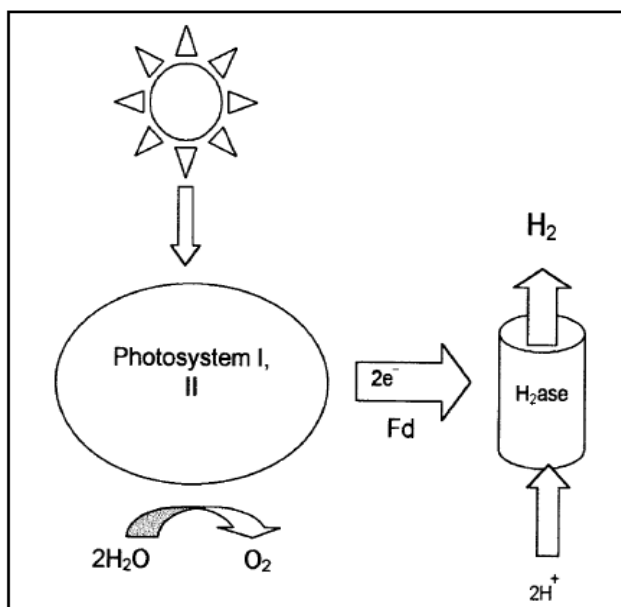


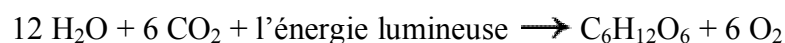
Figure 14 : Représentation schématiques de la biophotolyse directe (Hallenbeck., 2009). Figure utilisée avec permission.

Comme mentionné plus haut, l'hydrogénase est sensible à l'O₂ ce qui implique le maintien de la concentration de ce gaz à moins de 0.1 % pour préserver la fonction enzymatique. Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la production d'hydrogène a été temporellement séparée du dégagement photosynthétique de l'oxygène par inactivation du photosystème PSI

grâce à une déprivation en sulfure de ces algues (Androga et al., 2012; Kirtay et al., 2001). Malgré cela, l'application industrielle de la production de H₂ qui se base sur l'utilisation des micro-algues constitue encore un défi car : l'efficacité de la conversion de l'énergie lumineuse est limitée, la capture et séparation gazeuse à cette échelle reste encore problématique et le coût de développement de ce processus est très coûteux (Hallenbeck et Benemann., 2002).

3. 2. 1. 2. La biophotolyse indirecte :

Une solution à l'inactivation des hydrogénases par l'O₂ réside dans la séparation temporelle et/ou spatiale de leurs processus de synthèse/dégagement. Dans ce contexte, les études se sont concentrées sur des processus alternatifs où le CO₂ joue le rôle de porteur d'électrons intermédiaire entre la photosynthèse et la production de H₂ (Benemann et al., 1997). Chez les cyanobactéries, les réactions pour la production de H₂ se font dans les cellules spatialement séparées : les cellules végétatives et hétérocystes (Androga et al., 2012). Le mécanisme de production peut être représenté par les réactions suivantes :



Lors du mode de croissance végétative, les cyanobactéries utilisent le CO₂ de l'air pour produire des substances cellulaires (carbohydrates) via photosynthèse avec la lumière comme source d'énergie, l'eau comme source d'électrons (Manish., 2007; Androga et al., 2012).

Dans des conditions d'anoxie et de limitations en azote chez les hétérocystes, il y a oxydation des sucres produits par les cellules végétatives pour former de l'ATP. Les électrons libérés de cette réaction passent au système réactionnel PSI puis sous l'effet de la lumière à d'autres protéines pour arriver à l'accepteur final d'électrons : la ferrédoxine. Ce dernier délivre ensuite ces électrons à la nitrogénase qui catalyse la formation de H₂ à partir des protons et électrons grâce à l'ATP (Androga et al., 2012). Des hydrogénases sont aussi retrouvées chez les cyanobactéries, elles sont principalement responsables du maintien de l'équilibre redox dans la cellule. D'autre part, une élaboration du concept de biophotolyse indirecte distingue quatre étapes (voir Figure 15) pour la production d'hydrogène selon Gaudernack :

- 1- La production par photosynthèse d'une biomasse riche en réserves de carbohydrates dans des bassins ouverts
- 2- La concentration de la biomasse dans des bassins de décantation.

3- La formation de 4 H₂ par glucose stocké dans les cellules et 2 acétates suite à une fermentation à la noirceur.

4- Enfin, la conversion dans un photo-bioréacteur de 2 acétates en 8 moles de H₂ (Hallenbeck et Benemann., 2002; Ni et al., 2006).

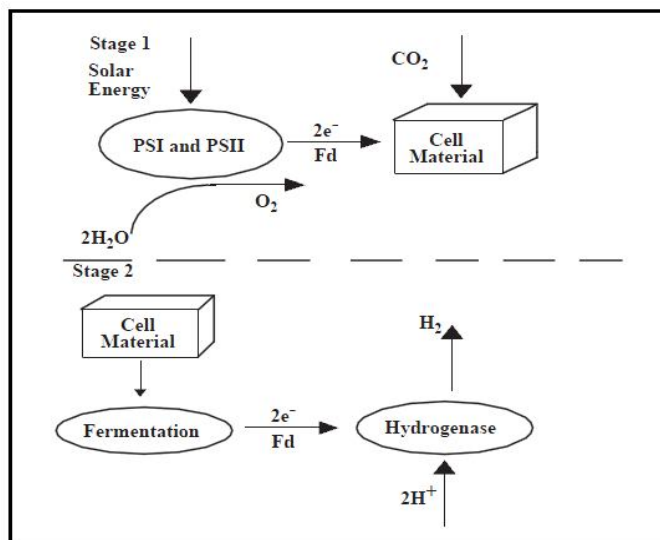


Figure 15: Représentation schématique de la biophotolyse indirecte (Ni et al., 2006). Figure utilisée avec permission.

3. 2. 2. Production d'H₂ photo-biologique anoxygène ou photo-fermentation :

C'est la bioproduction photo-hétérotrophique d'hydrogène qui utilise une source de carbone organique et la lumière comme source d'énergie. Les bactéries photosynthétiques ont longtemps été étudiées pour leur capacité à produire du H₂. Parmi elles, les BPNS (dont *R. capsulatus*) sont les mieux caractérisées dans ce domaine. Chez ces bactéries et dans un environnement dépourvu d'azote et d'oxygène, la nitrogénase agit comme une hydrogénase. Elle catalyse la photo-décomposition d'acides organiques (acétique et butyrique) en hydrogène et CO₂ (voir Figure 16) (Androga et al., 2012; Kaplan et al., 2008) selon la réaction suivante :



A noter aussi que les BPNS possèdent une hydrogénase [Ni-Fe] fixée à la membrane qui a une fonction antagoniste de celle de la nitrogénase et donc son activité devrait être limitée pour une production d'hydrogène maximale (Androga et al., 2012; Kaplan et al., 2008). Cette enzyme catalyse l'oxydation de H₂ en protons selon la réaction réversible qui suit : $\text{H}_2 \longrightarrow 2\text{H}^+ + 2 \text{e}^-$.

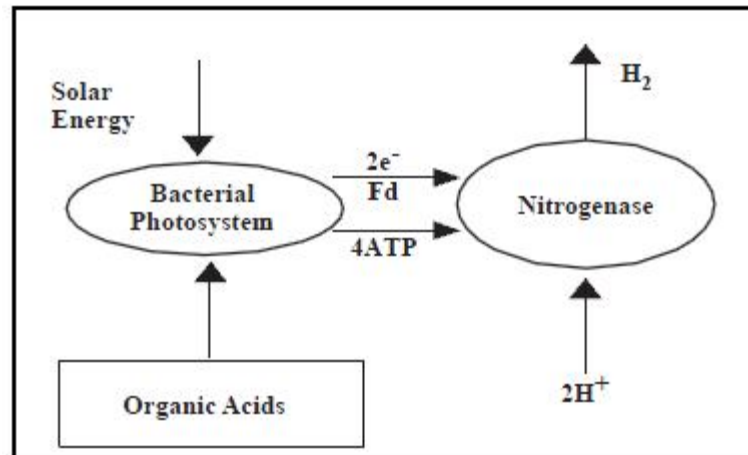


Figure 16 : Représentation schématique de la photofermentation (Ni et al., 2006). Figure utilisée avec permission.

3. 2. 3. La bio production de H₂ par fermentation à la noirceur:

Procédé d'induction d'hydrogène par fermentation de produits dérivés de la biomasse sans source lumineuse requise (voir Figure 17). Il est employé par des bactéries généralement mésophiles ou thermophiles pour convertir des carbohydrates en hydrogène, CO₂ et en acides organiques (le plus souvent de l'acide acétique) (Foglia et al., 2011).

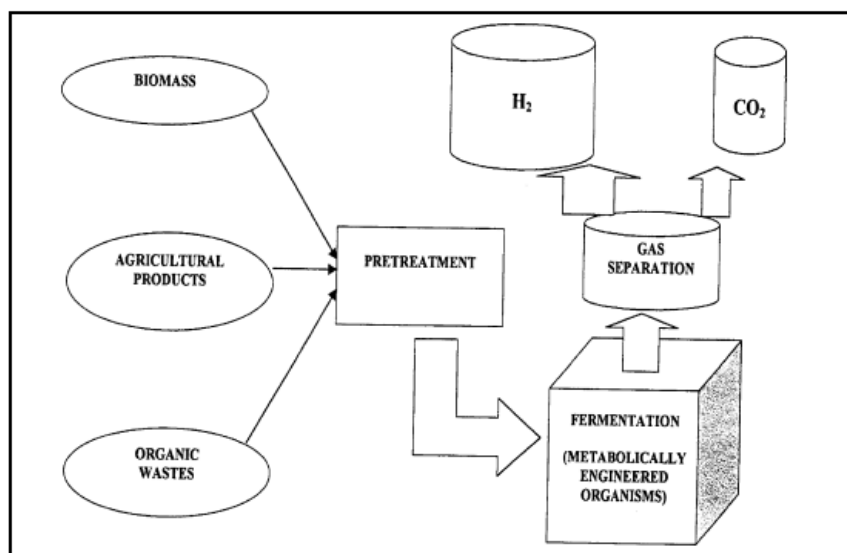


Figure 17 : Fermentation à la noirceur (Hallenbeck et Benemann., 2002). Figure utilisée avec permission.

Chez la plupart des micro-organismes, la production d'hydrogène est effectuée via le métabolisme anaérobie du pyruvate qui est lui-même généré par catabolisme du glucose (Hallenbeck et Benemann., 2002). Deux enzymes catalysent la transformation du pyruvate en hydrogène : la pyruvate-formate lyase (Pfl) chez les entérobactéries et la pyruvate ferrédoxine-oxidoréductase (Pfor) chez les *Clostridium* (Hallenbeck., 2009).

Chez les entérobactéries, le pyruvate est clivé en acetyl-CoA et formate par l'enzyme Pfl selon la réaction suivante :



Le formate est ensuite converti en hydrogène et CO₂ suite à l'action combinée de la formate déshydrogénase (Fdh) et l'hydrogénase 3 (hyd3) (voir Figure 18) (Hallenbeck et Benemann., 2002).

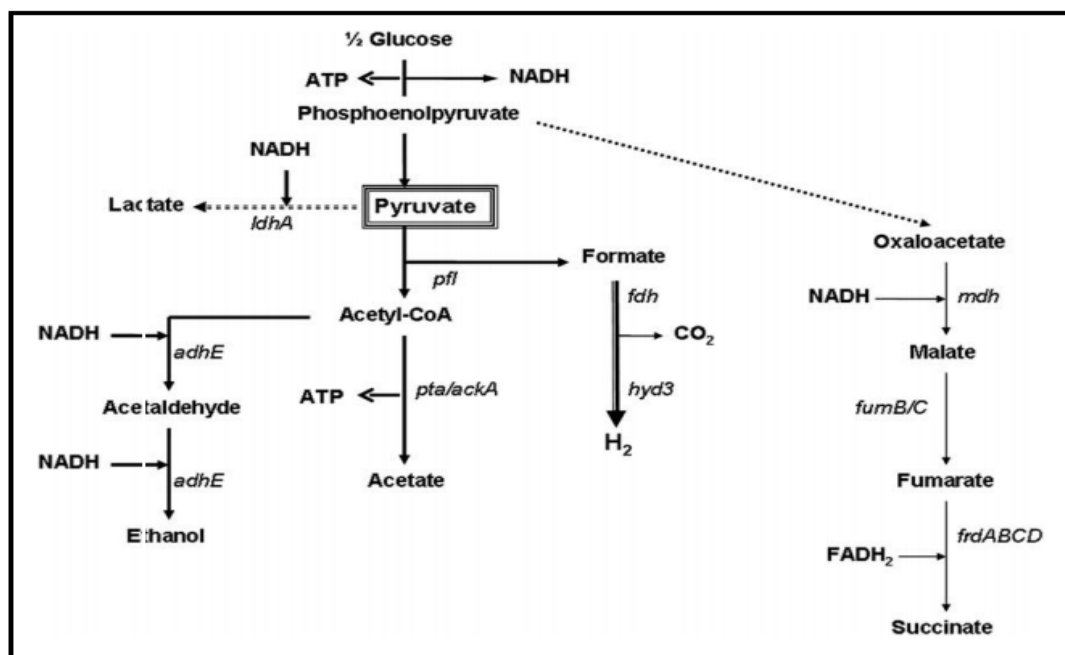


Figure 18 : Représentation schématique de la fermentation du glucose et le métabolisme du pyruvate chez les entérobactéries (Hallenbeck., 2009). Figure utilisée avec permission.

