

Université de Montréal

Régulation transcriptionnelle de la synthèse de la pyruvate carboxylase
chez *Rhodobacter capsulatus*

Par

Bertine Sandra Akouamba

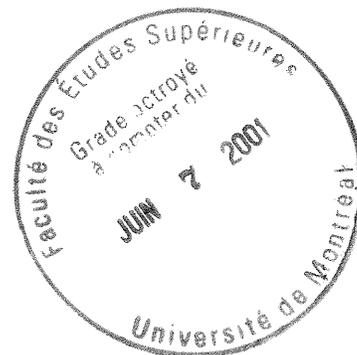
Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)

décembre 2000

Bertine Sandra Akouamba



W
4

W58

2001

N^o 098

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

ce mémoire intitulé :

Régulation transcriptionnelle de la synthèse de la pyruvate carboxylase
chez *Rhodobacter capsulatus*

présenté par :

Bertine Sandra Akouamba

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président du jury

Membre du jury

Membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

La répression catabolite est le phénomène par lequel la présence d'une source de carbone rapidement métabolisable, dans le milieu de culture, réprime la synthèse des enzymes impliquées dans le métabolisme des sources de carbone alternatives. Elle a été observée chez les microorganismes eucaryotes et procaryotes. Cependant de nombreuses bactéries dont *Rhodobacter capsulatus*, qui utilisent de façon préférentielle les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) ou cycle de Krebs, ont développé la répression catabolite inverse.

La pyruvate carboxylase (PC) est une enzyme anaplérotique, biotine dépendante, qui catalyse la réaction de synthèse de l'oxaloacétate à partir du pyruvate, de l' HCO_3^- et l'ATP. Son mécanisme d'action, sa synthèse et son rôle biologique ont été bien étudiés chez le rat, l'homme, les levures et certaines bactéries. Chez l'homme et le rat la carence en PC est associée au diabète et à de nombreux troubles psychomoteurs. C'est récemment, qu'une étude a été entreprise sur la pyruvate carboxylase de *R. capsulatus*, une bactérie photosynthétique, qui possède un métabolisme versatile. En effet cette bactérie est capable de croître aussi bien en anaérobiose sous la lumière, qu'en aérobiose dans l'obscurité en utilisant le CO_2 , les carbohydrates et les intermédiaires du cycle des TCA, encore appelés les C-4dicarboxylates, comme source de carbone. Cette étude a montré que la synthèse de cette enzyme est activée par le pyruvate et l'oxygène alors que, les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques la répriment. Ce qui suggère que la synthèse de la PC soit soumise, par un mécanisme moléculaire inconnu, à la répression catabolite inverse chez *R. capsulatus*.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle de la synthèse de la pyruvate carboxylase, par les conditions de culture, chez *R. capsulatus*. Nous avons établi grâce à une fusion traductionnelle *pyc-lacZ* que la transcription du gène *pyc*, qui code

pour la PC, est activée par le pyruvate, le lactate et l'oxygène; et réprimée par les intermédiaires du cycle des TCA. La protéine RcPdhR, l'homologue de la PdhR d'*E. coli*, régule de façon négative l'expression du promoteur *pyc* en présence des C-4 dicarboxylates. Nous avons trouvé, en créant les délétions unidirectionnelles dans la région promotrice du gène *pyc*, que la régulation de la synthèse de la PC par l'oxygène implique un deuxième régulateur qui reste à identifier. Et nous pensons avoir localisé les sites de fixation de ces deux régulateurs en amont du promoteur *pyc*. Finalement nous avons surexprimé et purifié la RcPdhR, nos études préliminaires de retard de migration sur gel d'électrophorèse indiquent que cette protéine peut se lier dans la région promotrice des gènes *pyc* et *pdh* de *R. capsulatus* et que le fumarate et le pyruvate affectent cette liaison.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| RÉSUMÉ..... | i |
| TABLE DES MATIÈRES..... | iii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | v |
| LISTE DES FIGURES..... | vi |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | viii |
| DÉDICACE..... | x |
| REMERCIEMENT..... | xi |
| | |
| CHAPITRE I - REVUE DE LITTÉRATURE..... | 1 |
| 1.1 LA RÉPRESSION CATABOLIQUE..... | 2 |
| 1.1.1 <i>Définition.....</i> | <i>2</i> |
| 1.1.2 <i>La répression catabolique AMPc-dépendante.....</i> | <i>2</i> |
| 1.1.3 <i>La répression catabolique AMPc-indépendante.....</i> | <i>3</i> |
| 1.1.4 <i>La répression catabolique inverse.....</i> | <i>4</i> |
| 1.2 LE CYCLE DES ACIDES TRICARBOXYLIQUES..... | 5 |
| 1.3 L'ANAPLÉROSE..... | 7 |
| 1.3.1 <i>Les voies anaplérotiques.....</i> | <i>7</i> |
| 1.3.2 <i>Les réactions anaplérotiques.....</i> | <i>7</i> |
| 1.4 LA PYRUVATE CARBOXYLASE..... | 9 |
| 1.4.1 <i>Description et mécanisme d'action.....</i> | <i>9</i> |
| 1.4.2 <i>La réaction catalysée par la PC.....</i> | <i>10</i> |
| 1.4.3 <i>Structure de la PC.....</i> | <i>10</i> |
| 1.4.4 <i>Localisation subcellulaire.....</i> | <i>11</i> |
| 1.4.5 <i>Synthèse de la PC.....</i> | <i>12</i> |
| 1.4.6 <i>Rôles physiologiques de la PC.....</i> | <i>13</i> |
| 1.4.7 <i>Régulation de l'activité enzymatique de la pyruvate carboxylase.....</i> | <i>15</i> |
| 1.4.8 <i>Régulation de la synthèse de la PC.....</i> | <i>16</i> |
| 1.5 RÉGULATION DE LA PC CHEZ RHODOBACTER CAPSULATUS..... | 19 |
| 1.6 DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE..... | 22 |
| 1.6.1 <i>Hypothèse de travail.....</i> | <i>22</i> |
| 1.6.2 <i>Objectifs.....</i> | <i>24</i> |
| | |
| CHAPITRE II - MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | 27 |
| 2.1 MILIEUX DE CULTURE..... | 28 |
| 2.2 TAMPONS..... | 29 |
| 2.3 SOLUTIONS..... | 30 |
| 2.4 LES SOUCHES UTILISÉES..... | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5 LES PLASMIDES UTILISÉS..... | 33 |
| 2.6 MÉTHODE DE MANIPULATION DE L'ADNERREUR! SIGNET NON DÉFINI.5 | |
| 2.6.1 <i>Extraction de l'ADN plasmidique</i> | 35 |
| 2.6.2 <i>Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction et ligation</i> | 36 |
| 2.6.3 <i>Méthode de purification de l'ADN : ``Gene clean``</i> | 36 |
| 2.6.4 <i>Extraction phénol chloroforme</i> | 36 |
| 2.6.5 <i>Transformation d'E. coli</i> | 37 |
| 2.6.6 <i>Electroporation</i> | 38 |
| 2.6.7 <i>Construction de la fusion traductionnelle pyc-lacZ</i> | 38 |
| 2.7 LA CRÉATION DES DÉLÉTIONS DANS LE PROMOTEUR PYC | 39 |
| 2.8 LA TRANSCONJUGAISON BIPARENTALE | 40 |
| 2.9 LES CONDITIONS DE CULTURE | 41 |
| 2.10 LE DOSAGE DE L'ACTIVITÉ βGALACTOSIDASE | 42 |
| 2.11 CLONAGE ET SUREXPRESSION DE RCPDHR | 43 |
| 2.11.1 <i>Clonage du gène RcpdhR</i> | 43 |
| 2.11.2 <i>Surexpression de RcpDHR</i> | 45 |
| 2.11.3 <i>Purification partielle de RcpdhR</i> | 45 |
| 2.12 ÉLECTROPHORÈSE MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA) | 45 |
| CHAPITRE III - RÉSULTATS..... | 47 |
| 3.1 RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE L'ACTIVITÉ DU PROMOTEUR PYC CHEZ R. CAPSULATUS..... | 48 |
| 3.1.1 <i>Régulation de l'expression de la fusion pyc-lacZ par les conditions de cultures</i> | 48 |
| 3.1.2 <i>Effets de la mutation RcpdhR sur l'activité du promoteur pyc</i> | 50 |
| 3.1.3 <i>Identification des éléments régulateurs agissant en cis sur l'activité du promoteur pyc</i> | 51 |
| 3.2 SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE RCPDHRERREUR! SIGNET NON DÉFINI.8 | |
| 3.2.1 <i>Construction du plasmide pAKOB21</i> | 58 |
| 3.2.2 <i>Surexpression et purification de RcpdhR</i> | 60 |
| 3.2.3 <i>Étude de la capacité de RcpdhR purifiée de se fixer sur l'ADN</i> | 63 |
| 3.2.4 <i>Effets du pyruvate et des intermédiaires du cycle des TCA sur La liaison de RcpdhR sur le promoteur pdh</i> | 65 |
| 3.2.5 <i>Effets du lactate et du fumarate sur la liaison de RcpdhR au promoteur pyc</i> | 67 |
| CHAPITRE IV - DISCUSSION | 70 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 78 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : les souches d' <i>E. coli</i> utilisées dans cette étude. | 32 |
| Tableau 2 : liste des souches de <i>R. capsulatus</i> | 33 |
| Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés dans cette étude. | 33 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA), tirée de (27). | 5 |
| Figure 2. Les intermédiaires du Cycle de TCA et la biosynthèse, tirée de (37). | 6 |
| Figure 3. Cycle des TCA et le cycle du glyoxalate, tirée de (31). | 8 |
| Figure 4. Représentation schématique des domaines structuraux de différentes pyruvate Carboxylases. | 12 |
| Figure 5. Représentation schématique des fonctions anaplérotiques de la PC chez les mammifères, tirée de (50). | 14 |
| Figure 6. Organisation structurale du gène <i>pyc</i> chez le rat et l'homme, tirée de (50). | 17 |
| Figure 7. Les voies centrales du métabolisme du carbone chez <i>R. capsulatus</i> , tirée de (99). | 21 |
| Figure 8. Alignement de la séquence d'acides aminés de la PdhR de <i>R. capsulatus</i> (RRC00952) avec les séquences des PdhR homologues. | 24 |
| Figure 9. Construction de la fusion traductionnelle <i>pyc-lacZ</i> | 39 |
| Figure 10. Schématisation de la délétion de la séquence inversement répétée située par la PCR inverse. | 44 |
| Figure 11. Régulation de l'expression de la fusion <i>pyc-lacZ</i> par les conditions de culture..... | 49 |
| Figure 12. Délétion progressive du fragment <i>EcoRI-HindIII</i> (1,043kb). | 52 |
| Figure 13. Schématisation des fragments délétés impliqués dans la fusion traductionnelle <i>pyc-lacZ</i> | 53 |
| Figure 14. Activités β galactosidase des fusions construites avec les produits de délétions du fragment de 1,043kb <i>EcoRI- HindIII</i> | 54 |
| Figure 15. Activités β galactosidase des fusions construites avec les produits de délétions du fragment de 1,043kb <i>EcoRI- HindIII</i> | 57 |
| Figure 16. Séquence du gène <i>RcpdhR</i> de <i>R. capsulatus</i> tiré de (98)..... | 59 |
| Figure 17. Délétion de la séquence inversement répétée en amont du gène <i>RcpdhR</i> | 59 |