Les *Clostridia* dégradent le pyruvate grâce à la Pfor pour donner : de l'acetyl CoA, du CO₂ et une ferrédoxine réduite. Celle ci transfère ensuite des électrons à la [Fe-Fe] hydrogénase produisant 2 moles d'hydrogène pour une mole de glucose utilisé (voir Figure 19). (Hallenbeck., 2009; Manish et al., 2007).

Lorsque la pression partielle d'hydrogène est basse (pH bas), ces bactéries déclenchent une voie métabolique caractéristique au cours de laquelle le NADH de la glycolyse peut être réoxydé. Les détails du fonctionnement de ce phénomène restent cependant encore mal connus (Hallenbeck., 2009).

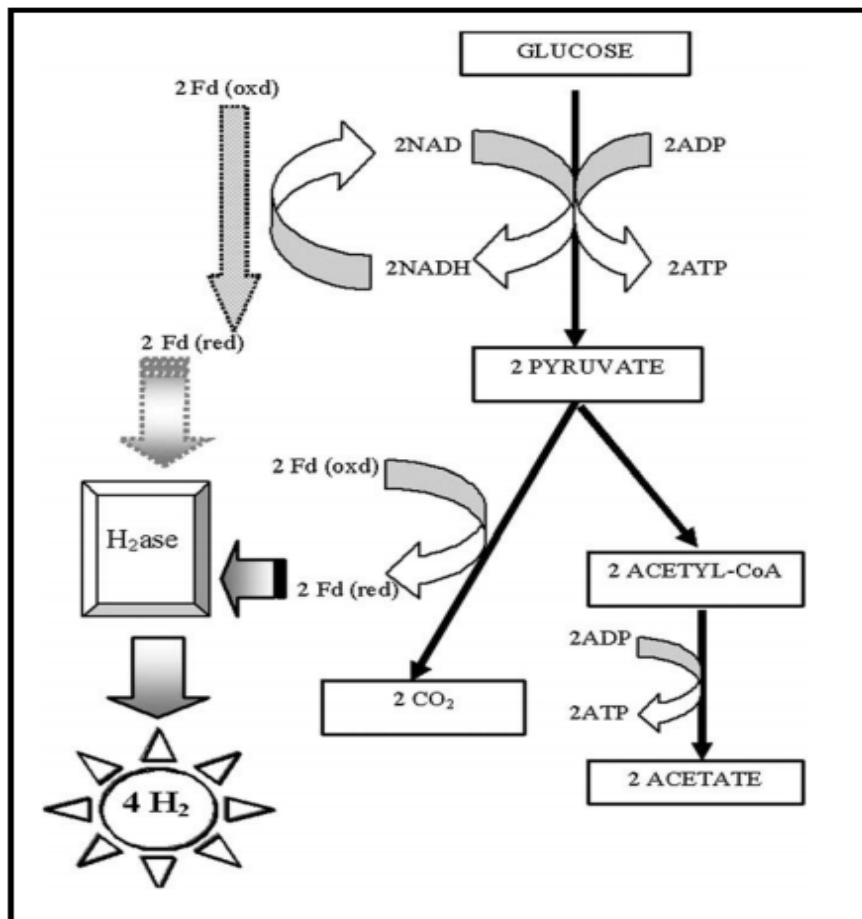


Figure 19: Schéma de la production d'hydrogène par fermentation chez *Clostridium* (Hallenbeck., 2009). Figure utilisée avec permission.

Tableau I : Avantages et inconvénients des voies métaboliques de production d'hydrogène indépendants de la lumière (Tekucheva et Tsygankov., 2012).

Voie métabolique et enzyme clé de la production de H ₂	Avantages	Inconvénients	Microorganismes
Fermentation Hydrogénase	<ul style="list-style-type: none"> -Utilise un grand nombre de substrats. -Peut utiliser les déchets organiques. -Présente un taux élevé de production de H₂. -Processus bien étudié. -Peut utiliser les consortiums microbiens au lieu des cultures microbiennes pures. 	<ul style="list-style-type: none"> -Rendement en H₂ théoriquement bas (4 moles/mole hexose). -Purification incomplète à cause des produits organiques issus de la fermentation. -Une haute pression partielle de H₂ inhibe le processus. -La méthanogénèse doit être empêchée. 	Beaucoup de microorganismes hétérotrophiques anaérobies, exemple : <i>Clostridium</i> .
Fermentation avec production de formiate et sa décomposition : HCCOH → H ₂ +CO ₂ /formate hydrogène lyase.	Anaérobie facultative.	Rendement théorique et actuel bas (2 moles H ₂ /mole hexose).	<i>Enterobacteriaceae</i>

Tableau II : Avantages et inconvénients des voies métaboliques de production d'hydrogène dépendants de la lumière (Tekucheva et Tsygankov., 2012).

Voie métabolique et enzyme clé de	Avantages	Inconvénients	Microorganismes
Photosynthèse anoxygénique en limitation d'azote/ nitrogénase	<ul style="list-style-type: none"> -Un haut rendement de dégagement d'hydrogène (surtout chez les BPNS) -Faible sensibilité à la pression partielle de H₂. -Haut rendement théorique d'hydrogène possible (12 moles H₂ / mole hexose). 	<ul style="list-style-type: none"> -Sensibilité aux composés azotés. -un nombre réduit de substrats utilisés. -Faible efficacité (a besoin d'électrons et d'ATP). 	Bactéries photosynthétiques anoxygéniques, fixatrices d'azote (bactéries pourpres sulfureuses et non sulfureuses et les bactéries vertes).
Photosynthèse anoxygénique dans un environnement réduit/réversible hydrogénase	<ul style="list-style-type: none"> -Efficacité relativement haute du processus (Pas besoin d'ATP). 	<ul style="list-style-type: none"> -Le processus est seulement possible transitoirement lors d'une réduction de la chaîne de transport d'électron. -Une haute pression partielle d'hydrogène inhibe le processus. 	Bactéries photosynthétiques anoxygéniques ou cyanobactéries.
Photosynthèse oxygénique / Hydrogénase	<ul style="list-style-type: none"> -Transforme l'énergie solaire en hydrogène avec une stoechiométrie proche de la réaction de décomposition de l'eau. -Séparations temporelle et spatiale des synthèses de O₂ et H₂. -Haute efficacité et haut rendement de production d'H₂ (les micro-algues). 	<ul style="list-style-type: none"> -Un rendement bas de production d'hydrogène. -Efficacité basse (Besoin d'électron et d'ATP). -Le processus est seulement possible transitoirement au début de l'illumination de la culture après une croissance anaérobie à la noirceur (chez microalgues). 	Cyanobactéries fixatrices d'azote : unicellulaires à cultures synchronisées (séparation temporelle) et hétérocystes (séparation spatiale). -Micro-algues avec hydrogénase.

4. Description du projet de recherche :

L'AmtB est une protéine membranaire impliquée dans la détection et le transport d'ammonium à travers la membrane ainsi que le contrôle de l'activité de la nitrogénase. De nombreuses études ont été entreprises afin de déterminer les détails de ces mécanismes complexes par l'examen des résidus conservés qui constituent ce transporteur. Ceci en les modifiant par mutagenèse dirigée pour connaître en particulier leurs implication dans la régulation de l'activité de la nitrogénase. Ainsi, l'examen du résidu W237 muté en A237 a démontré que cet acide aminé est nécessaire à l'ADP ribosylation.

D'autre part, *R. capsulatus* produit du biohydrogène par photofermentation via la nitrogénase ce qui en fait un candidat intéressant pour la recherche et le développement des énergies vertes.

La première partie de mon projet de recherche a donc consisté à construire un mutant de l'acide aminé W237 en F237 par mutagenèse dirigée par PCR pour pouvoir par la suite connaître l'effet de cette mutation sur l'activité de la nitrogénase et sa régulation. La deuxième partie de ce mémoire a été consacrée à l'étude de la souche DG9 de *R. capsulatus* dépourvue d'AmtB. Cette bactérie a été cultivée sur des milieux de cultures contenant chacun un acide aminé différent (glutamine, arginine, proline et sérine) afin de déterminer la source d'azote idéale pour l'utilisation future de cette souche dans la bio-production d'H₂. L'activité de la nitrogénase a été mesurée par CPG et la modification (ou non) de la sous unité Fe de l'enzyme par ADP ribosylation ainsi que la détection des protéines GlnK et DraG ont été analysées par Western blot.

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Souches bactériennes et plasmides :

Tableau III : Caractéristiques des souches bactériennes et plasmides utilisées.

Souche	Caractéristiques	Référence
<i>E. coli</i>		
DH5alpha	F- $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ <i>U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK,</i> <i>mK⁺) phoA supE44 λ thi-1 gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen
S. 17. 1	RP4-2-Tc Mu Km Tn7 <i>pro res</i> <i>, mod⁺ Tp^r Sm^r</i>	Simon et al ., 1983
<i>R. capsulatus</i>		
JP91	Souche sans marqueur <i>hup</i> (<i>hup⁻</i>) dérivative de B10	Dr. John Willison
DG9	$\Delta amtB::kan^R$	Dr Dipankar Ghosh

2. Culture bactérienne :

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37 C° pendant 24 h dans 5 ml de LB (Luria-Bertani) additionné de 100 µg/ml d'ampicilline en condition d'aérobiose et sous agitation dans un incubateur (Thermo scientific, model MAXQ 5000). La culture en milieu solide (sur Pétri) se fait sur environ 25 ml de LB-Agar contenant l'antibiotique approprié dans incubateur à 37 C° pendant 24 h.

Composition du milieu LB liquide/ solide : 10 g de bacto-tryptone, 5 g d'extraits de levure, 10 g NaCl, 1 litre d'eau distillée/ajouter 15 g d'Agar au mélange. Le milieu a été autoclavé et refroidi avant d'ajouter l'antibiotique nécessaire. Dans le cas du milieu solide, les boites de Pétri sont coulées sous une hotte laminaire (environmental air control INC), refroidi pendant 30 minutes puis conservées dans un réfrigérateur à 4 C° (Cotts et al, 2002).

Les expériences de photo-fermentation ont été effectuées avec des cultures de 100 ml, inoculés (5% (v / v)) à partir d'une culture en phase logarithmique tardive de croissance, dans un milieu RCV-glucose dans des flacons à sérum scellés avec des bouchons en caoutchouc

butyle et rendus anaérobiques par l'argon pendant 15 min. Les cultures ont été incubées pendant 6 jours à une température contrôlée de 30 ° C dans un bain d'eau. Les cultures ont été illuminées avec six ampoules halogènes 50 watts placées à 25 cm des récipients de culture et l'intensité de la lumière a été ajustée à l'aide d'un potentiomètre pour donner l'intensité lumineuse requise.

Les souches de *R. capsulatus* ont d'abord été cultivées dans du YPS. Pour cela, un inoculum de 1 ml à partir d'une culture en batch dans un bioréacteur a été ajouté à 16 ml de milieu YPS contenu dans un tube à visse, préalablement stérilisé et additionné d'antibiotiques (Weaver et al, 1975). Les tubes ont été incubés à 30 C° pendant 24 h dans des conditions d'anaérobiose et en présence de lumière dans un incubateur doté de trois ampoules de 150 watts. Le milieu YPS est composé de 2 mM de CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 0.3 % d'extraits de levure et 0.3 % de peptones dissouts dans de l'eau distillée puis stérilisé. La deuxième étape de croissance commence par le transfert de 1 ml de la culture en YPS dans un tube à visse complètement rempli de RCV stérile additionné de 30 mM de (NH₄)₂SO₄⁺ et des antibiotiques nécessaires (dans le cas de cette thèse de la kanamycine 15 mg/ml). Enfin, une autre culture a été réalisée en inoculant 1 ml de la culture *R. capsulatus* dans 17 ml de RCV sans source d'ammonium. Les conditions de croissance et d'incubation sont les mêmes que celles utilisées pour le milieu YPS.

Composition du milieu RCV liquide : 66 ml de 60 % de sodium lactate, 30 ml de 0.64 M tampon phosphate pH 6.8 (stérilisés séparément avant d'être mélangés aux autres composants afin de ne pas former de précipité), 50 ml de supersalts (composé de 40 ml de 1 % d'EDTA, 48 ml de 0.5 % de FeSO₄ 7 H₂O, 20 ml de 20 % MgSO₄, 20 ml de 7.5 % CaCl₂, 0.1 g/100 ml de Thiamine-HCl) ajouté à 20 ml d'oligo-éléments (constitués de 10 mM MnSO₄H₂O, 0.16 mM Cu(NO₃)₂3H₂O, 0.83 mM ZnSO₄7H₂O et 3.28 mM NaMoO₄2H₂O dissouts dans 250 ml d'eau distillée). Pour obtenir du RCV solide, 3.75 g d'agar est ajouté au mélange. Le tout est ensuite autoclavé pour être utilisé. Les tubes sont incubés dans une chambre froide en présence de lumière et les Pétri de RCV-agar sont conservés dans des jarres anaérobies.

3. Extraction plasmidique (Miniprep):

L'isolation de plasmides a été effectuée par lyse alcaline et par utilisation du kit *Geneaid High speed plasmid mini kit*. Il est à noter que le protocole chimique présente un meilleur rendement.

La concentration de l'ADN plasmidique a été mesurée par le spectrophotomètre NanoDrop (ND-1000) ou par mesure de la fluorescence des bandes migrées sur gel d'agarose. La première étape consiste à inoculer 5 ml de LB liquide contenant de l'ampicilline avec la colonie bactérienne désirée. Les tubes sont incubés à 37 C° pendant 16 h avec agitation. Après croissance, les culots (cellules bactériennes) sont récupérés par centrifugation (12470 xg pendant 5 min) et resuspendues dans 1 ml de la solution I glacée. Ensuite, 2 ml de 0.2 N NaOH/1 % SDS (frais) sont ajoutés à la suspension et mélangés par inversion. La lyse des cellules se fait après addition de 1.5 ml de la solution III glacée, le tout est mélangé par inversion du tube et centrifugé à 12470 xg pendant 10 min à 4 C°. Le surnageant est ensuite récupéré et précipité avec 2.5 volume d'isopropanol glacé (mélange par inversion) et encore une fois centrifugé à 12470 xg pendant 10 min à 4 C°. A ce stade, le surnageant est jeté et les culots contenant l'ADN plasmidique, sont conservés.

L'ADN est par la suite lavé à l'alcool 70 % et 100 % puis séché soit à l'air ambiant ou sous vide. Enfin, ce dernier est resuspendu dans de l'eau distillée stérile et traité avec 2 µl de RNase pendant 5 min.

Solution I : 10 mM EDTA, 25 Mm Tris pH 8.0. Conservée à 0 C°.

Solution II : 0.2 N NaOH et 1% SDS.

Solution III : 3 M K-acétate pH5.

4. Mutagenèse dirigée par PCR:

Le mécanisme exact de transport de l'azote à travers l'AmtB reste encore méconnu. Mieux comprendre ce processus implique donc la connaissance du rôle de chacun des acides aminés conservés qui constituent ce pore.

Dans notre laboratoire, la mutagenèse dirigée par PCR est la technique de référence dans l'étude de certains de ces résidus conservés. Pour des raisons techniques, les mutations sont effectuées sur des plasmides chez *E. coli* puis le transfert est réalisé chez *R. capsulatus* par conjugaison. Il faut tout d'abord construire deux amorces avec l'amorce sens qui contient la

mutation désirée et l'amorce antisens intacte. Elles sont utilisées pour amplifier et muter le plasmide portant le gène cible autrement dit pAY98. J'ai muté le codon TGG qui encode le tryptophane (représenté en rouge dans la séquence d'AmtB) à la position 237 en TTT qui encode la phénylalanine grâce aux amorces suivantes :

Amorce forward :

5'TCTGGGTCGGCTTTTTCGGCTTCAA3'

Amorce reverse :

5'GAGGTCGCCTCAAGGTTGGACCCGGCG3'

>Portion de la séquence d'AmtB

CTCGGCGGTGATCCTCTTCACCGTGCTTTGGGTCACCGTGGTCTATTTCCCGAT
CGCCACATGGTCTGGGATGCCTCGGGTCTGATCTTCAACTGGGGCGCCATCG
ACTTTGCCGGCGGCACCGTGGTGCATATCAACGCCGGGATCACCGGTCTGATG
GCGGCGATCGTTCTGGGGCCGCGCGTCGGTTTCGGCCGCGAGAACATGGCCCC
GCATTTCGATGACGCTGACCATGGTGGGCGCGATGATGCTCTGGGTCTGGCTGGT
TCGGCTTCAACGCCGGGTCCAACCTTGAGGCGACCTCGGGCGCGACGCTGGCG
ATGCTGAACACCTTTGTTGCCACCGCCGCGGCCGTCGTCAGCTGGTTCGGCCACC
GAAGCGCTGTTCCGCGGCAAGGCCTCGGGTCTGGGCGCGGCTTCGGGCATGGT
CGCCGGTCTGGTGGCGATACCCCGGCCTGCGGCACCTCGGGCCCGGTTCGGCG
CGATCCTGCTTGGCCTGATCGTCTCGCCGGTGTGCTACTTCTTCGTCACCAAGG

Pour la réaction d'amplification par PCR, le plasmide pAY98 a été amplifié en utilisant l'enzyme Q5 Phusion *high fidelity* DNA polymérase (New England Biolabs). Le choix de cette enzyme s'est fait sur la base d'un taux d'erreur très bas lors de son utilisation (100 fois plus bas que celui de la *Taq DNA polymerase* et 12 fois plus bas que celui de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) *DNA polymerase*). Aussi, c'est une ADN polymérase thermostable avec une activité 3' → 5' exonucléase capable d'amplifier des plasmides de grande taille.

Ainsi, pour un volume de 50 µl, chaque tube de PCR contient : 10 µl de 5X Q5 *buffer*, 10 µl 5X Q5 *high fidelity GC enhancer*, 4 µl de 2.5 mM dNTP, 2.5 µl de 10 uM *forward primer*, 2.5 µl de 10 µM *reverse primer*, 1µl (50 ng) d'ADN (plasmide pAY98), 0.5 µl Q5 enzyme et 19.5 µl H₂O distillée stérile. La réaction a été faite dans le *thermocycleur Perkin Elmer, Gene Amp, PCR system 2400* pendant 30 cycles avec: une première dénaturation à 98 C° pendant 10 sec, une seconde dénaturation à 98 C° pendant 10 sec. Suivie d'une hybridation programmée à 65 C° pendant 30 sec et d'une extension à 72 C° pendant 3 min. L'extension finale se fait à la même température mais pour 10 min. Le produit de PCR a été soumis à une

digestion avec DpnI. Cette enzyme coupe les ADN méthylés et permet donc d'éliminer les brins parentaux (non mutés) de pAY98 pour ne garder que ceux qui sont mutés.

La digestion de pAY98 terminée, le plasmide a été phosphorylé à son extrémité 5' grâce à polynucléotide kinase (afin de faciliter la ligation et donc par la suite la transformation) puis ligué et transformé dans la souche DH5alpha. Le plasmide a ensuite été extrait et vérifié par séquençage, triple digéré par des enzymes spécifiques, migré et purifié du gel d'agarose puis cloné dans pJB3T20. Enfin, ce vecteur navette a été transformé dans la souche S.17.1.

5. Digestions :

Concernant la DpnI, 4 µl de produit de PCR a été transféré dans un tube stérile ajouté à 30 µl H₂O stérile distillée, 4 µl 10X *fast digest buffer* et 1 µl de l'enzyme DpnI (20 000 unités/ml). Le tube a alors été incubé à 37 C° pendant 1h puis désactivé à 80 C° pendant 20 min. Une triple digestion a été effectuée grâce aux enzymes EcoRI, PstI et AatII. Les deux premières servent à couper l'insert (dans pAY98) portant la mutation pour ensuite le cloner aux mêmes sites de restrictions dans pJB3Tc20. L'AatII a été utilisée pour digérer le reste du brin de pAY98 non muté et l'éliminer avant l'étape de migration et purification à partir du gel d'agarose.

La réaction s'est faite comme suit :

D'abord la double digestion EcoRI-PstI 6 µl de 10X *buffer* NEB 3 (New England Biolabs), 0.5 µl BSA, 15 µl pAY98, 1µl EcoRI (20 000 unités/ml), 1 µl PstI (20 000 unités/ml), 36.5 µl d'eau distillée stérile. Elle est incubée à 37 C° pendant 1h, les enzymes ont ensuite été désactivées à 65 C° pendant 10 min. Pour la digestion avec AatII, 20 µl de produit de la précédente digestion a été mélangé à 6 µl de 10X *buffer* NEB 4 (NEB), 0.5 µl BSA, 15 µl pAY98, 1µl de l'enzyme AatII (20 000 unités/ml), 32.5 µl d'eau distillée stérile. L'incubation à 37 C° a duré 1h tandis que la désactivation à 65 C° a duré 20 min.

6. Migration et extraction de l'ADN à partir du gel d'électrophorèse :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet la séparation de macromolécules (dans notre cas l'ADN) selon leur taille et leur charge sous l'effet d'un champ électrique. La mise en place d'un gel à 0.7 % d'agarose est faite en mélangeant 0.35 g de poudre d'agarose avec 50 ml de tampon 1X (TAE) (dilué à partir d'un stock de 50X Tris Acétate EDTA lui-même composé de 0.48 % Tris, 1.14 ml d'acétate glacial et 0.0037 % EDTA et d'eau distillée pour compléter le volume à 1 L). L'étape du chauffage au micro-ondes permet à la poudre de dissoudre dans le tampon et former un mélange homogène. Un

colorant fluorescent sous ultraviolets quand il se lie à l'ADN, le bromure d'éthidium (0.5 µg/ml) est ajouté au gel encore liquide (tandis que dans le cas d'extraction d'ADN, c'est après migration que le gel est déposé et coloré dans un bain contenant du bromure d'éthidium). Le gel est ensuite versé dans un support en plastique dans la chambre d'électrophorèse, un peigne est ajouté pour former les puits dans le gel après polymérisation. Une fois solidifié, le peigne est retiré et le gel doit baigner dans la solution tampon 1X TAE. Les échantillons sont préparés en mélangeant le colorant 6X *loading dye* avec l'ADN ainsi qu'un marqueur (fragments d'ADN de taille connue) NEB 1kb DNA *ladder* sont placés dans les puits à l'extrémité de la plaque d'agarose. La migration se fait par connexion des électrodes de la chambre d'électrophorèse à un courant électrique de 100 V. Une fois migrées, les bandes d'ADN peuvent être observées et/ou coupées suite à une exposition aux UV. Avant la ligation de l'insert muté dans pJB3Tc20, les fragments de restriction de la triple digestion de pAY98 ainsi que la double digestion de pJB3Tc20 ont été migrés dans le gel d'agarose. Celui ci a été placé dans un bain de bromure d'éthidium pendant 5 min puis dans un bain d'eau pour le rinçage et encore une fois dans le colorant. Les bandes ont été visualisées par transilluminateur UV, coupées selon la correspondance de la taille au marqueur et placées dans des tubes. Le kit Qiagen *gel extraction* a été utilisé pour extraire et purifier l'ADN du gel.

7. Phosphorylation de l'extrémité 5' du plasmide pAY98 :

L'extrémité 5' du plasmide pAY98 a été phosphorylée comme suit : 30 µl de produit de digestion DpnI a été mélangé à 3.5 µl de tampon T4 ligase et 1.8 µl d'enzyme polynucleotide (10 000 unités/ml) kinase. La réaction a été incubée à 37 C° pendant 30 à 60 min et l'inactivation s'est faite à 65 C° pendant 20 min.

8. Ligation :

Deux ligations ont été réalisées avant transformations dans les cellules compétentes DH5alpha et S. 17. 1. Dans le premier cas, le produit de PCR digéré avec DpnI a du être refermé pour rendre le plasmide circulaire et donc sous cette forme faciliter sa transformation dans les cellules compétentes DH5alpha. L'enzyme T4 ligase (400 unités/ml) a été utilisée dans cette réaction et l'incubation s'est faite durant la nuit dans un bain à 16 C° (Microcooler, BOEKEL industries. INC. Model 260011). Dans la deuxième réaction, l'insert muté *RcamtBW237F* a été ligué aux sites EcoRI et PstI de pJB3Tc20 avec un ratio insert/vecteur de 4 pour 1 avec 1µl la T4 ligase dans les même conditions d'incubation.

9. Séquencage :

Cette étape est cruciale car elle permet de vérifier l'obtention de la mutation désirée (*amtBW237F*) et donc de passer aux autres étapes de clonage. Le séquençage du gène *amtB* a été réalisé par la plateforme génomique de l'institut de recherche en immunologie et cancérologie IRIC en utilisant les deux amorces suivantes :

Amorce sens n°1 :

5' TGTAAGAACCACAGGGGAAAC 3'

Amorce antisens n°2 :

5' TTCGATGACGCTGACCATGG 3'

10. Préparation des cellules compétentes :

La méthode employée pour rendre les cellules compétentes consiste à utiliser du CaCl_2 avec choc thermique au froid. Pour commencer, des cultures de 5 ml de cellules (DH5alpha ou S. 17.1) à partir d'un glycerol stock ont été incubées toute la nuit à 37 C° sous agitation. Elles ont ensuite été diluées au 1/50 dans du LB puis remises à croître pendant 2 h à 37 C°. Lorsque la D.O a atteint 0.5 à 0.6, les cellules ont été centrifugées à 12470 xg pendant 10 min à 4 C°. Le surnageant a été jeté et les cellules ont été placées dans la glace pendant 15 min. Ces culots ont été resuspendus dans 1 ml de CaCl_2 à 0.1 M. Elles ont encore une fois été centrifugées pendant 5 min et placées dans la glace puis resuspendues dans 200 μl de 0.1M de CaCl_2 glacé prêtes à l'emploi ou gardés à -80 C°.

11. Transformation :

Les produits de ligation aux différentes étapes du clonage ont été transformés dans les cellules compétentes DH5alpha et/ou la souche S. 17.1 :

Le plasmide pAY98 portant *RamtBW237F* digéré avec DpnI et ligué a été transformé dans DH5alpha. Ensuite, *RamtBW237F* cloné dans pJB3Tc20 a d'abord été inséré dans DH5alpha puis dans la souche S. 17.1.