| | |
|--|----|
| Figure 18. Surexpression de RcPdhR. | 61 |
| Figure 19. Purification de RcPdhR. | 62 |
| Figure 20. Étude de la liaison de RcPdhR au promoteur du gène <i>pdh</i> de <i>R. capsulatus</i> | 64 |
| Figure 21. Effet du pyruvate et des intermédiaires du cycle des TCA sur la liaison de RcPdhR au promoteur <i>pdh</i> | 66 |
| Figure 22. Mis en évidence de l'interaction de RcPdhR avec le promoteur <i>pyc</i> et l'effet du pyruvate et du fumarate sur cette interaction..... | 68 |
| Figure 23. Effet du pyruvate et du fumarate sur la liaison de RcPdhR au promoteur <i>pyc</i> | 69 |
| Figure 24. Schéma récapitulatif de la régulation de la synthèse du mode d'action de RcPdhR sur la synthèse de la PC et du complexe PDH chez <i>R. capsulatus</i> | 77 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|------------------|--|
| ADN | Acide desoxy ribose |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AMPc | Adénosine 3' : 5' monophosphate cyclique |
| ArcA | Régulateur du métabolisme aérobie |
| ARNm | ARN messenger |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| C | Carbone |
| Cra | Répresseur ou activateur catabolite |
| CRP | Protéine réceptrice de l' AMPc |
| Csr | Régulateur du stockage du carbone |
| CoA | Coenzyme A |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| DIG | Digoxygénine |
| EDTA | Acide éthylène diamine tétra acétique |
| EMSA | Électrophoresis shift mobility assay |
| FADH | Adénine flavine dinucleotide |
| FadR | Régulateur multifonctionnel du métabolisme des acides gras |
| FNR | Régulateur de la respiration formiate- nitrate |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactoside |
| KDa | kilo Dalton |
| Kan ^R | Résistance à la kanamycine |
| M | Molarité |
| ml | milli litre |
| min | minute |
| NADH | Adénine nicotinamide dinucleotide |
| NADPH | Adénine nicotinamide dinucleotide phosphate |
| N-terminal | Amino-terminal |
| OAA | Oxalo acétate |
| ONPG | 2-nitrophényl- β -D-galactopyranoside |
| Orf | Cadre de lecture ouvert |
| OxR | Régulateur de la synthèse de la PC par l'oxygène |
| PC | Pyruvate carboxylase |
| pb | Paire de base |
| PDH | Complexe de la pyruvate deshydrogénase |
| PdhR | Régulateur de la synthèse de la PDH |
| PEP | Phosphoénolpyruvate |
| PEPC | Phosphoénolpyruvate carboxylase |
| PEPCK | Phosphoénolpyruvate carboxykinase |
| PFL | Pyruvate formiate lyase |

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| RcPdhR | PdhR de <i>Rhodobacter capsulatus</i> |
| rif ^R | Résistance à la rifampycine |
| sec | Secondes |
| SDS | Sodium dodécyle sulfate |
| TAE | Tampon Tris- acétate- EDTA |
| TBE | Tampon Tris- borate-EDTA |
| tet ^R | Résistance à la tétracycline |
| TCA | Cycle des acides tricarboxyliques |
| UV | Rayons ultra violets |

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à mon père M. **Oyougou Alphonse** qui a été précocement enlevé à la vie en janvier 1985, et qui a su me montrer l'intérêt des études dans la vie.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr. Patrick C. Hallenbeck, de m' avoir accepté dans son laboratoire et de m' avoir toujours soutenu et encouragé dans la réalisation de ce travail.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de mes études de maîtrise au département de microbiologie et immunologie. Je pense plus particulièrement au personnel du secrétariat.

Je me dois de remercier les membres du laboratoire du Dr. Patrick C. Hallenbeck pour leur soutien moral, affectif et technique. Je pense plus particulièrement à M. Jean- François Viger, au Dr. Alexandre Yakunine, à Mme. Isabelle Chenier, Mme. Ilhem Beladj, Mme. Giuseppa Gennaro, et enfin à Jamila, Fadela, Mélanie, Martine et Sawcene.

Enfin, je remercie mes trois mères, Justine, Aline et Fabienne qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes études et qui ont toujours œuvré pour me permettre de le faire tant financièrement, qu'affectueusement. Je remercie mon conjoint, Roch, qui ne tarit pas d'encouragements et d'amour à mon égard malgré les épreuves que mes études nous imposent. Je remercie chaque membre de ma famille et en particulier Cathia, Hervé et Sonia qui ont du subir mes sauts d'humeur. Un merci particulier à bébé Maël et ses parents qui constituent sans le savoir une véritable oasis émotionnelle pour moi.

CHAPITRE I
REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 LA RÉPRESSION CATABOLIQUE

1.1.1 Définition

Le phénomène, appelé répression catabolique (RC) ou diauxie (1), est observé quand un organisme est dans un milieu contenant deux sources de carbone (C) et, quand il y a utilisation préférentielle d'une source de C avec suppression de l'utilisation de l'autre source de C. Il se définit donc comme étant le fait que, la présence d'une source de C rapidement métabolisé dans le milieu, provoque l'inhibition de la synthèse des enzymes impliquées dans le métabolisme des autres sources de C disponibles (2). La RC a été mis en évidence chez un grand nombre de bactéries dont *Escherichia coli* (*E. coli*) qui utilise d'abord le glucose quand on lui fourni le glucose et le lactose (2) et, *Propionibacterium shermanii* qui préfère le glucose au lactate en absence d'oxygène (3). Il a été aussi décrit chez les levures ainsi, *Candida tropicalis* préfère utiliser le glucose qui réprime l'utilisation du cellobiose (4). L'une des caractéristiques de la RC est que l'utilisation de la première source de C est constitutive alors que l'utilisation de la deuxième est induite (2). Ce type de régulation a été observé dans la synthèse des protéines impliquées dans la bioluminescence, la photosynthèse, la sporulation, la dégradation des macromolécules extracellulaires, la biosynthèse des antibiotiques et des pigments (5). On distingue deux types de RC selon le régulateur transcriptionnel sollicité.

1.1.2 La répression catabolique AMPc-dépendante

La répression catabolique AMPc-dépendante se fait en fonction de la concentration intracellulaire de l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc). L'AMPc est le médiateur des changements induits par les hormones dans le métabolisme et les fonctions des vertébrés et des invertébrés (6, 7). Il

agit comme second messenger, l'hormone étant le premier messenger qui interagit avec les membranes cellulaires ou sur d'autres constituants cellulaires. Mais chez les microorganismes, l'activité cellulaire n'est pas contrôlée par les hormones mais par les conditions extracellulaires (8). Ainsi chez *E. coli*, en présence du glucose l'AMPc se lie à la protéine réceptrice de l'AMPc (CRP) pour former un complexe CRP-AMPc qui, active la transcription des gènes soumis à la RC en se fixant sur leur promoteur comme dans le cas de l'opéron lactose (8, 9).

1.1.3 La répression catabolique AMPc-indépendante

Les entérobactéries utilisent des mécanismes moléculaires de RC autres que le complexe CRP-AMPc. Ainsi il a été reconnu que chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, le mécanisme de la phosphorylation des perméases spécifiques aux sucres, par le système de phosphotransférases PTS, est impliqué dans la RC (6).

Par ailleurs le régulateur Cra (catabolite repressor / activator), qui contrôle la direction du flux de C à travers les voies métaboliques chez les bactéries entériques, agit sur les voies centrales du métabolisme des carbohydrates. En effet Cra se fixe sur les régions régulatrices des gènes cibles, ainsi il inhibe la synthèse des enzymes de la glycolyse ou de la voie de Entner-Doudoroff et, active la synthèse des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) (ou cycle de Krebs), du cycle de glyoxalate et de la gluconéogenèse (10, 11, 12 et 13).

De la même manière, le régulateur de stockage du C ou Csr (carbone storage regulator) contrôle l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du glycogène et la gluconéogenèse chez *E. coli* (14). CsrA est une protéine qui se lie à l'ARN des gènes *glg*, essentiels à la synthèse du glycogène, pour accélérer sa dégradation de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'

(15). Il a été démontré chez *E. coli*, que les composantes des systèmes de régulation de l'utilisation de l'azote, du fer, du soufre et du phosphore ont une influence sur la RC (16, 17, 18, 19 et 20).

Chez *Bacillus subtilis* et les autres bactéries gram-positifs "low GC", les métabolites intracellulaires du C, comme le fructose-1,6- phosphate et le gluconate -6-phosphate, favorisent la RC (21).

Un nouveau mécanisme de RC a été mis à jour chez *B. subtilis* et *E. coli* dans lequel, les gènes soumis à la RC utilisent le facteur sigma σ^S ou σ^{38} qui contrôle l'expression des gènes permettant l'adaptation à la phase stationnaire de croissance (22).

1.1.4 La répression catabolique inverse

La répression catabolique inverse a été mise en évidence chez les espèces de *Rhodobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* et *Agrobacterium* qui utilisent les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques (succinate et le malate) pour réprimer l'utilisation des carbohydrates (fructose, arabinose, galactose, glycérol, gluconate) comme source de C (23, 24). En effet une étude entreprise chez *Azospirillum brasilense*, montre que dans un milieu minimum le succinate est métabolisé au début de la première phase de croissance alors que le fructose est utilisé pendant la phase stationnaire de croissance (1). Une autre étude réalisée chez *Rhizobium meliloti*, révèle que l'addition du succinate dans une culture de *R. meliloti*, utilisant le lactose comme source de C, réduit l'activité spécifique de la β galactosidase de cette culture (25).

1.2 LE CYCLE DES ACIDES TRICARBOXYLIQUES

Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) (fig.1) remplit deux fonctions métaboliques essentielles. Dans sa première fonction, Il effectue l'oxydation totale de l'acétyl coenzymeA (acétyl CoA) pour fournir l'énergie, sous forme de pouvoir réducteur (NADH, FADH et NADPH), convertie en ATP par la phosphorylation oxydative chez les microorganismes aérobies et aérobies facultatifs (26).

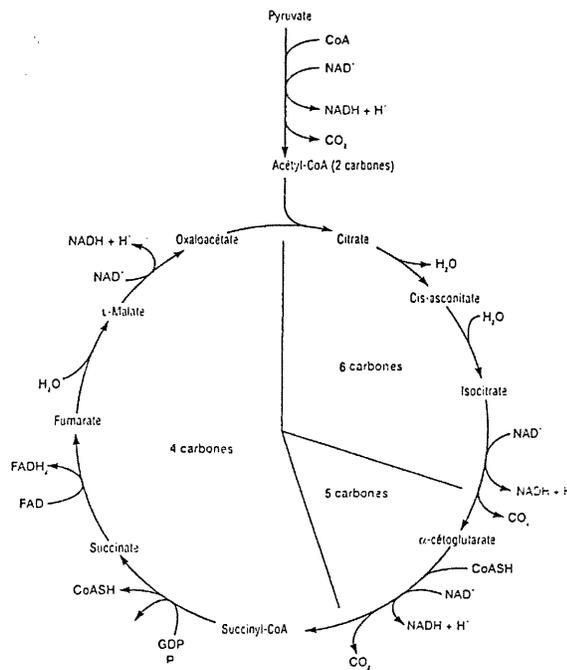


Figure 1. Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA), tirée de (27).