Le protocole utilisé est le suivant :

Les cellules compétentes auparavant conservées à -80 C° ont été décongelées dans la glace et légèrement secouées afin de les mélanger. Un à 50 ng d'ADN dans un volume maximal de 10 μl a été mélangé à 100 μl de cellules compétentes et les tubes ont été placés dans la glace durant 10 min. Un choc thermique a ensuite été fait pendant 45-90 secondes à 45 C° et 2 min

dans la glace. Après avoir ajouté 800 µl de LB dans les tubes, ces derniers ont été placés dans un incubateur à 37 C° pendant 1h avec agitation et centrifugées à 14460 xg pendant 1 min. Enfin, les cellules ont été resuspendues dans 100 µl de LB et étalées sur géloses LB-ampicilline et incubées à 37 C° durant la nuit.

12. Clonage de *RcamtBW237F* dans *pJB3Tc20* :

Afin de cloner le fragment *RcamtBW237F* dans le vecteur *pJB3Tc20*, le plasmide *pAY98-RcglKamtBW237F* résultant de la mutagenèse dirigée a été digéré avec *EcoRI* et *PstI*, migré sur gel pour couper et purifier la bande correspondant à l'insert muté. Ce dernier a ensuite été ligué avec *pJB3TC20* préalablement digéré avec les mêmes enzymes de restriction. La ligation a ensuite été transformée dans les cellules compétentes *DH5alpha* puis dans la souche *S. 17. 1*. L'utilisation du vecteur *pJB3Tc20* ainsi que le type de cellules compétentes *S. 17. 1* est d'un grand intérêt dans le clonage dans *R. capsulatus* car ils facilitent la conjugaison. En effet, le premier possède un opéron (*tra*) qui code pour un pili nécessaire au transfert par conjugaison et le deuxième un gène de *mob* pour déplacer le plasmide dans *R. capsulatus*.

13. Conjugaison :

Après transformation dans la cellule *S. 17. 1* le plasmide muté doit être transféré dans *R. capsulatus* par conjugaison. Pour cela, le transformant est cultivé dans du LB à 37 C° pendant 16 h avec de la tétracycline. La souche de *Rhodobacter* est cultivée dans du YPS à 30 C° pendant 48 h. Après croissance, 50 µl de chaque culture est mélangé dans un tube et le mélange est ensuite étalé sur 2 cm² au centre d'une boîte de pétri contenant du YPS (sans antibiotique). L'incubation se fait à 30 C° pendant 24 h en absence de lumière. Le lendemain, les bactéries sont resuspendues dans 1 ml de RCV dépourvu de source de carbone et d'azote et sans antibiotique. Différentes dilutions sont ensuite réalisées et étalées sur des boîtes contenant du RCV additionné de tétracycline. Enfin, les boîtesensemencées sont incubées anaérobiquement (le sachet *gas pack* confère l'anaérobie) à 30 C° en présence de lumière dans une jarre *biotronette Mark III Environmental Chamber* jusqu'à l'apparition de colonies rouges sur les milieux de culture.

14. Dosage de l'activité de la nitrogénase *switch on/off* :

Cette expérience permet de déterminer l'impact des mutations sur l'activité de la nitrogénase, elle se base sur une technique indirecte qui consiste à mesurer la réduction de l'acétylène (C₂H₂) en éthylène (C₂H₄) par chromatographie à phase gazeuse. Cette réduction indique la

fixation de l'azote et donc de l'activité de la nitrogénase. Avant de commencer l'expérience, il faut s'assurer que l'appareil est réglé sur les paramètres suivants : une pression d'hydrogène de 0.5 Kg/cm², le porteur de pression de gaz I de 1 Kg/ cm² et une pression de gaz primaire de 3 Kg/cm². Les souches de *R. capsulatus* sauvage JP91 (contrôle positif) et mutante DG9 sont d'abord cultivées dans des tubes à visse de 17 ml contenant du YPS ou RCV+30 mM NH₄⁺ puis transférées dans un autre tube contenant cette fois du RCV sans NH₄⁺.

Après avoir ôté l'air contenu dans les flacons de verre de 25 ml et ajouté de l'argon (traitement pendant 10 min), 5 ml de culture a été transféré dans chacun d'eux à l'aide d'une seringue. Avec une autre seringue, 2 ml de C₂H₂ (obtenu à partir du carbide de calcium) ont été introduits dans les flacons après une incubation de 15 min à la lumière sous agitation avec une température maintenue à 30 C° durant toute l'expérience. Un prélèvement de 50 µl de gaz a été effectué à 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 minutes et injecté dans le chromatographe. Lorsque le chronomètre atteint les 20 min, 100 µl de NH₄Cl (10 mM) est injecté dans les flacons et le prélèvement de gaz reprend jusqu'à la fin de l'expérience. L'acétylène produit a ensuite été calculé à partir du graphe. Des échantillons de 400 µl de la phase liquide destinés au western blot ont aussi été prélevés aux mêmes intervalles de temps pour vérifier l'ADP ribosylation de la protéine Fe.

15. Dosage des protéines par la méthode de Bradford :

La concentration de protéines membranaires et cytoplasmiques a été quantifiée par le kit Thermo scientifique coomassie plus. Une série de dilution de standards dont le BSA (sérum albumine bovin) a été effectuée et comparée aux échantillons auxquels le réactif Bradford a été ajouté (mélange de 1.5 ml de réactif Bradford pour 60 µl d'échantillon incubé 5 à 20 min à la température de la pièce). Ce produit coloré par bleu de coomassie change de couleur en fonction de la quantité de protéine contenue dans l'échantillon. Les absorbances ont été lues à une longueur d'onde de 595 nm dans le spectrophotomètre (UV-VIS UV-2101PC Shimadzu).

16. Migration sur gel de polyacrylamide SDS-Page et transfert sur PVDF :

C'est une méthode de séparation des protéines selon leur masse moléculaire dans deux gels de polyacrylamides. Le premier est appelé 'gel de séparation', il est composé de 4.2 ml d'acrylamide/ bisacrylamide (30 :0.8) à 12.5 % ,2 ml Tris HCL 1.9 M pH 8.8, 100 µl SDS à 10 %, 50 µl APS (persulfate d'ammonium), 5 µl de TEMED et 3.7 ml d'eau distillée. Le second nommé 'gel de concentration' est constitué de 0.67 ml d'acrylamide /bisacrylamide

(30 :0.8), 1.25 ml Tris 0.5 M pH 6.8, 50 µl SDS à 10 %, 25 µl APS (persulfate d'ammonium), 10 µl de TEMED et 3.25 ml d'eau distillée. Cette technique implique l'action du SDS (sodium dodécyl sulfate), un détergent anionique qui s'attache aux protéines pour les dénaturer et les charger négativement. Pour cela, 100 µl (3 µg de protéine totale) de chaque échantillon prélevé lors du dosage de l'activité de la nitrogénase a été mélangé à 50 µl de tampon 3X SDS et incubé à 80 C° pendant 10 min. Ces échantillons et un marqueur spécifique ont ensuite été migrés dans du tampon de migration à 200 V pendant une heure.

17. Western blot :

17.1. Transfert sur la membrane :

Lorsque la migration s'est terminée les protéines séparées étaient prêtes à être transférées sur une membrane PVDF. Cette membrane a été plongée successivement dans du méthanol, de l'eau distillée puis dans du tampon de transfert pendant 30 secondes. En même temps, le gel a été baigné dans du tampon de transfert pendant 10 min, deux papiers Whatman et deux éponges en mousses ont été traitées avec de l'eau puis du tampon de transfert. Tout a ensuite été assemblé dans une cassette de transfert selon un ordre précis : éponge, papier Whatman, membrane, gel, papier Whatman et enfin l'autre éponge. Le transfert s'est fait à 16 V pendant 16 h dans un *mini trans blot* de Bio-Rad.

17.2. Détection avec les anticorps primaires et secondaires :

A cet effet, la membrane a été incubée dans plusieurs tampons. Elle a d'abord été incubée et agitée dans 50 ml de TBS (1X) (constitué de 3.029 g de Tris 25 mM pH 7.4, 8.77 g de NaOH et de l'eau distillée) pendant 5 min. Puis dans 50 ml de solution de blocage (mélange de TBS (1X), 0.5 ml tween 20, 0.1 % de poudre de lait et de l'eau distillée). Suivi de deux lavages dans 50 ml TBST 5X (TBS 5X + Tween 20 (0.1 %)) pendant 5 min avec agitation. Après cela, 5 µl de l'anticorps A et 5 µl de l'anticorps B ont été ajoutés à la membrane dans 25 ml de TBST 1X additionné de 0.5 % de poudre de lait. L'incubation a duré 2 h à 4 C° (avec agitation). Afin d'ajouter les anticorps secondaires, la membrane a été lavée deux fois avec 50 ml de 5X TBST pendant 5 min sous agitation avant d'être transférée dans une solution de blocage faite de 25 ml TBST 1X, 0.5 % de poudre de lait à laquelle 50 µl d'anticorps secondaire a été ajouté. La réaction a été incubée pendant 1 h 30. Les deux dernières incubations pour la détection des protéines consistent en 2 lavages dans 50 ml de TBST 5X pendant 5 min et une autre dans 50 ml de TBST 1X pendant 5 min (toujours avec agitation).

Enfin, pour révéler les protéines sur la membrane (reconnues par les anticorps) une image a été prise grâce au kit *Mandel Scientific LumiGlo Chemiluminescent substrat* et le film photographique *Classic blue autoradiography BX film* et d'un développeur de film à rayon X.

18. Étude de l'effet de NH_4 sur l'activité de la glutamine synthétase (GS) :

En premier lieu, différentes souches de *R. capsulatus* ont été cultivées dans des conditions photohétérotrophiques/anaérobies dans du RCV sans source d'azote.

Cinqs millilitres de ces cultures ont été introduits dans des flacons scellés pour être traités à l'argon pendant 10 min (comme dans la mesure de l'activité de la nitrogénase) et incubées à température ambiante pendant 15 min. Deux millilitres d'acétylène ont par la suite été introduits dans les flacons dans le bain à 30 C° avec un agitateur relié au CPG.

Pour analyser l'activité de la glutamine synthétase/transférase, deux séries de prélèvements de 1 ml d'échantillon a été faites. La première au début de l'expérience autrement dit en absence de NH_4^+ à 5, 10, 15 et 20 min. La deuxième a été réalisée 5 min après avoir ajouté 1 ml de NH_4Cl aux flacons au aux temps suivants : 25, 30, 35 et 40 min.

Ces échantillons ont alors été centrifugés puis resuspendus dans du MOPS à 0.94 mM et incubés à température pièce pendant 5 min.

Ensuite 100 μl de l'échantillon a été mélangé à 200 μl de la solution forward dans un tube maintenu froid dans la glace (94 mM MOPS, 47 mM hydroxylamine hypochlorite, 56 mM $\text{MgCl}_2/\text{MnCl}_2$, 168 mM glutamate, 94 mM CTAB, 0.36 mM sel de sodium et 25 mM arsenate de potassium pH 7.15). L'incubation s'est faite à 30 C° pendant 40 min et les D.O ont été lues à 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 min.

Chapitre III: Résultats

1. Étude du rôle de la protéine AmtB dans la régulation de l'activité de la nitrogénase chez *R. capsulatus* :

1.1. Création de mutants d'AmtB par mutagenèse dirigée :

Dans notre laboratoire, plusieurs mutants de la protéine membranaire AmtB ont été créés par mutagenèse dirigée afin de mieux comprendre le rôle et l'importance de certains résidus conservés de ce canal en termes de régulation de la nitrogénase.

Le codon conservé qui encode le tryptophane (TGG) à la position 237 a été modifié suite au remplacement de deux guanines (G) en tyrosine (T) via une mutagenèse dirigée par PCR pour obtenir à la place un résidu phénylalanine (TTT). Lors de cette PCR, un plasmide pAY98 contenant l'opéron *glnKamtB* de *R. capsulatus* aux sites de restrictions EcoRI et PstI a été utilisé comme matrice avec deux amorces spécifiques dont une contient la mutation désirée (amorce *forward*) et l'autre non (amorce *reverse*). Après amplification, le produit de PCR a été soumis à une digestion par DpnI afin d'éliminer l'ADN parental non recombinant suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose qui a permis de vérifier l'obtention de l'amplicon désiré. Ainsi, la figure 20 montre le produit de l'amplification (pAY98+W237F) qui doit avoir une taille d'environ 5kb en comparaison avec le marqueur *NEB DNA 1 kb ladder*.

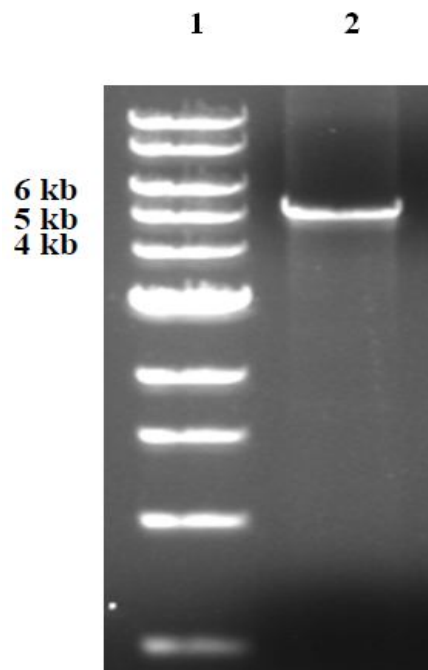


Figure 20: Produit de PCR digéré par DpnI dans un gel d'agarose de 0.7 %. **Puit 1 :** Marqueur *NEB DNA 1 kb ladder*. **Puit 2 :** Amplicon contenant le gène muté d'*AmtB*.

Après l'étape de vérification sur gel, les deux extrémités du plasmide pAY98 (préalablement digéré par DpnI) ont été phosphorylées par une T4 polynucléotide kinase (pour faciliter la ligation) puis liguées dans le but de refermer le plasmide muté avant sa transformation dans DH5alpha.

L'ADN a par la suite été extrait des transformants pour être séquencé à l'institut de recherche et de cancérologie (IRIC) et donc mettre en évidence la présence de la mutation au bon emplacement. Une portion du résultat de séquençage d'AmtB muté est représentée ci-dessous avec le codon cible en gras. Elle a été comparée à celle de la souche sauvage permettant de confirmer que le tryptophane a bien été transformé en phénylalanine au bon endroit et pour confirmer que la polymérase Q5 n'a pas introduit d'autres mutations.

Souche sauvage :

TGGGTCGGCT**TGG**TTCGGCTTCAACGCCGGGTCCAACCTTGAGGCGACCTCGGGC

Souche mutante :

TGGGTCGGCT**TTT**TTCGGCTTCAACGCCGGGTCCAACCTTGAGGCGACCTCGGGC

L'étape de séquençage terminée, le fragment nucléique muté doit être purifié. Pour cela, *glnKamtB* (avec le gène *amtB* muté) a été séparé du reste de pAY98 par digestions aux sites EcoRI et PstI comme montré par la figure 21 produisant deux bandes très proches : une de 2.2 kb correspondant au fragment muté et une autre de 2.8 kb correspondant à la partie restante de pAY98.

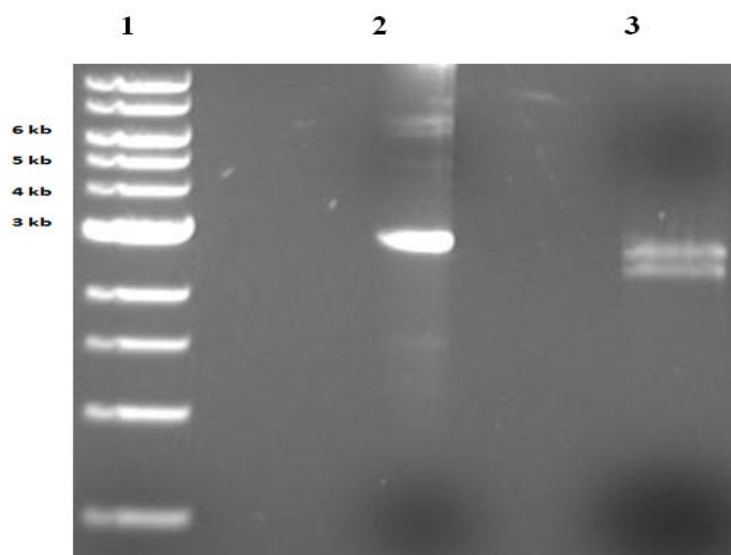


Figure 21: Double digestion du plasmide pAY98 avec EcoRI et PstI. **Puit 1 :** Marqueur *NEB DNA 1 kb ladder*. **Puit 2 :** Miniprep pAY98. **Puit 3 :** Plasmide pAY98 digéré avec EcoRI et PstI

Afin de faciliter l'extraction de la bande d'intérêt de 2.2 kb et ne pas prendre le risque de cloner la mauvaise bande, une troisième digestion avec AatII a été effectuée avant d'extraire l'ADN du gel. Cette enzyme a été choisie du fait qu'elle digère uniquement la portion de pAY98 qui ne contient pas l'*amtB* muté autrement dit cette enzyme digère uniquement la bande de 2.8 kb laissant le fragment cible intact.

Le vecteur pJB3Tc20 est quant à lui également digéré avec les enzymes EcoRI et PstI et purifié du gel tel que montré dans la figure 22. Il est à noter que le résultat de la double digestion indique seulement une bande d'environ 7 kb car la deuxième portion du plasmide est trop petite pour être observée sur gel d'agarose.

Une ligation avec la T4 ligase permet ensuite d'introduire et liguer la bande extraite de 2.2 kb dans le vecteur pJB3Tc20 purifié. Le produit de ligation est alors transformé dans DH5alpha puis dans les cellules compétentes S. 17. 1. Après vérification sur gels d'agarose de l'obtention des bandes de 2.2 kb seulement correspondant à l'insert et celle du vecteur Pjb3Tc20 (*tet^R*) de 7 kb ces dernières ont été purifiées liguées. Les clones ont été obtenus suite à la transformation réussie dans les cellules compétentes DH5alpha sur LB tétracycline puis dans les cellules compétentes S. 17. 1.

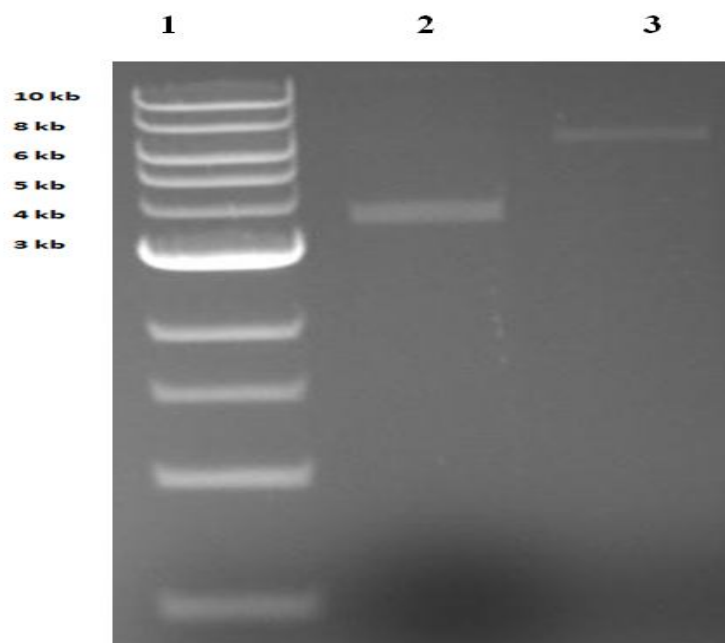


Figure 22: Vecteur pJB3Tc20 digéré par les enzymes de restriction EcoRI et PstI dans un gel d'agarose à 0.7 %. **Puit 1** : Marquer 1kb DNA NEB ladder. **Puit 2** : Miniprep de pJB3Tc20 non digéré. **Puit 3** : Digestion du plasmide pJB3Tc20 avec EcoRI et PstI.

1.2. Étude de la régulation de l'activité de la nitrogénase chez les souches de *R. capsulatus* DG9 et JP91 :

La régulation de l'activité de la nitrogénase chez les souches *R. capsulatus* DG9 et JP91 a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Comme mentionné plus haut dans la section, les souches de *R. capsulatus* JP91 (contrôle positif) et DG9 ont été cultivées pendant six jours dans des bouteilles contenant du milieu RCV avec différentes sources d'azote : glutamate, proline, sérine et arginine à la même concentration (4.5 mM) ainsi que du glucose comme unique source de carbone (35 mM) avec une intensité lumineuse de 175W/m² puis transférées dans du RCV dépourvu de source d'azote dans le but de provoquer l'expression de la nitrogénase.

Du fait de la haute sensibilité de cette enzyme à l'oxygène, les flacons de verre de 25 ml ont été traités à l'argon pendant 10 min pour éliminer l'air qui s'y trouvait. Puis, 5 ml de culture a été transféré dans chacun d'eux à l'aide d'une seringue.

Après une incubation de 15 min à 30 C°, 2 ml de C₂H₂ ont été introduits dans les flacons.

50 µl de la phase gazeuse a été prélevé à 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 min et injecté dans le chromatographe. Un choc d'ammonium a été réalisé à 20 min en ajoutant 200 µM de NH₄Cl aux flacons afin de connaître son effet sur l'activité de la nitrogénase. La mesure de l'éthylène produit continue jusqu'à la fin de l'expérience.

L'étude de l'activité de la nitrogénase chez la souche sauvage JP91 (voir figure 23) indique une augmentation linéaire de la production d'éthylène correspondant à la réduction de l'acétylène en éthylène par la nitrogénase. Cependant, lorsque 200 µM de NH₄Cl est ajouté, on remarque une inhibition de la production d'éthylène et donc l'inhibition de l'activité de la nitrogénase. Cette inactivation réversible le *switch off* ne dure que quelques minutes car une fois la source d'azote consommée l'enzyme reprend son activité normalement.

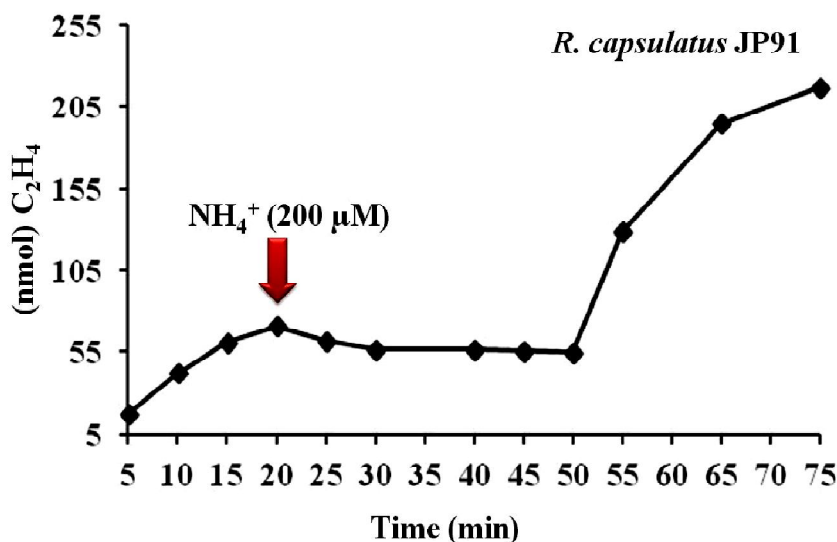


Figure 23 : Effet de l'addition d'ammonium *in vivo* sur l'activité de la nitrogénase (réduction de C₂H₂) chez *R. capsulatus* JP91 (type sauvage). La culture a été faite utilisant du glutamate (4.5 mM) et du glucose comme unique source de carbone (35 mM) avec une intensité lumineuse de 175W/m² pendant six jours. 200 μM de NH₄Cl ont été injecté 20 min après le début de l'expérimentation.

La même étude effectuée chez la souche mutante DG9 ($\Delta amtB$) montre que la production d'éthylène est linéaire et continue à augmenter même suite à l'ajout de NH₄Cl (voir figure 24). Ceci indique que l'activité de la nitrogénase n'est pas perturbée par l'addition d'ammonium et donc une absence de sa régulation par ADP ribosylation (absence de *switch off*).

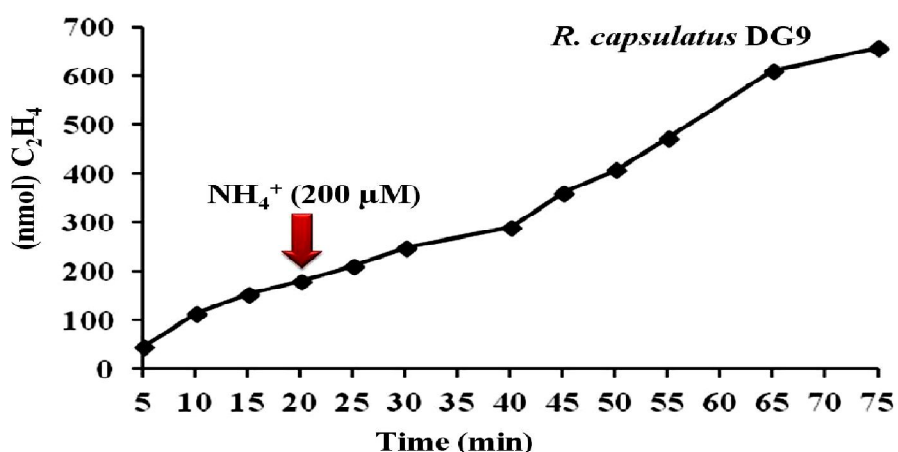


Figure 24 : Effet de l'addition d'ammonium *in vivo* sur l'activité de la nitrogénase (réduction de C₂H₂) chez *R. capsulatus* DG9.

Dans le but d'étudier l'influence de certains acides aminés sur la régulation de la nitrogénase, la réduction de l'acétylène en éthylène par cette enzyme a été étudiée chez les deux souches JP91 et DG9 par CPG après avoir réalisé différentes cultures de ces souches pendant six jours et ce avec différents acides aminés comme sources d'azote fixé : glutamate, proline, sérine et arginine. La comparaison des résultats (voir figure 25) entre les souches sauvage JP91 et mutante DG9 indique que lors de l'utilisation du glutamate la production d'éthylène par DG9 atteint presque le double de celui produit par JP91. L'absence d'ADP ribosylation est aussi une fois de plus confirmée. De plus, cette analyse a permis de révéler la production d'éthylène maximale lorsque la proline est utilisée lors de la croissance avec un taux de pour DG9 par rapport à JP91.

D'autres parts, l'activité la plus basse de la nitrogénase est retrouvée dans le cas de l'utilisation de la proline pour la souche sauvage. Avec de la sérine, l'activité de la nitrogénase est relativement semblable chez *R. capsulatus* JP91 et DG9 tandis que dans le cas de l'arginine, on remarque une légère augmentation de la réduction de l'acétylène en éthylène par DG9 en comparaison avec JP91.