L'acétyl coA provient en général de l'oxydation du pyruvate, produit de la glycolyse, par le système multienzymatique appelé le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH)(fig.1). Il peut aussi provenir du catabolisme des lipides, des acides aminés (27) ou être synthétisé à partir de

l'acétate (28). La deuxième fonction du TCA concerne sa participation dans la synthèse des constituants cellulaires (26). En effet, certains intermédiaires du TCA comme l' α cétoglutarate, l'oxaloacétate (OAA) et le succinyl-coA servent d'intermédiaires pour la biosynthèse des pyrimidines, purines, acides aminés et vitamines (fig.2) (28). Une étude menée en 1981 sur les organismes anaérobies suggère que la séquence du TCA, comprise entre l'OAA et le succinate, agisse comme un mécanisme accepteur d'électrons générés par la fermentation des sucres. Elle régénère ainsi les transporteurs d'électrons (29).

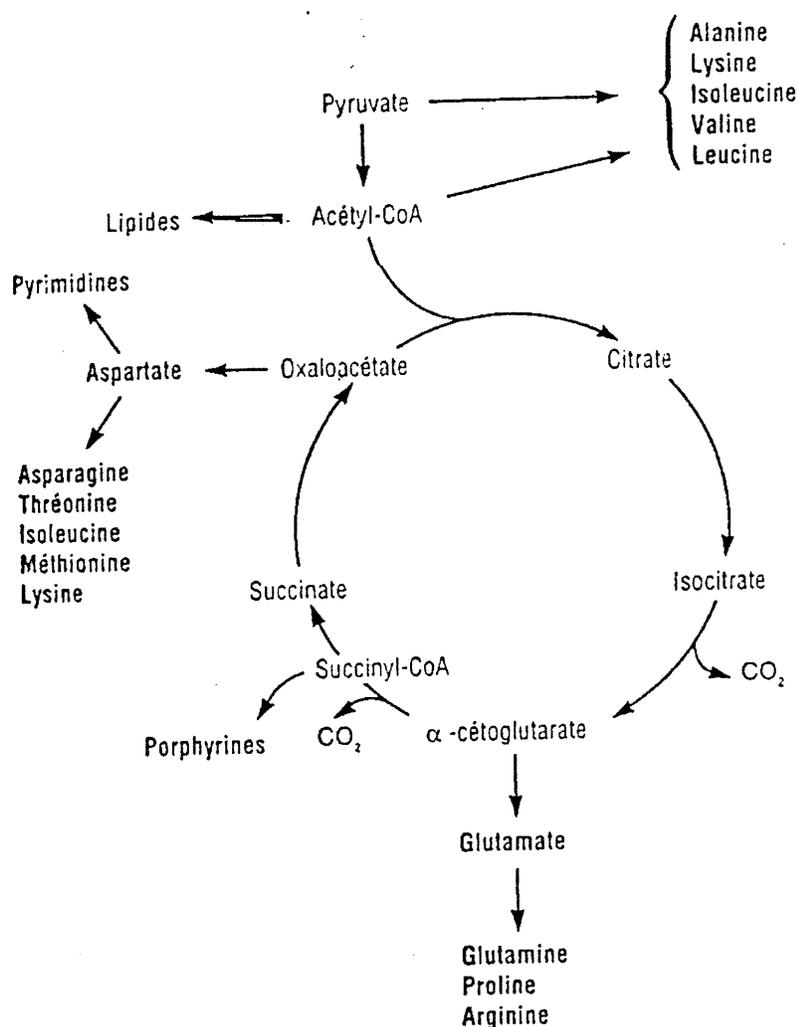


Figure 2. Les intermédiaires du Cycle de TCA et la biosynthèse, tirée de (37).

1.3 L'ANAPLÉROSE

1.3.1 Les voies anaplérotiques

Il existe un équilibre entre le nombre de C qui entre dans le TCA et celui qui en sort. En effet il a été montré, dans le foie et le cœur, que des petites variations de la quantité d'intermédiaires du TCA changent énormément la capacité de ce cycle (30). De plus, les mutants ayant perdu l'activité des enzymes du TCA ne peuvent plus utiliser l'acétate comme source de C et d'énergie (31). Afin de maintenir le TCA en marche malgré le prélèvement de ses intermédiaires pour les biosynthèses, les cellules ont développé des voies auxiliaires appelées **voies anaplérotiques**. Tirées du mot grec *anaplerose* qui veut dire ``remplir``, ces voies approvisionnent en intermédiaires le TCA pour qu'il continue de fonctionner même en cas de biosynthèse active (27).

1.3.2 Les réactions anaplérotiques

1.3.2.1 Carboxylation des composés en C₂

Contrairement aux mammifères, certains microorganismes anaérobies stricts peuvent utiliser l'acétate, quand il est fourni comme seule source de C ou un composé en C₂ plus réduit comme l'éthanol pour synthétiser tous leurs constituants cellulaires (30). En effet *Clostridium kluyveri*, une bactérie anaérobie stricte qui croît facilement sur un milieu contenant l'éthanol, l'acétate et le CO₂ comme source de C, fixe le CO₂ sur l'acétyl CoA pour former un composé en C₃ tel le pyruvate lui-même carboxylé en composés en C₄ (31).

Certaines espèces de bactéries, d'algues, de mycètes et de protozoaires utilisent le cycle du glyoxalate (fig.3) pour synthétiser le succinate et le malate à partir d'une molécule d'acétate et d'une molécule d'isocitrate. Le cycle du glyoxalate est essentiel pour l'utilisation de l'acétate et les acides gras comme sources de carbone. Trois enzymes sont impliquées dans ce cycle, l'isocitrate lyase qui convertit l'isocitrate en glyoxalate, la malate synthase qui catalyse la fixation de l'acétyle CoA sur le glyoxalate pour former le malate. Enfin l'isocitrate deshydrogénase kinase /phosphatase qui inactive par phosphorylation l'isocitrate deshydrogénase, une enzyme du TCA, qui convertit l'isocitrate en α kéto glutarate.

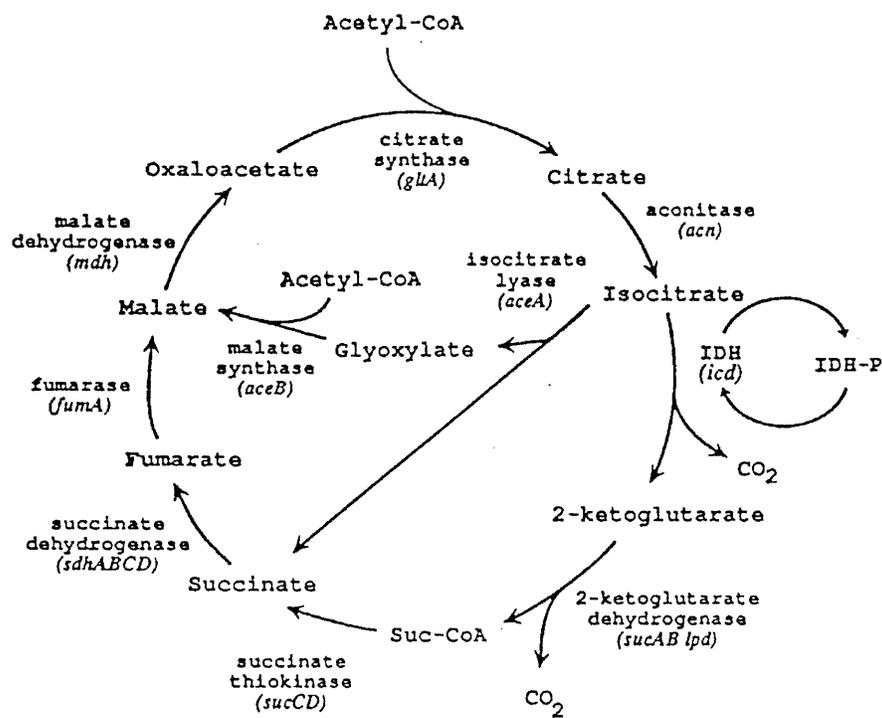


Figure 3. Cycle des TCA et le cycle du glyoxalate, tirée de (31).

Cette dernière, élimine donc la compétition entre l'isocitrate lyase et l'isocitrate deshydrogénase pour l'utilisation de l'isocitrate leur substrat commun (32).

1.3.2.2 La carboxylation des composés en C₃

La plus part des microorganismes synthétisent l'OAA en réalisant la réaction de carboxylation du pyruvate ou de la phosphoénolpyruvate (PEP) (fig.2). Certains microorganismes, comme *E. coli* et *S. typhimurium*, utilisent la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) ou la PEP carboxykinase (PEPCK) pour cette réaction (33, 34, 35). Alors que d'autres comme *Arthrobacter globiformis*, *Rhodobacter capsulatus* et les levures ont une pyruvate carboxylase (PC) pour convertir le pyruvate en OAA (31, 36).

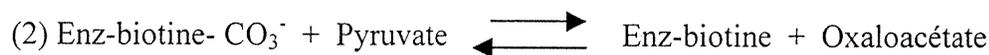
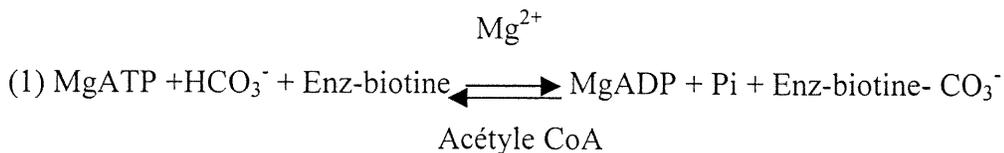
1.4 LA PYRUVATE CARBOXYLASE

1.4.1 Description et mécanisme d'action

La pyruvate carboxylase (PC ; EC6.4.1.1) catalyse la réaction de synthèse de l'OAA à partir du pyruvate, de l'HCO₃⁻ et de l'ATP. C'est une enzyme hautement conservée retrouvée chez les hommes, les animaux, les plantes, les moisissures et les bactéries (37, 38). Elle appartient à la famille des carboxylases biotine dépendantes à laquelle appartiennent entre autre l'acétyle CoA carboxylase, l'OAA décarboxylase et la propionyle CoA carboxylase. Elle utilise la biotine comme cofacteur. En effet, la biotine liée de façon covalente au site actif de la PC, agit comme le transporteur des groupements carboxyles mobiles selon le mécanisme de ping-pong (39). Le site actif de la PC est composé de deux sous-sites séparés dans l'espace qui se connectent fonctionnellement par la biotine.

1.4.2 La réaction catalysée par la PC

La réaction catalysée par la PC se fait en deux étapes qui ont lieu dans chacun des sous-sites.



Dans la première réaction partielle, le groupement carboxyle de l' HCO_3^- se fixe à la biotine pour former le complexe enzyme-carboxybiotine. C'est une réaction ATP dépendante qui a lieu en présence de l'acétyle CoA. Dans la deuxième réaction partielle, le groupement carboxyle de la carboxybiotine est transféré au pyruvate pour former l'OAA (40, 41). En réalité, c'est la liaison du pyruvate à l'enzyme qui induit le déplacement du groupement carboxyle dans le deuxième sous-site (42).

1.4.3 Structure de la PC

La structure quaternaire de la PC a été établie, il existe deux types de PC. Le premier, retrouvé chez *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus stearotherophilus*, les levures et les eucaryotes en général, est constitué de quatre sous unités α de 110 à 130 kDa chacune, la PC native est un homotétramère α_4 (39, 43). Chacune des sous unités α contient un site de fixation pour l'acétyle CoA, l'ATP, et le pyruvate, et un site de fixation pour la biotine (37, 41).

L'autre type de PC, $\alpha_4\beta_4$, retrouvée chez *Pseudomonas citronellolis*, *Azotobacter vinelandii* et *Methanobacterium thermoautotrophicum*, est une association de quatre sous-unités α de 65 kDa contenant les sites catalytiques et quatre sous-unités β de 54 kDa (44, 45). Chacune des sous unités des deux types de PC contient un ion métallique bivalent Mn^{2+} chez les vertébrés ou Zn^{2+} chez les levures. Ces ions ont un rôle plus structural que catabolique (46, 47, 48 et 49). Quelle que soit sa structure α_4 ou $\alpha_4\beta_4$, la PC contient trois domaines fonctionnels. Dans sa région N-terminale, un domaine pour la carboxylation de la biotine, un domaine pour la transcarboxylation dans sa région centrale et enfin, un domaine porteur de la biotine à son extrémité C-terminal (fig.4) (50).

1.4.4 Localisation subcellulaire

Selon le type d'organisme auquel on s'adresse, on distingue deux localisations subcellulaire pour la PC. Ainsi, chez les vertébrés, la PC se situe dans la matrice mitochondriale (51, 52) alors qu'elle est essentiellement cytosolique chez les champignons filamenteux, les levures et les bactéries (52).

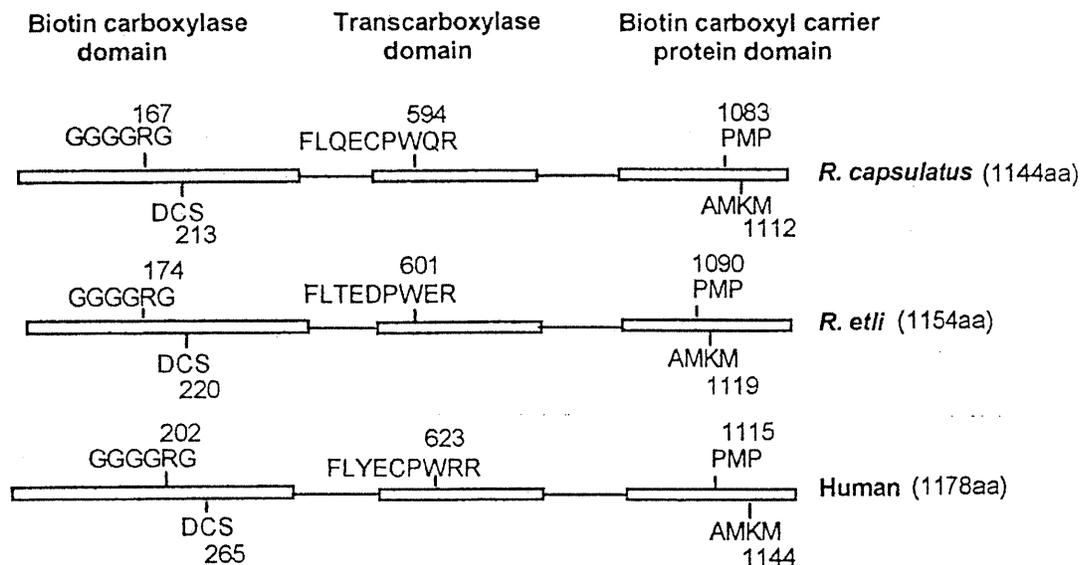


Figure 4. Représentation schématique des domaines structuraux de différentes pyruvate Carboxylases. Les séquences ont été tirées de (97) pour la PC humaine et de (43) pour la PC de *R. etli*

1.4.5 Synthèse de la PC

Comme toutes les carboxylases biotine dépendantes, la formation d'une PC active ou holocarboxylase est le résultat d'une modification post-traductionnelle qui affecte sa forme inactive appelée apoenzyme. Cette modification consiste à l'établissement d'une liaison covalente spécifique entre la biotine et un résidu de lysine situé près de l'extrémité C-terminal de l'apoenzyme. Cette réaction de biotinylation, qui entraîne un changement de conformation de la PC (53), est catalysée par une biotine ligase connue sous le nom d'holocarboxylase synthase (54).

1.4.6 Rôles physiologiques de la PC

La pyruvate carboxylase est indispensable pour l'induction de la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas chez l'homme et le rat. En effet l'absence d'activité PC est associée au diabète parce que dans ces conditions, l'induction de la sécrétion de l'insuline par le glucose est inhibée dans les cellules β (55, 56).

En plus de sa fonction anaplérotique, la PC catalyse la première réaction de la voie de la gluconéogenèse. La gluconéogenèse est la voie qui permet la synthèse du glucose endogène en convertissant les composés carbonés en C_3 en glucose (39). La présence d'un taux de PC et d'autres enzymes gluconéogéniques très élevé dans le cortex rénal et le foie, suggère que son premier rôle dans ces tissus est de participer à la gluconéogenèse. Et le fait que la synthèse de la PC et des autres enzymes gluconéogéniques augmente pendant les périodes de jeûne et de faim, quand certains organes comme le cerveau ont besoin du glucose endogène vient soutenir cette suggestion (57, 58).

Par sa fonction anaplérotique, la PC participe aussi à la lipogenèse car elle est fortement exprimée pendant la différenciation des adipocytes (59). D'autre part, la PC joue un rôle important dans le tissu adipeux où elle contribue à la régénération d'une proportion importante de NADPH utilisé dans la lipogénèse. En effet, la régénération du NADPH est couplée au transport des groupements acétyles des mitochondries vers le cytosole pour la synthèse des acides gras (60) (fig.5). La PC intervient aussi dans les astrocytes où elle contribue à la synthèse des porphyrines et de la glutamine, un acide aminé neurotransmetteur (61, 62).

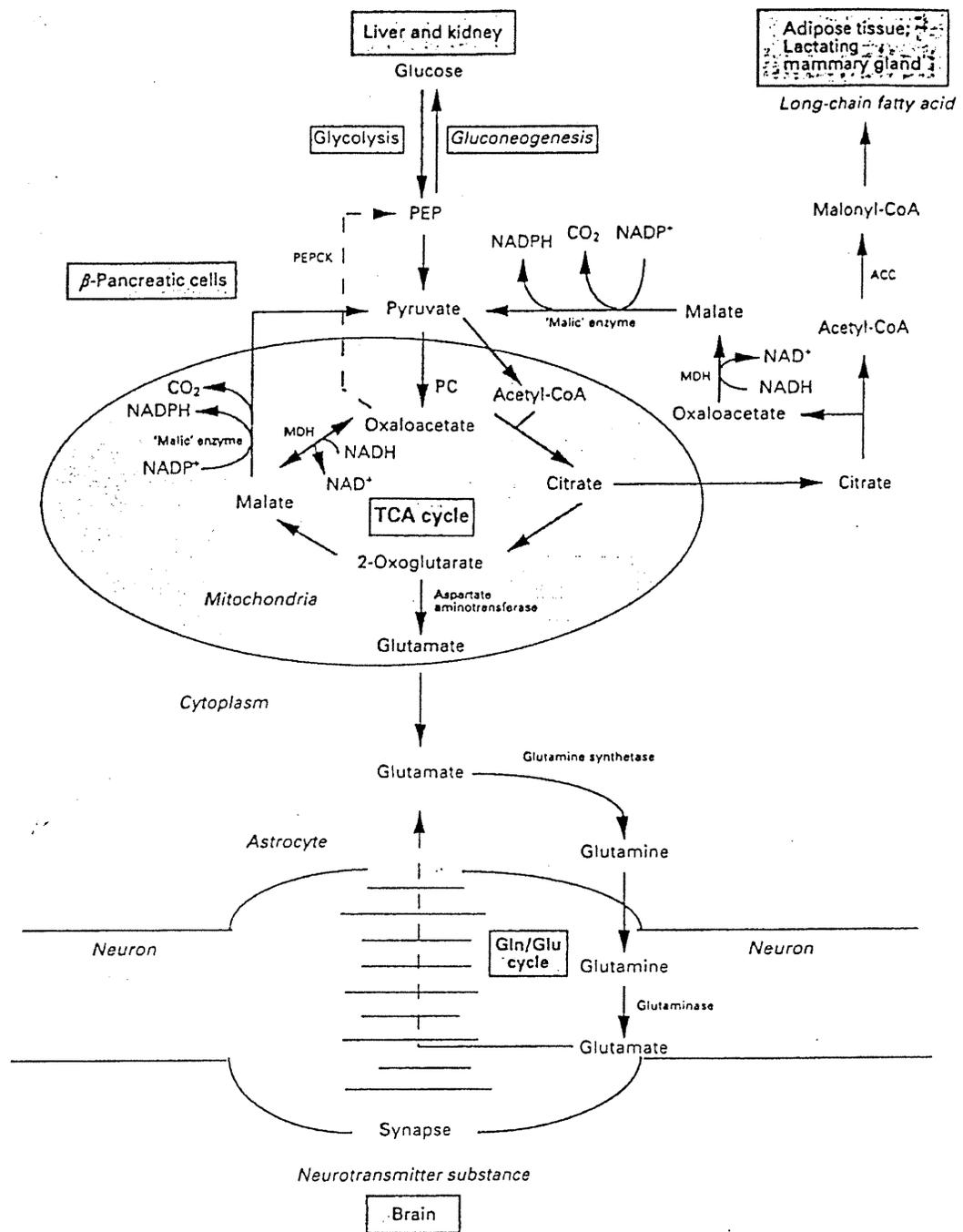


Figure 5. Représentation schématique des fonctions anaplerotiques de la PC chez les mammifères, tirée de (50).

Une étude menée chez l'humain a montré que les enfants nés avec une déficience en PC ont des taux anormalement élevés d'acide lactique, d'ammonium, de citrulline et de lysine dans le sang, ils meurent à l'âge de trois mois. Ceux qui naissent avec une activité PC résiduelle, développent des retards psychomoteurs et des acidémies lactiques épisodiques quand ils atteignent l'adolescence (63).

La PC a une fonction essentiellement anaplérotique chez les microorganismes. Ainsi il a été montré qu'en tant qu'enzyme anaplérotique, la PC est essentielle pour la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en présence du glucose, quand elle est dépourvue de PEPC, et du lactate (64). De la même manière, il a été rapporté que *R. etli.* et *R. tropici* n'utilisaient la PC qu'en présence du glucose ou d'autres sources de carbone métabolisés via les composés en C3, comme le pyruvate, pour synthétiser les composés en C4 (43). Une étude récente a démontré que la PC rétablissait la production du succinate chez les souches d'*E. coli* portant une mutation nulle *pepc* (65). Mais elle participe aussi à la gluconéogenèse chez de nombreux microorganismes dont *Bacillus subtilis* (66).

Chez les plantes où le glucose est synthétisé pendant la photosynthèse, elle doit avoir un rôle alternatif dans la gluconéogenèse à un stade spécifique de développement, son rôle reste à définir (67).

1.4.7 Régulation de l'activité enzymatique de la pyruvate carboxylase

L'activité enzymatique de la PC peut être soumise à une régulation allostérique dont les effecteurs dépendent à la fois de sa localisation subcellulaire, de sa structure et de l'organisme qui la contient. Quand elle est chez les vertébrés, son activité est activée par les dérivés acyle CoA de courte chaîne dont l'acétyl CoA. Chez les levures les dérivés acyles

CoA de longue chaîne comme le palmitoyl CoA l'active alors que l'aspartate et le 2-oxoglutarate l'inhibent. Ces deux inhibiteurs allostériques n'ont aucun effet sur l'activité de la PC mitochondriale (68). De manière générale la PC de type α_4 est activée, de façon allostérique, par les dérivés acyles du CoA alors que le type $\alpha_4\beta_4$ est insensible à ces dérivés acyles (68).

1.4.8 Régulation de la synthèse de la PC

La régulation de la synthèse de la PC est peu connue, cependant les études menées chez les organismes divers ont abouti aux conclusions suivantes.