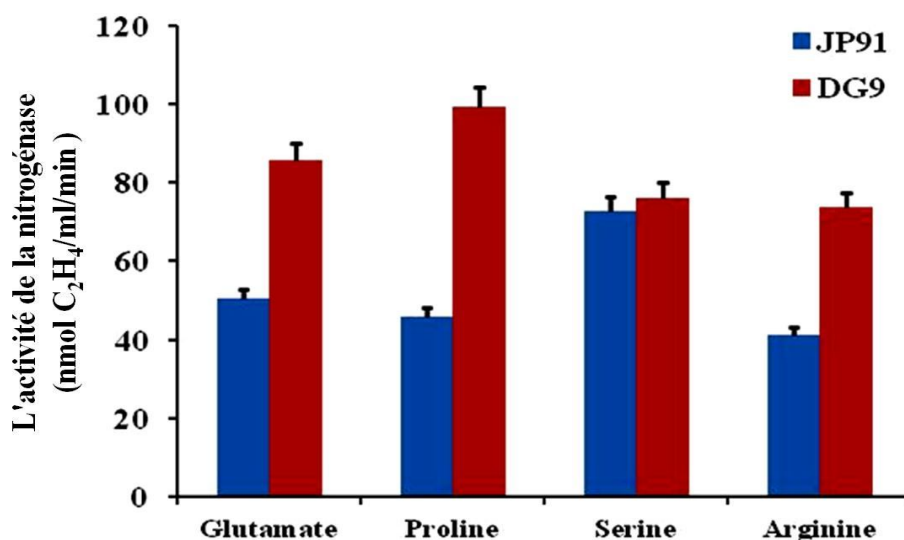


Figure 25 : Activité de la nitrogénase (réduction de C₂H₂) chez *Rhodobacter capsulatus* JP91 & DG9 cultivées sur différents acides aminés (Barres d'erreur affichées pour la série de graphique sélectionnée avec la valeur d'erreur de 5 %). Les souches sauvage et mutante de *R. capsulatus* ont été cultivées pendant six jours sur différents acides aminés : glutamate, proline, sérine et arginine (4.5 mM) avec du glucose (35 mM) comme seule source de carbone sous une intensité lumineuse de 175W/m². Pour la mesure de l'activité de la nitrogénase, des cultures de 5 ml dans des flacons de 25 ml ont été utilisées (avec un *headspace* de 20 ml).

1.3. Modification de la protéine Fe par ADP ribosylation :

Pour déterminer l'état de modification de la protéine nitrogénase (ou protéine Fe), 5 ml de la phase liquide prélevée de chaque échantillon lors de l'étude de l'activité de la nitrogénase ont été maintenus dans du tampon SDS puis migrés dans un gel SDS PAGE. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane PVDF. La détection de la protéine Fe a ensuite été réalisée par western blot par l'anticorps anti-Fe.

Ainsi, la souche JP91 a démontré une ADP ribosylation de la protéine Fe suite au choc d'ammonium (voir figure 26) tandis que chez le mutant *R. capsulatus* DG9 la protéine Fe n'a pas été modifiée par ADP ribosylation dans les conditions expérimentales et ce quelque soit l'acide aminé utilisé lors de la croissance de cette souche.

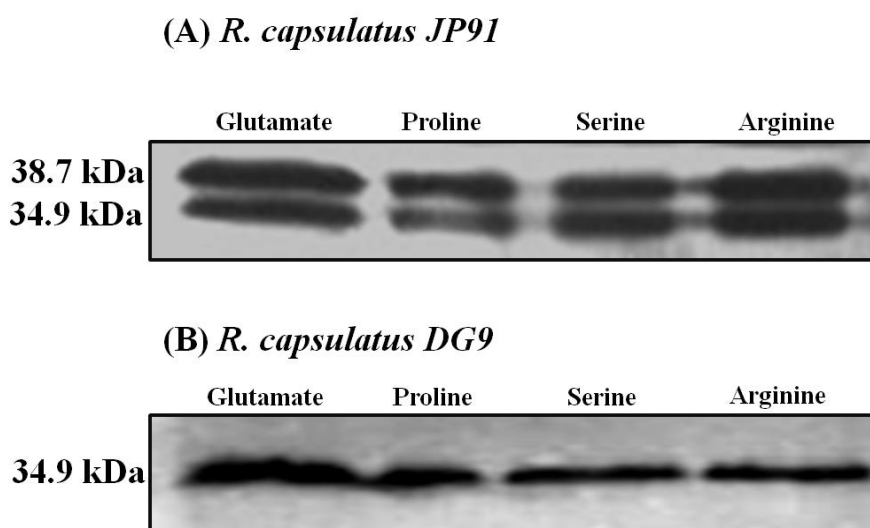


Figure 26: Western Blot pour l'ADP-ribosylation de la nitrogénase Fe. Les bandes supérieures (38.7 kDa) correspondent à la protéine Fe ADP-ribosylée. Les bandes inférieures correspondent à la forme monomérique de la protéine Fe non modifiée (34.9 kDa). Taille des bandes déterminées grâce au marqueur *NEB prestained 10-230 KDa marker*.

1.4. Détection de la protéine PII (GlnK) chez *R. capsulatus* JP91 et DG9 :

Afin de détecter l'expression de la protéine GlnK, les échantillons de culture prélevés lors de l'étude de l'activité de la nitrogénase chez *R. capsulatus* JP91 et DG9 ont été centrifugés puis resuspendus dans du RCV dépourvu de source d'azote (autrement dit sans acide aminé ajouté). Du tampon SDS 6X y a été ajouté l'incubation sans source d'azote s'est faite pendant une heure et la dénaturation a été faite à 80 C° pendant 15 minutes. Un gel SDS PAGE a été effectué avec ces échantillons suivi d'un western blot utilisant un anticorps anti GlnK pour détecter la protéine PII.

Ainsi d'après la figure 27, on observe une expression semblable de la protéine GlnK (12.3 kDa) chez les deux souches JP91 et DG9. L'acide aminé utilisé lors de la croissance bactérienne ne semble pas non plus être un facteur intervenant dans la production de cette protéine.

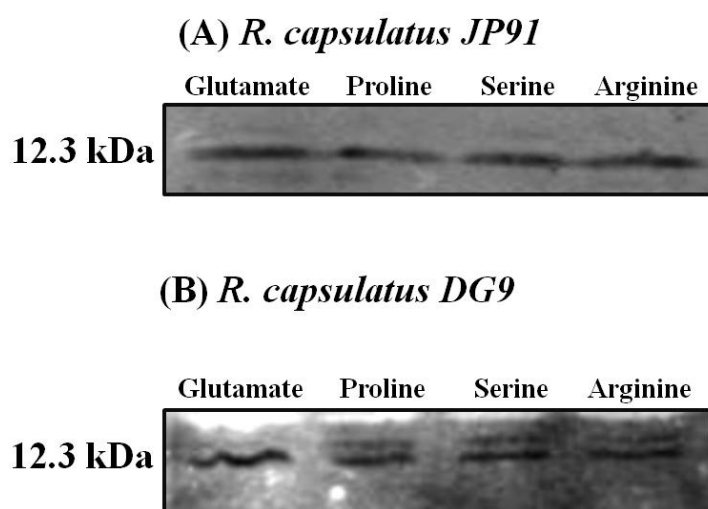


Figure 27 : Western Blot pour la détection de la protéine GlnK produite sous différentes conditions de culture des souches JP91 et DG9 de *R. capsulatus*. Taille de la bande déterminée grâce au marqueur *NEB prestained 10-230 KDa marker*. **(B)** La bande du bas correspond à la forme protéique de GlnK non modifiée (12.3 kDa). L'apparition de la bande du haut pourrait être expliquée par la possible interaction de GlnK avec d'autres protéines ou par une interaction non spécifique des anticorps avec d'autres protéines.

1.5. Détection de la protéine DraG chez *R. capsulatus* JP91 et DG9 :

La régulation de l'activité de la Mo-nitrogénase par ADP ribosylation fait intervenir le duo de protéines à rôles antagonistes DraT/DraG. La première provoque une modification covalente de la sous unité Fe de la nitrogénase lors d'un choc d'ammonium (*switch off*) tandis que DraG enlève le groupement ADP ribose de la protéine Fe lorsque l'azote devient limitant restaurant donc l'activité de la nitrogénase (*switch on*).

De la même manière pour la détection de la protéine GlnK expliquée plus haut, un SDS PAGE et un western blot utilisant un anticorps dirigé contre DraG ont permis de détecter cette protéine et comparer son expression chez la souche sauvage JP91 et la souche *amtB*⁻ DG9. Le résultat de cette expérience illustré dans la figure 28 montre que les souches JP91 et DG9 produisent des quantités similaires de la protéine DraG.

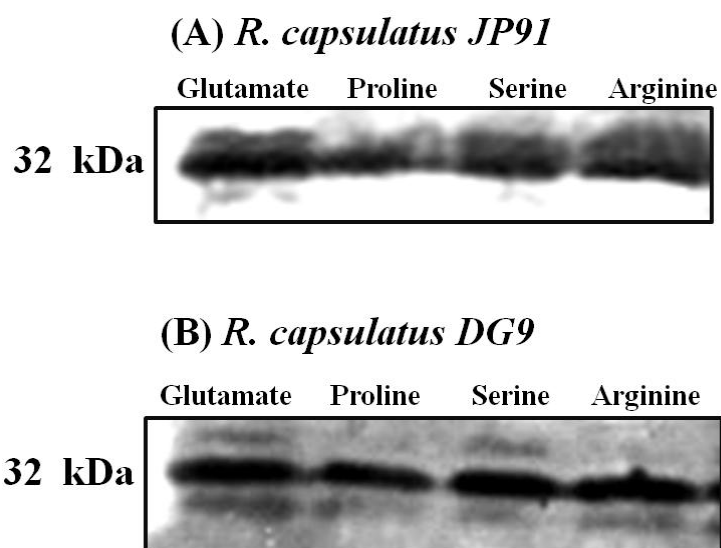


Figure 28: Western Blot pour la détection de la protéine DraG produite sous différentes conditions de culture des souches JP91 et DG9 de *R. capsulatus* sous différentes. 3 µg de protéine totale a été chargé dans chaque puit du gel de SDS PAGE qui a servi à la réalisation du western blot. Taille de la bande déterminée grâce au marqueur *NEB prestained 10-230* KDa *marker*.

Chapitre IV :Discussion

Discussion :

Les bactéries diazotrophiques sont caractérisées par leur capacité à fixer l'azote moléculaire grâce à une enzyme nommée nitrogénase. Elles possèdent une protéine membranaire Amt qui joue un rôle central dans le transport de l'azote fixé ainsi que dans la régulation de cette enzyme. Le contrôle de l'activité de cette dernière se fait à plusieurs niveaux impliquant différents gènes et protéines. *Rhodobacter capsulatus* et d'autres protéobactéries expriment un système de modification/démodification (DraT/DraG) impliqué dans la régulation post traductionnelle de la nitrogénase autrement dit l'ADP *ribosylation/removing ribosylation* (*switch off/switch on*) de la protéine Fe. Un second mécanisme de régulation par ADP ribosylation indépendant du *switch off/on* est aussi retrouvé chez ces souches.

L'importance de l'implication de l'AmtB dans ces deux mécanismes a été prouvée. En effet, il a été démontré qu'en réponse à l'ammonium extracellulaire le transporteur membranaire est nécessaire au *switch off*, l'ADP ribosylation et sa régulation. Ainsi l'hypothèse veut que lors d'un choc d'ammonium (excès extracellulaire), l'AmtB forme un complexe ternaire avec GlnK et DraG au niveau membranaire et provoque donc le *switch off* de la nitrogénase.

Depuis maintenant plusieurs années au sein de notre laboratoire, des mutants d'AmtB chez *R. capsulatus* sont construits dans le but de mieux connaître le mécanisme par lequel cette protéine régule l'activité de la nitrogénase. La méthode de base étant la mutagenèse dirigée, cette technique permet la modification de certains résidus conservés supposés jouer un rôle important dans le transport et l'interaction de la protéine avec l'ammonium.

Dans cette étude, le résidu hautement conservé W237 a été modifié en F237 par PCR en utilisant les amorces appropriées. Durant le clonage, deux étapes supplémentaires ont été ajoutées au protocole habituel : une phosphorylation et une digestion avec l'enzyme de restriction AatII. La première étape a permis de remédier au problème de transformation auquel nous faisons face en assurant une meilleure ligation du plasmide (pAY98 muté et préalablement digéré avec DpnI) qui sous sa forme circulaire est plus facilement transformable. La deuxième étape a quant à elle facilité l'extraction de la bande correspondant à l'insert muté à partir du gel. L'enzyme AatII a garanti le clonage de la bande cible dans le vecteur pJB3Tc20 car suite à la double digestion de pAY98 par EcoRI et PstI elle digère uniquement la portion du plasmide qui n'est pas mutée.

Afin d'obtenir le mutant *R. capsulatus RcAmtBW237F* une conjugaison a été effectuée, elle n'a cependant pas abouti ceci due à des erreurs de manipulations. Tout d'abord du succinate a été utilisé comme source de carbone alors qu'il ne fallait pas car il peut aussi servir de source d'azote, il a par la suite été remplacé par du glucose. D'autre part, dans le milieu YPS il fallait en plus de la tétracycline, ajouter de la kanamycine facteur de sélection de *R. capsulatus*. Je n'ai pas pu remédier à ce problème faute de temps.