1.4.8.1 Chez l'homme et le rat

Il existe une copie unique du gène *pyc* qui code pour la PC dans les cellules sécrétrices d'insuline chez l'homme et le rat (69). La transcription de ce gène unique est sous le contrôle de deux promoteurs (fig.6) dont l'activité, spécifique au tissu dans lequel le gène se trouve, donne deux transcrits primaires épissés en cinq transcrits matures ou ARNm différents par leurs régions 5' non traduites (70, 71). Il a été montré que ces régions 5' non traduites contrôlent la traduction de ces différents transcrits, en formant une structure secondaire qui empêche les ribosomes d'accéder au site cap, *in vitro* et *in vivo* (72).

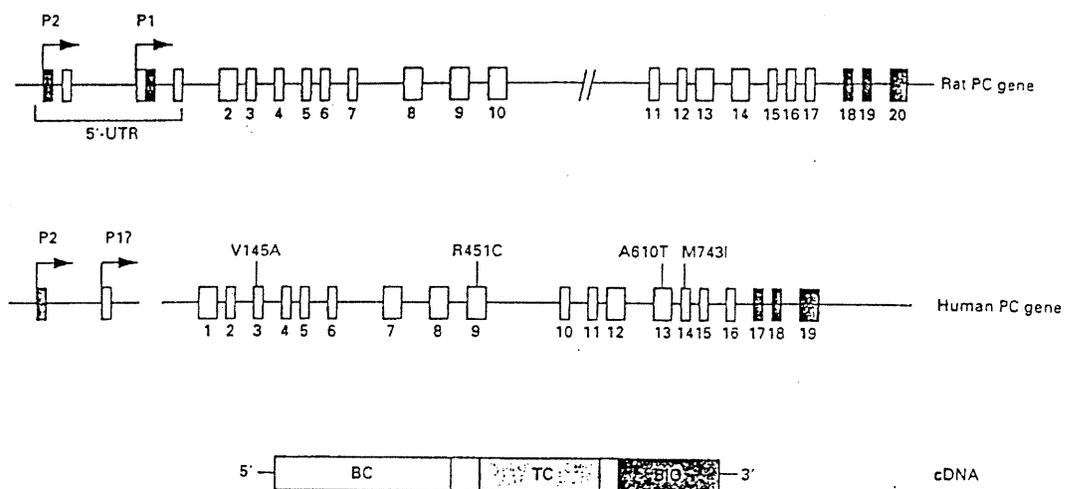


Figure 6. Organisation structurale du gène *pyc* chez le rat et l'homme,
tirée de (50).

Le promoteur proximal n'est actif que dans les tissus gluconéogéniques (foie et rein) et lipogéniques (tissu adipeux), alors qu'on retrouve les transcrits issus de l'activité du promoteur distal, nécessaire à l'anaplérose, dans une grande variété de tissus (70). L'insuline inhibe de façon sélective l'activité du promoteur proximal (71). Le glucose augmente le taux des ARNm de la PC et de la PDH dans les cellules des îlots pancréatiques, ce qui suggère que ces gènes portent des éléments nécessaires pour la réponse au glucose dans leurs régions régulatrices (73).

1.4.8.2 Chez *Saccharomyces cerevisiae*

On trouve deux gènes *pyc1* et *pyc2*, chez *Saccharomyces cerevisiae*, qui codent pour deux isoenzymes PC1 et PC2 différents par leur région 5' non codante (74, 75, 76). Sur un milieu minimum et en présence du glucose, la synthèse de PC2 est activée au début de la première phase de croissance et réprimée pendant le reste de la période de croissance.

Alors que PC1 est synthétisée de façon constante pendant la phase principale de croissance. Le fait que les deux promoteurs soient inactivés dans la dernière phase de croissance, suggère que ces deux protéines aient des fonctions métaboliques séparées. Ainsi PC1 jouerait un rôle important dans le maintien de la croissance en carence d'oxygène et dans l'établissement de la croissance en condition de gluconéogenèse, alors que PC2 permettrait la croissance sur une source de carbone métabolisée par la voie de la glycolyse (77). De plus, la séquence non codante du gène *pyc1* est dépourvue de la queue poly dA/ dT, élément caractéristique des gènes exprimés de façon constitutive (78, 79).

1.4.8.3 Chez *Bacillus stearothermophilus*

Bacillus stearothermophilus (*B. stearothermophilus*) est une bactérie thermophile. L'activité de sa PC est inhibée par la L-aspartate et l'ADP, et activée par l'acétyl CoA. L'acétyl CoA et la L-aspartate, qui sont des effecteurs allostériques, augmentent la thermostabilité de l'enzyme à 55°C, mais à 60°C seul l'acétyl CoA peut le faire ce qui suggère que ces deux effecteurs aient deux sites de fixation distincts sur la PC (80).

La régulation de la synthèse se fait au niveau de l'étape de biotinylation, de l'holoenzyme PC, catalysée par l'holocarboxylase synthase. Ce nouveau type de régulation qui se fait en limitant la réserve de biotine a été aussi mis en évidence chez les levures, et dans les cellules hépatiques de rat et de poulet. En effet de nombreuses études (81, 82, 83 et 84) ont montré que l'addition de la biotine dans le milieu de culture augmente jusqu'à cent fois l'activité spécifique de la PC chez *B. stearothermophilus* et restaure cette activité chez les rats incapables de produire la biotine. Dans un milieu de culture non supplémenté en biotine, les cellules synthétisent l'apoenzyme et l'holocarboxylase synthase mais elles sont incapables de former l'holoenzyme. Ce qui conduit à la conclusion que l'holoenzyme synthétise a

une faible affinité pour la biotine, et qu'elle a besoin des concentrations intracellulaires de biotine élevées pour biotinyler l'apoenzyme. L'acétyl CoA est un effecteur allostérique positif de l'holoenzyme synthétase car l'addition de l'acétyl CoA dans un milieu dépourvu de biotine restaure l'activité PC de *B. stearothermophilus*.

1.4.8.4 Chez *Pseudomonas citronellolis*

Chez *Pseudomonas citronellolis*, la synthèse de la PC dépend de la source de carbone du milieu de croissance. Elle est synthétisée en présence de lactate, l'aspartate inhibe sa synthèse (85).

1.5 Régulation de la PC chez *Rhodobacter capsulatus*

R. capsulatus est une bactérie photosynthétique. Elle a un métabolisme versatile car elle est capable de croître à la fois en présence de lumière de façon anaérobie et dans l'obscurité en présence ou en absence d'oxygène. Quelles que soient les conditions de croissance, elle utilise le CO₂ ou des composés organiques tels les carbohydrates et les intermédiaires du TCA comme source de C (86, 87).

La présence des activités PEP carboxykinase (PEPCK), PEPC et PC a été mise en évidence dans les extraits cellulaires de *R. capsulatus* (fig.7)(87). Cependant la PC semble être la majeure enzyme anaplérotique de cette bactérie, car les souches portant une mutation dans le gène *pyc* sont incapables d'utiliser le pyruvate et les substrats métabolisés via le pyruvate comme source unique de C. De grandes avancées ont été faites, dans la compréhension biochimique et génétique de la fixation du CO₂ par les bactéries photosynthétiques (87, 88), mais de nombreuses interrogations subsistent sur le métabolisme hétérotrophique du carbone et son contrôle moléculaire.

Il a été montré que l'activité de la PC est faible dans les extraits cellulaires de *R. capsulatus* quand elle utilise le malate ou l'acétate comme source de C, et que ses extraits cellulaires ont une activité PC très élevée quand elle utilise le lactate (89). Récemment, la PC de *R. capsulatus* a été purifiée et caractérisée biochimiquement (90, 91). La régulation de sa synthèse a été étudiée de façon quantitative par immunoblot lors des travaux entrepris dans notre laboratoire (90). Ainsi la synthèse de la PC est induite par la pyruvate, réprimée par les intermédiaires du TCA, stimulée par l'aérobiose, directement corrélative au taux de croissance, directement proportionnelle au ratio pyruvate/ acides C-4 dicarboxyliques intracellulaire.

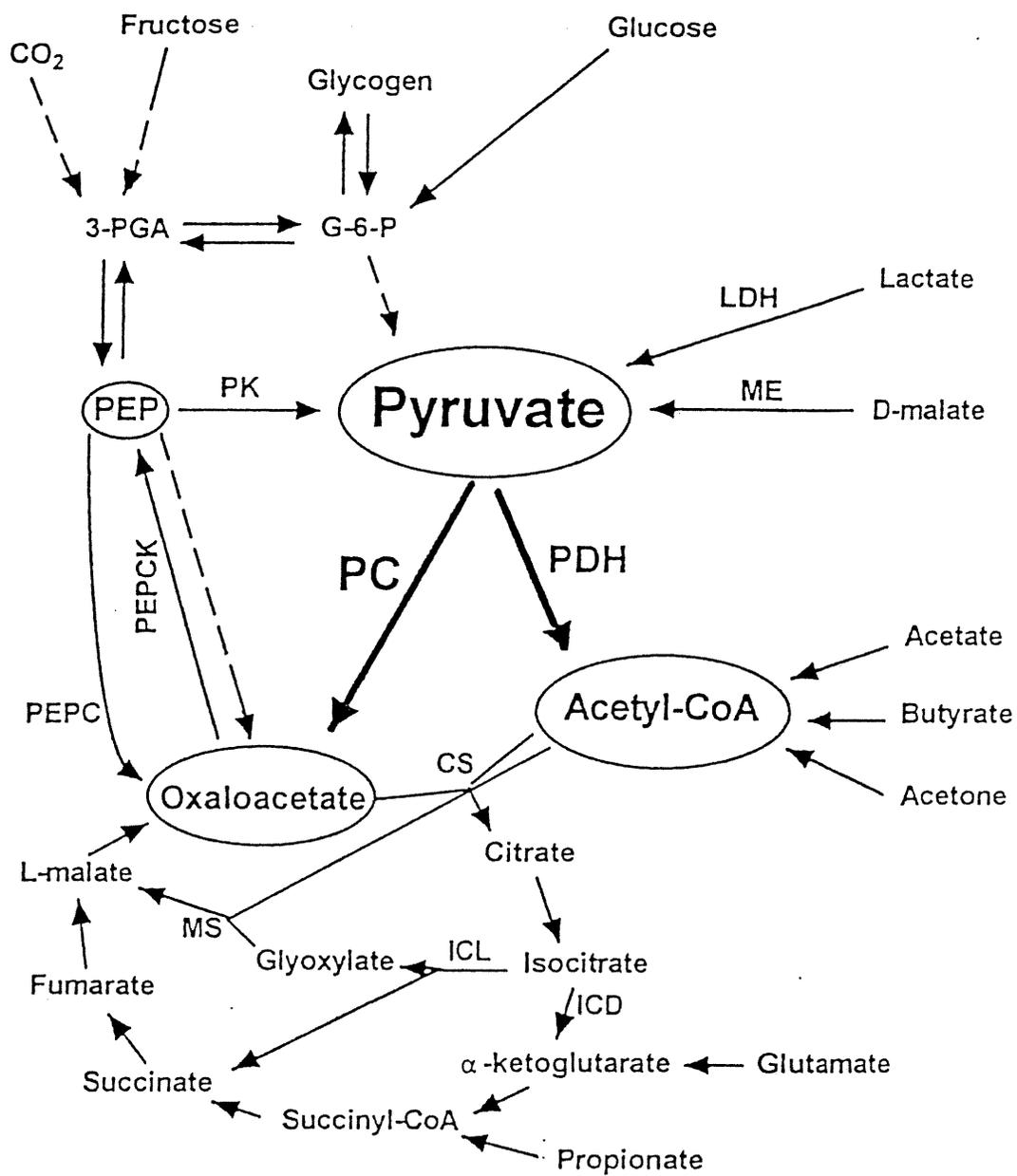


Figure 7. Les voies centrales du métabolisme du carbone chez *R. capsulatus*, tirée de (99).

1.6 Description du projet de recherche

1.6.1 Hypothèse de travail

Les études réalisées dans notre laboratoire sur l'analyse des taux intracellulaires de pyruvate et des intermédiaires du TCA de *R. capsulatus* dans différentes conditions de culture, démontrent que son contenu en PC est directement proportionnel au rapport entre le pyruvate et les C-4 dicarboxylates. Ces résultats suggèrent que la régulation de la synthèse de la PC par l'oxygène et sa corrélation directe avec le taux de croissance doivent refléter ce qui se passe au niveau de la balance intracellulaire du pyruvate et des C-4 dicarboxylates. Notre hypothèse de travail est qu'il existe un mécanisme régulateur spécial qui contrôle la synthèse de la PC au niveau transcriptionnel chez *R. capsulatus*. Pour cela nous proposons deux modèles, le premier fait intervenir un seul régulateur transcriptionnel dont la capacité de se fixer à l'ADN est régulée par la balance intracellulaire pyruvate/C-4 dicarboxylates. Dans le deuxième modèle, deux régulateurs transcriptionnels sont impliqués, un qui en présence de l'oxygène active la transcription du gène *pyc* et l'autre qui réprime l'expression de la PC en présence des C-4 dicarboxylates.

Nos recherches bibliographiques nous ont menés à deux enzymes, bien étudiées chez les entérobactéries, dont la synthèse est induite par le pyruvate. Il s'agit du complexe de la pyruvate deshydrogénase (PDH) et de la pyruvate formate lyase (PFL). Le complexe PDH de *E. coli* comprend trois enzymes codés par les gènes *aceE*, *aceF* et *lpd* de l'opéron *pdhR-aceEF-lpd* (92). Le premier gène de l'opéron, *pdhR*, code pour le régulateur PdhR qui réprime l'activité du promoteur *pdh* (92). La synthèse du complexe PDH est induite par le pyruvate, qui affecte de façon spécifique la capacité de PdhR à se lier à l'ADN (92, 93) et est partiellement réprimée par un excès de glucose, d'acétate ou d'intermédiaires de TCA (92). La

deuxième enzyme régulée par le pyruvate chez *E. coli*, la PFL, est l'enzyme centrale du métabolisme anaérobie du glucose. Elle catalyse le clivage non oxydatif du pyruvate en acétyl CoA et formate (94). L'induction de sa synthèse en anaérobiose implique la participation des régulateurs transcriptionnels FNR et ArcA, et son expression est plus élevée en présence du pyruvate (95).

Récemment, l'analyse des séquences (96) a révélé la présence d'un cadre de lecture ouvert ou orf, associé au gène *fnr* chez *R. capsulatus*, qui code pour une protéine de 28,68 kD appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels GntR (Prosite: PDOC 00042). Les régulateurs GntR ont tous en commun un motif hélice-tour-hélice à leur extrémité N-terminal (fig.8) et ils sont impliqués dans la régulation du métabolisme du carbone chez de nombreuses bactéries (98). Parmi les régulateurs de cette famille chez *E. coli* on trouve PdhR, le répresseur de l'opéron pyruvate deshydrogénase; GlyC, l'activateur du locus malate synthase; FadR, le régulateur multifonctionnel du métabolisme des acides gras. Nous avons introduit une mutation dans ce nouvel orf en y insérant la cassette de la résistance à la kanamycine (Kan^R). Le mutant de *R. capsulatus* obtenu, souche RcAY67, présente des caractéristiques intéressantes, la synthèse de la PC n'est plus inhibée par les intermédiaires du TCA et l'activité enzymatique du complexe PDH diminue de cinq à dix fois. Les caractéristiques combinées de la protéine codée par cet orf et du mutant RcAY67, nous permettent de penser que l'orf trouvé code pour un régulateur transcriptionnel, baptisé RcpdhR, impliqué de façon directe ou non dans la régulation de la synthèse de la PC chez *R. capsulatus*.

Nous avons plusieurs raisons d'entreprendre cette étude chez *R. capsulatus*. D'abord parce que le phénomène de catabolique répression inverse a été mis en évidence chez *R. capsulatus*, et nous pensons que l'étude de la régulation de PC chez cette bactérie nous dévoilera l'existence d'un ou plusieurs nouveau(x) mécanisme(s) régulateurs. Ensuite parce que la PC est la seule enzyme anaplérotique liée au pyruvate connue chez *R. capsulatus*, elle représente donc un modèle simple pour l'étude de la régulation métabolique d'une enzyme anaplérotique. Enfin parce que deux voies anaplérotiques, indépendantes du pyruvate, sont présentes chez *R. capsulatus*, il s'agit du cycle du glyoxalate et de la propionyle-CoA (99). Nous pensons que le modèle de régulation de la PC peut potentiellement être étendu à d'autres systèmes anaplérotiques. De plus le gène *pyc* a été cloné, sa séquence est bien connue, et les manipulations génétiques sur *R. capsulatus* sont bien développées.

L'activité du promoteur *pyc* est suivie au moyen d'une fusion traductionnelle entre le promoteur *pyc* et le gène rapporteur *lacZ*. L'activité β galactosidase (β -Gal) de la fusion *pyc-lacZ* est dosée dans la souche sauvage et le mutant *RcpdhR* de *R. capsulatus* dans les conditions de culture variées, pour confirmer les résultats obtenus par immunoblot et mettre en évidence la régulation transcriptionnelle de la synthèse de la PC. Les fragments générés par les délétions unidirectionnelles du promoteur *pyc* sont fusionnés au gène *lacZ*. L'activité β -Gal de ce deuxième type de fusion nous permet d'identifier à la fois les régions du promoteur impliquées dans la régulation en *cis* de l'expression de la PC, la séquence minimale nécessaire au maintien de l'activité du promoteur *pyc* et enfin le nombre de régulateurs impliqués dans cette synthèse.

Afin d'étudier une éventuelle interaction directe entre RcPdhR et le promoteur *pyc*, nous avons surexprimé et purifié RcPdhR pour l'utiliser

dans des expériences d'Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) ou retard de migration sur gel. Une telle analyse réalisée en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs connus de la synthèse de la PC, nous apporte des informations préliminaires sur le type, directe ou non, de l'interaction entre le régulateur et le promoteur *pyc*, et les conditions qui favorisent cette interaction.

CHAPITRE II
MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MILIEUX DE CULTURE

2.1.1 Milieu Luria-Bertani(LB)

Bactotryptone : 10g; extrait de levure : 5g; NaCl : 5g; eau distillée :1l. Pour un milieu solide, agar :15g.

2.1.2 Milieu 2YT

Bactotryptone : 16g; extrait de levure : 10g; NaCl : 5g; eau distillée : 1L, le pH est ajusté à 7 avec le NaOH 10M.

2.1.3 Milieu YPS

CaCl₂ (1M): 2mL; MgSO₄ (1M) : 2ml; extrait de levure : 3g; bactopectone; 3g; eau distillée :1l. Pour un milieu solide, agar : 15g.

2.1.4 Milieu minimum RCV

Milieu minimal contenant au départ des sels minéraux (98), FeSO₄.7 H₂O : 10mg par litre; tampon KPO₄ :19 mM ; une source d'azote, le (NH₄)₂SO₄ : 30mM et une source de C qui dans notre cas est le fumarate : 30mM, le lactate : 30mM; le glutamate; 30mM ou le pyruvate; 40mM.

2.1.5 Milieu SOC

Bactotryptone : 20g; extrait de levure : 5g; NaCl : 0.5g; KCl 1M; 2.5 mL; eau distillée : 900ml, le pH est ajusté avec le NaOH 10M. Après l'autoclave on rajoute le glucose stérile : 20mM.

2.1.6 Milieu ψ B

Bactotryptone :20g; extrait de levure :5g; eau distillée :990ml , le pH est ajusté à 7.6 avec du KOH et le MgSO₄;10mM est rajouté après l'autoclave.

2.1.7 Les antibiotiques utilisés.

Les antibiotiques sont ajoutés au milieu après la stérilisation aux concentrations($\mu\text{g}/\text{ml}$) suivantes.

| Antibiotique | <i>E. coli</i> | <i>R. capsulatus</i> |
|--------------|----------------|----------------------|
| Ampicilline | 50 | 50 |
| kanamycine | 25 | 25 |
| rifampicine | 25 | 25 |
| tétracycline | 25 | 0.5 |

2.2 TAMPONS

2.2.1 Tampon Tris- HCl 1M

Tris-base : 60,55g; HCl (1M) : pour pH 7,5 (34,2 ml), pour pH 7,6 (30ml), pour pH8,0 (42ml); eau distillée à 500ml.

2.2.2 Tampon T.E

Tris-HCl pH8,0 : 10mM; EDTA : 1mM.

2.2.3 Tampon Phosphate 0,1M (pH7,0).

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 4,03g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 1.38g; eau distillée à 250ml.

2.2.4 Tampon TAE 1X

TAE 50X : 20ml; eau distillée à 1l.

La solution stock de TAE 50X se compose de Tris-base : 242g; acide acétique glaciale : 57,1ml; EDTA 0,5M : 100ml; eau distillée à 1l.

2.2.5 Tampon TBE 1X

TBE 10X : 10ml; eau distillée à 1l.

La solution stock de TBE 10X contient; le Tris-base; 108g; acide borique :55g; EDTA : 40ml; eau distillée à 1l.

2.2.6 Tampon de liaison 5X pour l'EMSA

Tris-HCl pH8,0 : 20mM; MgCl₂ : 10mM; EDTA :1mM; KCl :120mM; Glycérol :10%; DTT :1mM; compléter à 5ml avec de l'eau distillée.

2.2.7 Tampon 5X pour la Mung Bean nucléase

Sodium acétate pH 5 : 50mM; zinc acétate : 0,5mM; L-cystéine : 5mM; NaCl :250mM; glycérol : 25%.

2.2.8 Tampon 2X pour l'exonucléase III

Tris-HCl pH 8 : 100mM; MgCl₂ : 10mM.

2.2.9 Tampon A pour la purification de RcpDHR

Tris-HCl pH 7,4 : 50 mM; EDTA : 1 mM; MgCl₂ : 1 mM; Na-azide : 1 mM; DTT : 1 mM; PMSF : 0,1mM; glycérol : 10%.

2.3 SOLUTIONS

2.3.1 Solution de SDS 10%

SDS : 50g; eau distillée :500ml.

2.3.2 Solution d'EDTA 0.5M (pH 8)

NaOH : 20g; EDTA : 168,1g; eau distillée à 1l .Le pH est ajusté à 8,0 avec du NaOH.

2.3.3 Acétate de potassium 3M (pH4,8)

Acétate de potassium 5M : 60ml; acide acétique glacial; 11,5ml; eau distillée à 100mL.

2.3.4 Acétate d'ammonium 7.5M

Acétate d'ammonium :57,8g; eau distillée à 100ml.

2.3.5 Acétate de sodium 3M (pH 5,2)

Acétate de sodium : 40,8g; eau distillée : 80ml. Le pH est ajusté à 5,2 avec l'acide acétique glacial et compléter le volume à 100mL avec l'eau distillée.

2.3.6 Solution TFB I

KOAc : 30mM; KCl :100mM; CaCl₂ : 10mM; MnCl₂ : 50mM; glycérol : 15%.
Le pH est ajusté à 5,8 avec l'acide acétique et la solution est stérilisée par filtration.