Une étude précédente dans notre laboratoire sur cet acide aminé a permis de révéler que le résidu W237 est nécessaire au transport d'ammonium et à la régulation de la protéine Fe par ADP ribosylation. Après mesure de l'activité de la nitrogénase par CPG, le résidu muté en alanine a révélé un taux d'acétylène produit en augmentation constante même après addition d'ammonium à 20 min. Ces résultats ont été confirmés par un western blot réalisé à partir d'échantillons prélevés lors du dosage de l'activité de la nitrogénase qui (indirectement) n'a indiqué aucune modification par ADP ribosylation de la sous-unité Fe de la nitrogénase. La continuation du travail ainsi que des expériences futures en termes de *switch off* de la nitrogénase et la formation du complexe AmtB-GlnK-DraG permettront de connaître l'impact de la modification de ce résidu en phénylalanine en comparaison avec les résultats obtenus avec le mutant W237A.

La deuxième partie de ce mémoire concerne l'étude d'un mutant d'*AmtB* généré dans le but d'améliorer la production biologique d'hydrogène. Pour rappel, *R. capsulatus* est capable de produire de l'hydrogène via la nitrogénase à partir de sources de carbone réduites par photofermentation. L'intensité lumineuse, la température, la source de carbone et d'azote utilisées sont des paramètres importants qui influencent le taux de production d'hydrogène chez cette bactérie. Plusieurs études concernant ces paramètres ont donc été conduites dans le but de déterminer les conditions optimales pour la bioproduction d'hydrogène. Ainsi, (Akkose, 2008) a pu démontrer que le glutamate représente la meilleure source d'azote et une autre étude menée au sein de notre laboratoire par (Abo-Hashesh et al., 2011) utilisant la souche *R. capsulatus* JP91 a montré que la production photo-fermentative de H₂ à partir du glucose est faisable et permet de produire un taux maximal de 3 moles H₂/mol de glucose. Une autre étude au sein de notre laboratoire menée par (Ghosh et al., 2012) travaillant sur la même souche a permis de fixer les paramètres optimaux de concentrations de glucose à 35 mM et de glutamate à 4.5 mM avec un rendement d'hydrogène produit amélioré atteignant 5.5 moles H₂/mol de glucose.

La bioproduction d'hydrogène par fermentation chez les bactéries photosynthétiques est inhibée en présence d'ammonium tandis qu'elle est accomplie en présence de différents acides aminés. Ceci ajouté à l'implication exclusive de la nitrogénase dans ce processus permet de converger vers l'hypothèse selon laquelle l'amélioration du rendement d'hydrogène produit par *R. capsulatus* passerait nécessairement par la maximisation de l'activité de cette enzyme et par conséquent le contrôle de sa régulation. A cet effet, des investigations concernant la régulation de la nitrogénase, l'expression de GlnK et DraG ont été faites sur une souche de *R. capsulatus* délétée d'AmtB (DG9 construite par mon collègue Dr Ghosh). Les résultats obtenus (additionnés d'autres non mentionnés) feront l'objet d'une publication prochaine.

Des cultures de six jours des souches sauvage et mutante respectivement JP91 et DG9 ont été utilisées pour les différentes expériences car le sixième jour correspond à la production maximale de H₂ et par conséquent l'activité maximale de la nitrogénase. L'étude de l'activité de cette enzyme par CPG a permis de montrer une inactivation de la nitrogénase par *switch off* suite au choc d'ammonium chez *R. capsulatus* JP91 et correspond donc à l'ADP ribosylation réversible de la NifH. Un résultat semblable concernant la même souche a été obtenu dans l'étude de (Abo-Hashesh et al., 2011). Le même test effectué sur le mutant DG9 a révélé un résultat différent autrement dit une absence de *switch off* de la protéine Fe qui s'est traduite par une réduction de l'acétylène en éthylène constante même suite à l'ajout d'ammonium.

En deuxième lieu, différents acides aminés ont été utilisés pour la croissance en batch de JP91 et DG9 dans le but de connaître leur impact sur l'activité de la nitrogénase. De la même manière que précédemment, ces souches ont été cultivées pendant six jours et la réduction de C₂H₂ en C₂H₄ a été ensuite mesurée. Une activité élevée de la nitrogénase a donc été notée chez *R. capsulatus* DG9 avec une activité maximale lors de l'utilisation de l'acide aminé proline en comparaison avec le résultat obtenu avec du glutamate qui fut jusqu'ici considéré comme la meilleure source d'azote pour la production de H₂ du fait de la neutralité suite à son utilisation. La faible activité de l'enzyme retrouvée sur de l'arginine chez DG9 (en comparaison avec l'utilisation de la proline et le glutamate) est directement liée à la structure de ces résidus et pourrait être expliquée par le fait que l'arginine possède une chaîne latérale chargée positivement portant deux groupements aminés pouvant constituer par la suite un excès d'ammonium pour la nitrogénase. Cette expérience a donc démontré que l'activité de la fixation de l'azote est influencée par la source d'azote utilisée. Ceci rejoint le travail de

(Teixeira et al., 2010) sur *Rhodospirillum rubrum* qui a préalablement prouvé que que les conditions intracellulaires menant à la régulation de la fixation de l'azote, l'assimilation de l'ammonium, l'activité de la glutamine synthétase et la modification des protéines PII sont influencées par la source d'azote utilisée lors de la croissance bactérienne.

D'autres parts, un western blot visant à détecter l'état de modification de la protéine NifH a été réalisé grâce à un anticorps dirigé contre cette protéine pour les deux souches qui ont poussé sur différentes source d'azote. Ainsi comme montré par la figure 26, chez JP91 la nitrogénase est ADP ribosylée et donc inactivée suite à l'ajout de NH_4Cl tandis que seule la sous unité NifH non modifiée (34.9 kDa) de la nitrogénase a été détectée chez DG9 ces résultats sont les même pour les quatre acides aminés utilisés pour la croissance bactérienne : glutamate, proline, sérine et arginine. Une étude menée par (Huergo et al., 2006) sur un mutant d'AmtB chez *Azotobacter brasilense* a montré un résultat similaire c'est-à-dire l'absence d'ADP ribosylation de NifH suite à l'ajout d'ammonium.

Chez les protéobactéries, la régulation post traductionnelle de la NifH par ADP ribosylation implique le transporteur d'ammonium AmtB, la protéine GlnK et le système protéique à deux composants : DraT et DraG.

GlnK est une protéine PII retrouvée chez *R. capsulatus* dont le gène est co transcrit avec le celui de l'AmtB à partir du même opéron *glnKamtB*. Cette protéine joue un rôle central dans la régulation post traductionnelle de la nitrogénase. En effet, des études ont montré que lorsque le taux extracellulaire d'ammonium est élevé, l'AmtB séquestre GlnK au niveau de la membrane ce qui provoque le *switch off* de la nitrogénase. De plus, d'autres études ont prouvé que cette séquestration n'était pas suffisante pour activer l'ADP ribosylation et le *switch off* et suggère donc l'implication d'une troisième protéine qui est DraG.

Dans la perspective de détecter GlnK et DraG, des western blots ont été effectués utilisant respectivement un anticorps anti-GlnK et un autre anti-DraG. Le premier a permis de déterminer que lorsque la fonction d'AmtB est abolie chez DG9 il y'a absence de formation du complexe GlnK-AmtB lors d'un choc d'ammonium (*switch off*). En effet, il a été prouvé que le switch off de l'activité de la nitrogénase nécessitait non seulement la séquestration de GlnK au niveau membranaire mais aussi la détection de l'ammonium ou son transport partiel par l'AmtB. Le résultat obtenu avec la souche DG9 confirme ainsi ce phénomène. De plus, la concentration inchangée de GlnK au sein de JP91 et DG9 confirme que la régulation de la synthèse de la nitrogénase par ADP ribosylation n'est pas changée par l'absence d'AmtB.

Le deuxième western blot pour la mise en évidence de DraG a révélé une expression de cette protéine relativement semblable chez *R. capsulatus* sauvage JP91 et mutée DG9. (Huergo et al., 2006) ont montré par des études de localisation cellulaire chez *A. brasilense* que suite à un choc d'ammonium, la séquestration de DraG au niveau membranaire est dépendante de la protéine AmtB comme dans le cas des protéines PII. Elle interagissait avec AmtB à travers la formation d'un complexe ternaire impliquant une protéine PII. De plus, ce phénomène est synchronisé avec l'état de modification de la protéine Fe et que donc cette séquestration pourrait inactiver DraG lors du choc d'ammonium. Toujours selon eux, ceci expliquerait pourquoi la protéine Fe n'est pas modifiée chez un mutant d'AmtB, laissant DraG active dans le cytoplasme de la cellule.

Ceci suggère aussi comme dans le cas de GlnK cité plus haut que la régulation de la synthèse de la nitrogénase par ADP ribosylation n'est pas changée par l'absence d'AmtB. Des western blots pour détecter les protéines GlnK et DraG à partir des fractions cellulaires membranaires et cytoplasmiques, l'estimation intra et extracellulaire de l'ammonium ainsi que l'étude de l'effet de NH_4 sur l'activité de la glutamine synthétase (GS) chez les souches sauvage et mutante DG9 de *R. capsulatus* pourraient apporter plus d'explications sur le fonctionnement de la régulation de l'activité de la nitrogénase à l'échelle moléculaire.

Conclusion

Conclusion :

Dans le but de mieux comprendre la régulation de la nitrogénase à un niveau moléculaire, l'AmtB a été modifiée par mutagenèse dirigée au niveau du résidu hautement conservé W237 résultant en une substitution de ce dernier en phénylalanine. Une étude précédente a démontré que cet acide aminé est essentiel à l'ADP ribosylation de la protéine Fe car la mutation du tryptophane W237 en alanine A237 rend *R. capsulatus* incapable de réaliser le *switch off* de la nitrogénase même après addition d'ammonium. En conséquence, la continuation du travail sur le résidu 237 ainsi que la caractérisation de ce mutant de *R. capsulatus* en termes de mesure de l'activité de la nitrogénase par CPG, modification de la protéine Fe par ADP ribosylation et de détection du complexe ternaire GlnK-AmtB-DraG devrait être effectuée dans le futur pour mieux distinguer le rôle de la protéine AmtB dans la régulation de la nitrogénase.

En deuxième lieu, une souche mutante de *R. capsulatus* déletée d'AmtB et initialement construite par un membre du laboratoire dans le cadre de la production d'hydrogène a fait l'objet d'une étude concernant le *switch off* de la nitrogénase testée par CPG, la détection de l'ADP ribosylation de NifH et celle de GlnK et DraG par western blot. Ces expérimentations ont permis de mettre en évidence que la régulation de la nitrogénase par ADP ribosylation n'a pas lieu et que l'activité de cette enzyme est améliorée lors de l'utilisation de la proline comme source d'azote. Ajouté à cela pas de changement d'expression de GlnK et DraG après un choc d'ammonium prouvant une fois de plus l'absence de *switch off* par ADP ribosylation. Cela prouve que plus rien n'inhibe l'action de la nitrogénase chez cette souche de *R. capsulatus* qui devient donc un candidat idéal pour la production d'hydrogène. Il sera intéressant d'étudier ce processus après avoir cultivé DG9 en batch avec de la proline. Enfin, en ce qui concerne DraG des tests de densitométrie permettront de connaître la taille exacte de la bande détectée par western blot. Les résultats d'autres tests ont été réalisés au cours de cette études qui ne figurent pas dans ce mémoire seront publiés prochainement avec Dr Ghosh.

Chapitre V : Références bibliographiques

Bibliographie :

- Abo-Hashesh, M., D. Ghosh, A. Tourigny, A. Taous et P. C. Hallenbeck.** 2011. Single stage photofermentative hydrogen production from glucose: an attractive alternative to two stage photofermentation or co-culture approaches. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36 (21):13889–13895.
- Akkose, S., U. Gunduz, M. Yucel et I. Eroglu.** 2009. Effects of ammonium ion, acetate and aerobic conditions on hydrogen production and expression levels of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Journal of Hydrogen Energy*. 34 (21):8818-8827.
- Androga, D. D., E. Özgür, I. Eroglu, U. Gündüz et M. Yücel.** 2012. Hydrogen energy - challenges and perspectives. Editeur: D., Minic. Intech. Chapitre 4: Photofermentative Hydrogen Production in Outdoor Conditions. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/hydrogen-energy-challenges-and-perspectives>.
- Arcondéguy, T., R. Jack et M. Merrick.** 2001. P (II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiology. Molecular Biology Reviews*. 65 (1): 80-105.
- Brazzolotto, X., J. K. Rubach, J. Gaillard, S. Gambarelli, M. Atta et M. Fontecave.** 2006. The [Fe-Fe]-Hydrogenase maturation protein HydF from *Thermotoga maritima* is a GTPase with an iron-sulfur cluster. *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (2):769–774.
- Benemann, J. R.** 1997. Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. *Hydrogen Energy*. 22 (10):979-987.
- Bonatto, A. C., G. H. Couto, E. M. Souza, L. M. Araújo, F. O. Pedrosa, L. Noindorf et E. M. Benelli.** 2007. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. *Protein Expression and Purification*. 293 (2): 293-299.
- Castillo, P., J. P. Magnin, M. Velasquez et J. Willison.** 2012. Modeling and optimization of hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* by the methodology of design experiments (DOE): interaction between lactate concentration and light luminosity. *Energy Procedia*. 29:357-366.
- Cheng, Q.** 2008. Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50 (7): 786-798.