2.3.7 Solution TFB II

PIPES : 10mM; CaCl₂ : 75mM; KCl : 10mM; glycérol :15%. Le pH est ajusté à 6,5 avec le KOH et la solution est stérilisée par filtration.

2.3.8 SSC 10X

SSC 20X; 500ml; eau distillée :500ml.

La solution de SSC 20X se compose comme suit : NaCl :175,3g; Sodium citrate-2H₂O : 88,2g; eau distillée : 800ml. Le pH est ajusté à 7,0 avec de l'HCl et le volume est complété à 1l avec de l'eau distillée.

2.3.9 Solution stop 3X pour les digestions par les enzymes de restriction

Tris-HCl pH 7,5 : 10mM; glycérol :20%; SDS : 1%; bleu de bromophénol :0,1%.

2.3.10 Solution stop 5X pour l'EMSA

TBE 10X : 5ml; Glycérol 100% : 5ml; bleu de bromophénol : 20mg; Xylène cyanol : 20mg.

2.3.11 Solution de lysozyme

Tris-HCl (pH8,0) : 50mM; EDTA : 10mM; glucose :50mM; lysozyme :5mg /ml; RNaseA 40µg / ml.

2.3.12 Solution de lyse pour le dosage de l'activité β galactosidase

Toluène : 0,5ml; β - mercapto éthanol :2,5 ml; MnSO₄ 20mM : 0,5 ml; SDS 10% : 0,5ml

2.4 LES SOUCHES UTILISÉES

| Souches | Description | Origine |
|----------------------|---|--------------------------|
| AKOB 2 | pAKOB 2 dans DH 5 α | Cette étude |
| AKOB 21 | pAKOB 21 dans DH 5 α | Cette étude |
| AKOB 21 ² | pAKOB 21 dans BL 21 | Cette étude |
| AMO 10 | pAMO 10 dans DH 5 α | Cette étude |
| BL 21(DE3) | <i>ompT gal hsdS</i> contenant DE3, un prophage λ porteur du gène de la T7 RNA polymérase | New England Biolabs, Inc |
| DH 5 α | ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>recA endA hsdR supE</i> | Statagene |
| S17.1 | pRP4-2-Tc : : Mu-Km : : <i>Tn7</i> intégré dans le chromosome | (100) |

Tableau 1 : les souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude.

| Souches | Description | Origine |
|---------|---|---------------------------------|
| SB1003 | Souche sauvage | (101) |
| RcAB1 | pAB1 dans SB1003 | Cette étude |
| RcAB11 | pAB11 dans SB1003 | Cette étude |
| RcAB13 | pAB13 dans SB1003 | Cette étude |
| RcAB14 | pAB14 dans SB1003 | Cette étude |
| RcAB15 | pAB15 dans SB1003 | Cette étude |
| RcSAB1 | pAB1 dans RcAY67 | Cette étude |
| RcSAB11 | pAB11 dans RcAY67 | Cette étude |
| RcSAB13 | pAB13 dans RcAY67 | Cette étude |
| RcSAB14 | pAB14 dans RcAY67 | Cette étude |
| RcSAB15 | pAB15 dans RcAY67 | Cette étude |
| RcAY67 | Rc <i>pdhR</i> : : <i>kan^R</i> | Collection de notre laboratoire |

Tableau 2 : liste des souches de *R. capsulatus*.

2.5 LES PLASMIDES UTILISÉS

| Plasmides | Description | Origine |
|-----------|---|-------------|
| pAB1 | Fusion <i>pyc</i> (1,04kb)- <i>lacZ</i> dans PHU235 | Cette étude |
| pAB11 | Fusion <i>pyc'</i> (900pb)- <i>lacZ</i> * | Cette étude |
| pAB13 | Fusion <i>pyc'</i> (600pb)- <i>lacZ</i> | Cette étude |
| pAB14 | Fusion <i>pyc'</i> (500pb)- <i>lacZ</i> | Cette étude |

| | | |
|----------------|---|---------------------------|
| pAB15 | Fusion <i>pyc'</i> (300pb)- <i>lacZ</i> | Cette étude |
| pAKOB2 | <i>RcpdhR</i> (1,6kb) cloné dans pT7-5 | Cette étude |
| pAKOB21 | pAKOB20 sans les 70 nt renfermant une séquence inversement répétée en amont du promoteur de <i>RcpdhR</i> (1,53kb) | Cette étude |
| pAMO10 | Le promoteur <i>pyc</i> cloné dans pBluescript | Cette étude |
| pAY34 | <i>RcpdhR</i> cloné dans pUC18 | Collection du laboratoire |
| pAY48 | 2,38 kb <i>HindIII</i> contenant le début du gène <i>pyc</i> et la région de son promoteur dans pBluescript | Collection du laboratoire |
| pMAS | 0.96 kb <i>PstI</i> - <i>BamHI</i> contenant le promoteur <i>pdh</i> de <i>R. capsulatus</i> cloné dans pBluescript | Cette étude |
| pBluescript II | Phagmide, amp ^R , <i>lacZ</i> contenant l'origine de réplication du phage ϕ 1 | Stratagene |
| pPHU235 | Vecteur, tet ^R , de fusion <i>lacZ</i> | (102) |
| pT7-5 | Vecteur, amp ^R , d'expression des gènes contenant le promoteur T7. | (103) |

Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés dans cette étude.

* *pyc'* est utilisé pour souligner la délétion introduite dans la région du promoteur.

2.6 MÉTHODE DE MANIPULATION DE L'ADN

2.6.1 Extraction de l'ADN plasmidique

2.6.1.1 L'extraction d'ADN plasmidique (MINI-PREP) selon le protocole de Birboim et Doly (104).

Cette technique d'extraction rapide d'ADN plasmidique permet d'obtenir environ 5 µg d'ADN à partir de 5ml de culture de nuit dans un bouillon LB.

La culture de nuit est centrifugée à 1500 rpm pendant 15 minutes et le culot bactérien est resuspendu dans 200µl de solution de lysozyme avant d'être incubé pendant 15 minutes sur la glace. On ajoute 400µl de NaOH-SDS fraîchement préparé (0,2N NaOH; 1% SDS) et on place sur la glace pendant 5 minutes après avoir inverser le tube plusieurs fois. 300µl d'acétate de potassium sont rajoutés et après 10 minutes d'incubation à -20°C , on centrifuge à 4°C pendant 15 minutes à 14 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouvel Eppendorf et on y rajoute 700µl d'isopropanol froid. Après 15 minutes d'incubation à -20°C , on centrifuge à 4°C . Le culot d'ADN est rincé avec l'éthanol 70% froid (-20°C), séché et resuspendu dans 200µl de tampon T.E. Une précipitation avec 100µl d'acétate d'ammonium 7,5 M est suivie d'une incubation à -20°C et d'une centrifugation à 4°C . Après avoir transféré le surnageant dans un nouvel Eppendorf, on lui ajoute 3 volumes d'éthanol 100% froid (-20°C) et on l'incube 15 minutes à -20°C . L'ADN est recueilli par une centrifugation de 15 minutes à 4°C et le culot est rincé avec l'éthanol 70% froid), séché et resuspendu dans 25 à 45µl de tampon T.E additionné de 40µg /ml de RNaseA.

2.6.1.2 Midi-préparation d'ADN plasmidique

Pour les applications qui exigent une grande concentration d'ADN plasmidique superenroulé, pour les délétions à l'exonucléase III, les colonnes ``Tip 100`` de Qiagen sont utilisés suivants les recommandations du fabricant.

2.6.2 Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction et ligation

La digestion de l'ADN par les enzymes de restriction et le clonage des produits de digestion dans les différents vecteurs sont faits selon les recommandations du fabricant. Les enzymes de restrictions, la ligase, les tampons de digestion et de ligation proviennent des compagnies suivantes : Boehringer Mannheim, New England Biolabs (NEB) et Bethesda Research Laboratory (BRL).

2.6.3 Méthode de purification de l'ADN : ``Gene clean``

La technique du ``Gene clean`` de Bio101 est exécutée selon les instructions du fabricant. Cette technique permet d'extraire de l'ADN d'un gel d'agarose ou de le purifier, en le débarrassant des résidus de sels, de nucléotides libres, d'enzymes de restriction etc.

2.6.4 Extraction phénol chloroforme

Un demi-volume de phénol tamponné ainsi qu'un demi-volume de chloroforme-alcool isoamylique sont rajoutés au mélange réactionnel ADN-enzyme (s). On centrifuge le tube pendant 30 secondes après l'avoir vortexer pendant 15 minutes. Après avoir recueilli la phase aqueuse dans un nouvel Eppendorf, on y rajoute un volume de chloroforme-alcool isoamylique, on vortexe et on centrifuge. La phase aqueuse renfermant

l'ADN est transférée dans un nouvel Eppendorf avant de procéder à un Gene Clean ou à une précipitation à l'éthanol.

2.6.5 Transformation d'*E. coli*

2.6.5.1 Préparation des cellules compétentes

Une quinzaine de colonies, striée la veille, sont utilisées pour ensemercer 10ml de milieu ψ B et le tout est incubé à 37 °C sous agitation. Dès que la culture atteint une D.O. à 550 nm de 0,28, on inocule 100ml de milieu ψ B avec 5ml de cette culture et, quand cette nouvelle culture a une D.O à 550 nm de 0,28, on la refroidit dans la glace. Ensuite, on centrifuge la culture à 2000 rpm pendant 10 minutes, le culot est repris dans 40 ml de solution TFB I et gardé sur la glace pendant 5 minutes. Après une deuxième centrifugation à 2000 rpm pendant 10 minutes, on resuspend le culot dans 4 mL de solution TFB II et gardé 15 minutes dans la glace. Puis des aliquots de 100 μ l de ces cellules compétentes sont faits et refroidis dans de l'azote liquide.

2.6.5.2 Transformation

Un volume maximal de 10 μ l est rajouté à 100 μ l de ces cellules compétentes, préalablement décongelées, et l'ensemble est maintenu dans la glace pendant 30 minutes. Ensuite, on fait subir un choc thermique au mélange en le faisant passer à 42°C pendant 90 secondes puis 2 minutes dans la glace. On rajoute 400 μ l de milieu ψ B au mélange et le laisse incubé à 37°C pendant 60 minutes, sous agitation, pour le délai phénotypique. Après une centrifugation à 2000 rpm pendant 2 minutes, le culot est resuspendu dans 200 μ l de milieu ψ B et étalé sur le milieu sélectif approprié (105).

2.6.6 Electroporation

L'électroporation est réalisée suivant le protocole décrit par Zabarovsky et Winberg (106).

2.6.7 Construction de la fusion traductionnelle *pyc-LacZ*

Comme illustré dans la figure 9, la fusion *pyc-lacZ* a été faite dans le vecteur de fusion PHU235(100). Le vecteur PHU235 porte le gène qui confère la résistance à la tétracycline et le gène reporteur *lacZ* dépourvu de promoteur et précédé d'un site polylinker. Nous avons utilisé un fragment d'ADN de 1,043 kb *HindIII-EcoRI* du plasmide pAY48, pour construire cette fusion. Ce fragment d'ADN contient la région du promoteur et 270 pb de la séquence codante du gène *pyc*.