- Cotts, G., G. Thomas, D. Blakey et M. Merrick.** 2002. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *European Molecular Biology Organization Journal*. 21 (4):536-545.
- Cullen, P. J., W. C. Bowman et R. G. Kranz.** 1996. *In vitro* reconstitution and characterization of the *Rhodobacter capsulatus* NtrB and NtrC two-component system. *Journal of Biological Chemistry*. 271 (11): 6530-6536
- Casalot, L. et M. Rousset.** 2001. Maturation of the [NiFe] hydrogenases review. *Trends in Microbiology*. Cell. 9 (5):228-237.
- Das, D. et T. N. Veziroglu.** 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33 (21):6046 – 6057.
- Dixon, R. et D. Kahn.** 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews. Microbiology*. 2:621-631.
- Drepper, T., S. Gross, A. F. Yakunin, P. C. Hallenbeck, B. Masepohl, et W. Klipp.** 2003. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology*. 149 (8): 2203-2212.
- Foglia, D., W. Wukovits, A. Friedl, G. J. de Vrije et P. A. M. Claassen.** 2011. Fermentative hydrogen production: influence of application of mesophilic and thermophilic bacteria on mass and energy balances. *Chemical Engineering Transactions*. 25:815-820.
- Ghosh, D., I. F. Sobro et P. C. Hallenbeck.** 2012. Optimization of the hydrogen yield from single-stage photofermentation of glucose by *Rhodobacter capsulatus* JP91 using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 123:199–206.
- Gruswitz, F., J. O’Connell III et R. M. Stroud.** 2007. Stroud Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (1): 42–47.
- Hallenbeck, P. C.** 2009. Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34 (17):7379-7389.
- Hallenbeck, P. C. et J. R. Benemann.** 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27 (11-12):1185 – 1193.
- Helling, R. B.** 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate. *Journal of Bacteriology*. 176 (15): 4664–68.

- Helling, R. B.** 1998. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 180 (17):4571–75.
- Huergo, L. F., C. Govind et M. Merrick.** 2013. P_{II} signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. *Microbiology Reviews*. 37 (2): 251–283.
- Huergo, L. F., F. O. Pedrosa, M. Muller-Santos, L. S. Chubatsu, R. A. Monteiro, M. Merrick et E. M. Souza.** 2012. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. *Microbiology*. 158 (1):176–190.
- Imhoff, J. F., H. G. Truper et N. Pfennig.** 1984. Rearrangement of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34 (3):340-343.
- Javelle, A., D. Lupo, P. Ripoche, T. Fulford, M. Merrick et F. K. Winkler.** 2008. Substrate binding, deprotonation, and selectivity at the periplasmic entrance of the *Escherichia coli* ammonia channel AmtB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (13): 5040–5045.
- Jiang, P., J. A. Peliska et A. J. Ninfa.** 1998. Enzymological characterisation of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 37:12795-12801.
- Kapdan, I. K. et F. Kargi.** 2006. Bio-hydrogen production from waste materials enzyme and *Microbial Technology*. 38:569–582.
- Khademi, S. et R. M. Stroud.** 2006. The Amt/MEP/Rh Family: structure of AmtB and the mechanism of ammonia gas conduction. *Physiology*. 21:419-429.
- Kirtay, E.** 2011. Recent advances in production of hydrogen from biomass *Energy Conversion and Management*. 52 (4): 1778–1789.
- Llácer, J. L., I. Fita et V. Rubio.** 2008. Arginine and nitrogen storage. *Current Opinion in Structural Biology*. 18 (6):673–681.
- Madigan, M. T., D. O. Jung et S. M. Resnick.** 2001. Growth of the purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* on the aromatic compound hippurate. *Archives of Microbiology*. 175:462-465.
- Manish, S. et R. Banerjee.** 2008. Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33 (1): 279 – 286.

- Masepohl, B et P. C. Hallenbeck.** 2010. Recent advances in phototrophic prokaryotes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Ed: P. C. Hallenbeck. Chapitre 4: Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Springer Science+Business Media. 675:49-70.
- Masepohl, B., T. Drepper, A. Paschen, S. Grob, A. Pawlowski, K. Raabe, K. U. Riedel et W. Klipp.** 2002. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 4 (3): 243-248
- Masepohl, B., T. Drepper et W. Klipp, J. R. Gallon et W. E. Newton.** 2004. Nitrogen fixation in the photosynthetic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. In *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, J. R. Gallon et W. E. Newton. Editeurs. Kluwer academic publishers. 141-165
- Merrick, M. J. et R. A. Edwards.** 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiology Review*. 59 (4): 604-622.
- Merrick, M. J.** 1983. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. *European Molecular Biology Organization Journal*. 2 (1): 39-44.
- Missailidis, S., M. Jaseja, P. Ray, R. Chittock, C. W. Wharton, A. F. Drake, M. Buck, et E. I. Hyde.** 1999. Secondary structure of the C-terminal DNA binding domain of the transcriptional activator NifA from *Klebsiella pneumoniae*: spectroscopic analyses. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 361 (2): 173-182.
- Moréno-Vivian, C., V. M. Luque –Alamagro, P. Cabello, M. D. Roldan et F. Castillo.** 2011. Nitrogen cycling in bacteria: molecular analysis. Ed: J. W. B., Moir. Chapitre 5: Transport and assimilation of inorganic nitrogen in bacteria. Caister Academic Press. 101-122
- Moure, V. R., K. Danyal, Z. Y. Yang, S. Wendroth, M. Müller-Santos et F. O. Pedrosa., M. Scarduelli., E. C. M. Gerhardt., L. F. Huergo., E. M. Souza et L. C. Seefeldt.** 2013. The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB. *Journal of Bacteriology*. 195 (2): 279–286.

- Ni, M., D. Y. C. Leung, M. K. H. Leung et K. Sumathy. 2006. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology*. 87 (5): 461 – 472
- Ninfa, E. G., M. R. Atkinson, E. S. Kamberov et A. J. Ninfa. 1993. Mechanism of Autophosphorylation of *Escherichia coli* Nitrogen Regulator II (NRI, or NtrB): trans-phosphorylation between Subunits. *Journal of Bacteriology*. 175 (21): 7024-7032.
- Ninfa, A. J. 1996. Regulation of gene transcription by extracellular stimuli. In F. C. Neidhardt et al. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society of Microbiology. 1:1246-1262
- Noindorf, L., A. C. Bonatto, R. A. Monteiro, E. M. Souza, L. U. Rigo, F. O. Pedrosa, M. B. R. Steffens et L. S. Chubatsu. 2011. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR. *Microbiology*. 11:8.
- Nygaard T. P., C. Rovira, G. H. Peters et M. O. Jensen. 2006. Ammonium recruitment and ammonia transport by *E. coli* ammonia channel AmtB. *Biophysical Journal*. 91 (12): 4401–4412
- Ozgun, E., N. Afsar, T. De Vrije, M. Yucel, U. Gunduz, A. M. P. Claassen et I. Eroglu. 2010. Potential use thermophilic dark fermentation effluents in photofermentative hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Cleaner Production*. 18 (supplement 1): S23-S28.
- Parkinson, J. S., et E. C. Kofoid. 1992. Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annual Reviews of Genetics*. 26: 71-112.
- Paschen, A., T. Drepper, B. Masepohl et W. Klipp. 2001. *Rhodobacter capsulatus* nifA mutants mediating nif gene expression in the presence of ammonium. *FEMS Microbiology Letters*. 200 (2): 207-213.
- Pawloski, A., K. U. Riedel, W. Klipp, P. Dreiskemper, 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*. *Journal of Microbiology*. 185 (17): 5240-5247.
- Pedro-Roig, L., C. Lange, M. J. Bonete, J. Soppa et J. Maupin-Furlo. 2013. Nitrogen regulation of protein–protein interactions and transcript levels of GlnK PII regulator and AmtB ammonium transporter homologs in Archaea. *Microbiology open*. 2 (5): 826–840.

- Pierrard, J. P., P. W. Ludden et G. P. Roberts.** 1993. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: Existence of two independent regulatory effects of ammonium. *Journal of Bacteriology*.175 (5): 1358–1366.
- Pioszak, A. A. et A. J. Ninfa.** 2003. Genetic and biochemical analysis of phosphatase activity of *Escherichia coli* NRII (NtrB) and its regulation by the PII signal transduction protein. *Journal of Bacteriology*.186 (17):1299–1315
- Rajendran, C., E. C. M. Gerhardt, S. Bjelic, A. Gasperina, M. Scarduelli, F .O. Pedrosa, L. S. Chubatsu, M. Merrick, E. M. Souza, F. K. Winkler, L. F. Huergo et X. D. Li.** 2011. Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of PII-target interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (47): 18972–18976.
- Richard, C. L., A. Tandon et R. G Kranz.** 2004. *Rhodobacter capsulatus nifAI* promoter : high-GC -10 regions in high-GC bacteria and the basis for their transcription. *Journal of Bacteriology*. 186 (3):740-749.
- Sarkar, A., J. Köhler, T. Hurek et B. Reinhold-Hurek.** 2012. A novel regulatory role of the Rnf complex of *Azoarcus sp* strain BH72. *Molecular Microbiology*. 83 (2):408–422
- Sant’ana, F. H., D. B. Trentini, W. S. De Souto, R. Sekagno, S. C. Da Silva et I. S. Shrank.** 2009. PII superfamily revised : a novel group and evolutionary insights. *Journal of Molecular Evolution*. 68 (4):322-336.
- Schuddekopf, K., S. Hennecke, U. Liese, M. Kutsche et W. Klipp.** 1993. Characterization of *anf* genes specific for the alternative nitrogenase and identification of *nif* genes required for both nitrogenases in *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology*. 8 (4):673-684.
- Seving, P., U. Gunduz, I. Eroglu et M. Yucel.** 2012. Kinetic analysis of photosynthetic growth, hydrogen production and dual substrate utilization by *Rhodobacter capsulatus*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37 (21):16430-16436.
- Skizim, N. J., G. M. Ananyev, A. Krishnan et G. C. Dismukes.** 2012. Metabolic pathways for photobiological hydrogen production by nitrogenase- and hydrogenase-containing unicellular *Cyanobacteria Cyanothecae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (4): 2777–276.
- Sun, L., B. Akermark et S. Ott.** 2005. Iron hydrogenase active site mimics in supramolecular systems aiming for light-driven hydrogen production coordination. *Chemistry Reviews*. 249 (15-16):1653–1663.

- Teixeira, P. F., T. T. Selao, V. Henriksson, H. Wang, A. Noren et S. Nordlund. 2010. Diazotrophic growth of *Rhodospirillum rubrum* with 2-oxoglutarate as sole carbon source affects regulation of nitrogen metabolism as well as the soluble proteome. Institut Pasteur. Research in Microbiology. 161 (8):651-659.
- Tekucheva, D. N. et A. A. Tsygankov. 2012. Combined biological hydrogen-producing systems: a review. Biochemistry and Microbiology. 48 (4):319-337.
- Tremblay, P. L. et Hallenbeck, P. C. 2008. Ammonia-induced formation of an AmtB-GlnK complex is not sufficient for nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Journal of Bacteriology. 190 (5):1588-1594
- Tremblay P. L. et P. C. Hallenbeck. 2008. Of blood, brains and bacteria, the Amt/h transporter family: emerging role of Amt as unique microbial sensors. Molecular Biology. 71 (1):12-22.
- Tremblay, P. L., T. Drepper, B. Masepohl et P. C. Hallenbeck. 2007. Membrane sequestration of PII proteins and nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Journal of Bacteriology. 189 (16):850-859.
- Van Heeswijk, W. C., S. Hoving, D. Molenaar, B. Stegeman, D. Kahn, et H. V. Westerhoff. 1996. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 21 (1): 133-146
- Van Niel, C. B. 1944. The culture, general physiology, morphology, and classification of non-sulfur purple and brown bacteria. Bacteriology Reviews. 8 (1): 1-118.
- Weaver, P. F., J. D. Wall et H. Gest. 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. Archives of Microbiology. 105 (1): 207-216.
- Yakunin, A. F. et P. C. Hallenbeck. 1998. Short-term nitrogenase regulation in *Rhodobacter capsulatus*: Multiple in vivo nitrogenase responses to NH_4^+ addition. Journal of Bacteriology. 180 (23):6392–6395.
- Yakunin, A. F. et P. C. Hallenbeck. 2002 .AmtB is necessary for NH_4^+ -induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. Journal of Bacteriology. 184 (15):4081-4088.

- Yuan, J., C. D., Doucette, W. U. Fowler, X. G. Feng., M. Piazza, H. A. Rabitz, N. S. Wingreen et J. D. Rabinowit .** 2009. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. *Molecular Systematic Biology*. 5: 302.
- Zhang, Y., E. L. Pohlmann et G. P. Roberts.** 2005. GlnD Is essential for NifA activation, NtrB/ NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*. 187 (4):1254–1265.
- Zhang, Y., E. L. Pohlmann, J. Serate, M. C. Conrad et G. P. Roberts.** 2010. Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. *Journal of Bacteriology*. 192 (11):2711-2721.
- Zhang, T., Y. Yan, S. He, S. Ping, K. M. Alam, Y. Han, X. Liu, W. Lu, W. Zhang, M. Chen, W. Xiang, X. Wang et M. Lin.** 2012. Involvement of the ammonium transporter AmtB in nitrogenase regulation and ammonium excretion in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Research in Microbiology*. 163 (5):332-339.
- Zheng, L., D. Kostrewa, S. Berne` che, F. K. Winkler et X. D. Li.** 2004. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101 (49):17090–17095.