Pour que la fusion soit fonctionnelle, le promoteur *pyc* doit être cloné en phase avec le cadre de lecture du gène *lacZ*. Les sites de restriction *HindIII* et *EcoRI* ne peuvent pas être retenus pour ce clonage car ils permettent l'insertion du promoteur *pyc* dans le sens inverse à celui de la transcription de *lacZ*. Nous avons donc du recourir à un plasmide intermédiaire (fig.9), le fragment *HindIII-EcoRI* a été cloné dans le plasmide Bluescript créant ainsi le plasmide pAMO10, pour avoir les sites de restriction nécessaires au clonage du promoteur *pyc* dans le bon sens. Puis pAMO10 est digéré par les enzymes de restriction *PstI* et *XhoI* et le fragment *XhoI-PstI* est cloné dans le vecteur PHU235 pour donner naissance au plasmide pAB1 portant la fusion *pyc-lacZ*. Le plasmide pAB1 est transféré dans la souche SB1003 (RcAB1) et dans la souche RcAY67 (RcSAB1) de *R. capsulatus* par la transconjugaison biparentale (107).

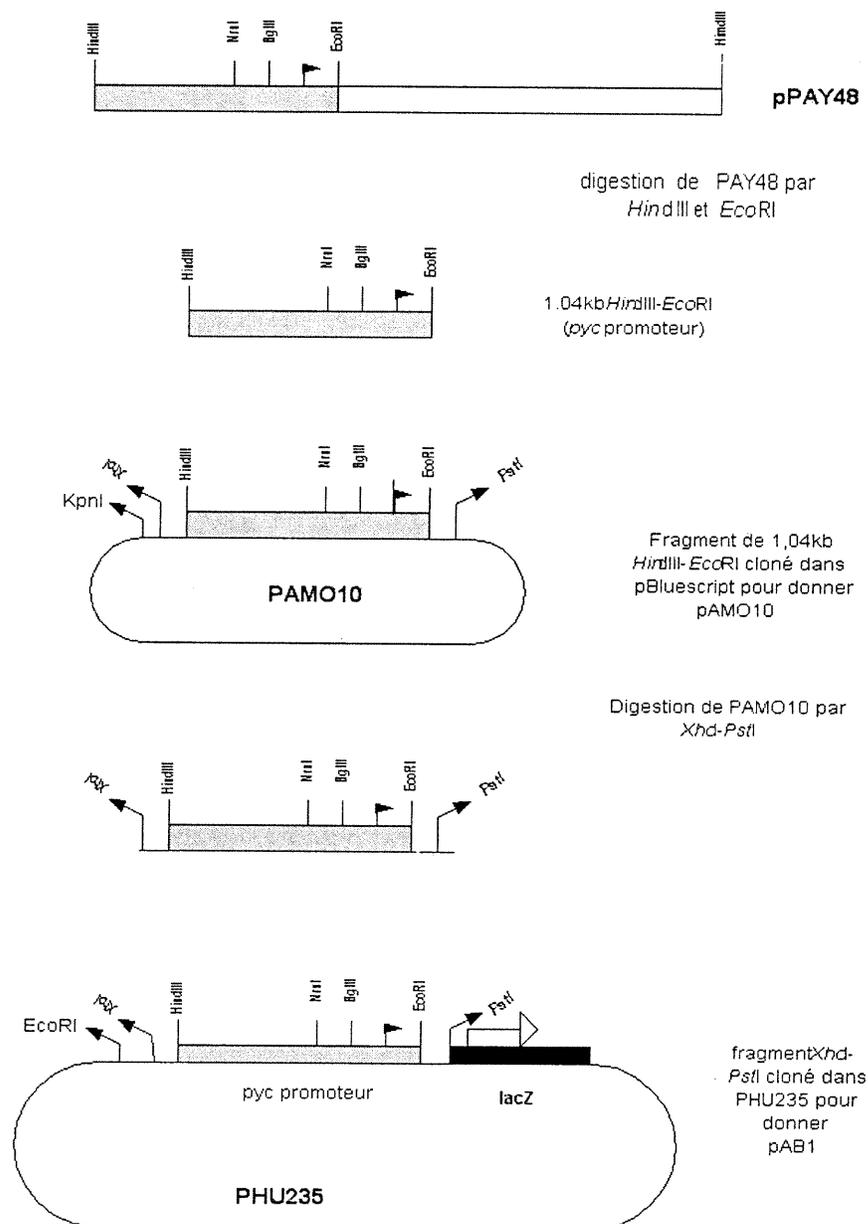


Figure 9. Construction de la fusion traductionnelle *pyc-lacZ*

2.7 La création des délétions dans le promoteur *pyc*

Les délétions unidirectionnelles du promoteur *pyc* ont été obtenues en utilisant l'exonucléase III (exoIII) et la mung bean nucléase de la compagnie BRL. L'exonucléase III digère à partir des extrémités 3' des fragments d'ADN à bouts

francs ou 5'flottantes, la mung bean nucléase quant à elle, digère l'ADN simple brin pour générer les fragments d'ADN à bouts francs.

C'est ainsi que nous avons digéré le pAMO10 par *XhoI*, qui crée des extrémités 5'flottantes, et *ApaI* qui lui crée des extrémités 3'flottantes afin de protéger la digestion de Bluescript par l'exoIII. Après la double digestion, on fait une extraction phénol / chloroforme pour éliminer les enzymes de restriction. Puis le plasmide pAMO10 digéré est mis en présence de l'exoIII et la mung bean nucléase suivant le protocole des délétions proposé par BRL. De cette manière nous avons obtenu des plasmides délétés de façon unidirectionnelle dans le promoteur *pyc* (fig.9), en effet le caractère unidirectionnel de ces délétions est confirmé par la digestion des plasmides obtenus par *KpnI* qui coupe dans bluescript et *EcoRI* qui coupe à l'extrémité 3' du fragment de 1,043kb. Seules les plasmides suivants ont été utilisés pour l'étude de l'activité du promoteur ainsi délété : pAMO11 (900pb), pAMO13 (600pb), pAMO14 (500pb) et pAMO15 (300pb).

Le clonage dans PHU235 a été fait en utilisant les sites de restriction *KpnI* et *PstI*, et les plasmides résultants pAB11 (900pb), pAB13 (600pb), pAB14 (500pb) et pAB15 (300pb). Une étape intermédiaire est nécessaire, elle consiste à vérifier le succès du clonage en faisant digérer les plasmides obtenus par *EcoRI* qui a un site de restriction dans le vecteur et un autre à l'extrémité 3' du fragment contenant le promoteur *pyc*. Ces nouveaux plasmides ont été transférés dans la souche SB1003 de (*R. capsulatus*) pour donner les souches RcAB11 RcAB13, RcAB14 et RcAB15, et dans la souche RcAY67 pour avoir les souches RcSAB11, RcSAB13, RcSAB14 et RcSAB15.

2.8 La transconjugaison biparentale

La transconjugaison biparentale est une variante de la conjugaison, qui est le mode de transfère de matériel génétique entre deux bactéries par

l'intermédiaire du pont de conjugaison. Mais dans la transconjugaison triparentale, ce transfert implique trois bactéries la première, la souche donneuse de l'ADN, qui dans notre cas est AMO10 d'*E. coli*. La deuxième, la souche réceptrice, SB1003 ou RcAY67 de *R. capsulatus* dans notre cas. Et enfin la troisième bactérie, dans notre cas la souche S17.1 d'*E. coli* qui contient dans son chromosome les sites *mob*, qui codent pour la synthèse des protéines de mobilisation, nécessaires au transfert d'un plasmide d'une bactérie vers *R. capsulatus*.

Le protocole de la transconjugaison s'étend sur deux jours. Le premier jour, on inocule 2ml de LB avec 100µl d'une culture de nuit de S17.1 à laquelle les fusions *pyc-lacZ* ont été transférées par électroporation. Après trois à quatre heures d'incubation à 37°C sous agitation, on centrifuge 0,5 ml de la culture et le culot est repris dans 0,5ml de LB. Ensuite, 0,5 ml d'une culture anaérobie, dans la lumière et à 30°C, de la souche SB1003 ou RcAY67 de *R. capsulatus*. Après avoir bien mélangé, on procède à une centrifugation et le culot est resuspendu dans 0,3 ml de milieu YPS et placé sur un filtre de nitrocellulose préalablement installé sur un petri YPS. On l'incube à 30°C pendant une nuit. Le deuxième jour, on lave les filtres de nitrocellulose avec 0,3 ml d'YPS et on fait une série de dilution 1 : 100; 1 :1000; 1 :10000. Ensuite 200µl de chacune des deux dernières dilutions sont étalés sur les milieux YPS-rif-tet pour le mélange S17.1(*pyc-lacZ*) et SB1003 ou sur les milieux YPS-kan-tet pour le mélange S17.1(*pyc-lacZ*) et RcAY67. Les milieux sont incubés à 30°C pendant deux, trois ou quatre jours si cela est nécessaire.

2.9 Les conditions de culture

Les colonies isolées et purifiées par les stries d'épuisement sont utilisées pour faire les cultures de biomasse sur les milieux cités ci-dessus et l'incubation se fait dans les mêmes conditions. C'est donc à partir de ces cultures

de biomasse qu'on lance des cultures anaérobies dans 17,1ml de bouillon YPS-rif-tet pour les souches RcAB1,11, 13, 14 et 15 ou YPS-kan-tet pour les souches RcSAB1,11, 13, 14 et 15. Les tubes de 17,1mlensemencés sont incubés à 30⁰C, dans la lumière pendant deux, trois ou quatre jours. 1ml de chaque culture liquide est utilisé pour ensemencer de nouveau 17,1ml de même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation, cette opération est répétée au moins trois fois pour avoir des cultures métaboliquement actives. C'est seulement à ce stade qu'on peut lancer les cultures dans le milieu minimum RCV-(NH₄⁺) additionné des différents intermédiaires du TCA. Pour les cultures anaérobies dans la lumière, 1ml de la culture liquide dans YPS est utilisé pour ensemencer 17,1 ml de milieu minimum supplémenté et incubé dans les mêmes conditions que précédemment. Pour les cultures aérobies dans l'obscurité, on inocule 5ml de milieu minimum supplémenté avec 0,5 ml de la culture liquide dans YPS. On recouvre le tube cappel de papier aluminium et on le place sous agitation à 30⁰C dans l'obscurité toute une nuit.

2.10 Le dosage de l'activité β galactosidase

Le protocole suivi pour le dosage de l'activité β galactosidase des fusions *pyc-lacZ* est celui décrit par Miller (108). Les unités Miller de l'activité β galactosidase sont évaluées par la formule suivante :

$$\text{Unité Miller} = \frac{1000 \times \text{D.O.420}}{\text{Temps (min)} \times \text{volume (ml)} \times \text{D.O.660}}$$

Après une incubation d'une nuit dans les milieux et les conditions de culture appropriées, les cellules sont mises dans la glace et on prend leur D.O.660. Ensuite on ajoute 100 μ l de solution de lyse à 2 ml de chacune des cultures, après avoir vortexer pendant 15 secondes, on incube au bain-marie à 28⁰C pendant 15 minutes. 0,5 ml de cellules lysées sont transférés dans un tube

13X 100mm contenant 0,5 ml de tampon phosphate 0,1M. Aussitôt fait, on ajoute 0,2 ml d'ONPG (o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) frais et on place rapidement les tubes à 28⁰C jusqu'à ce que le mélange devienne jaune. La réaction est ensuite arrêtée par l'addition de 0,5 ml de Na₂CO₃ 1M et on note le temps de la réaction (depuis l'ajout de l'ONPG). Finalement une lecture de la D.O. à 420 nm est faite avec un tube ayant tout à l'exception de l'ONPG.

2.11 Clonage et surexpression de RcPdhR

2.11.1 Clonage du gène *RcpdhR*

Le fragment de 1,6 kb *EcoRI-SacI* du plasmide pAY34, contenant le gène *RcpdhR*, a été cloné dans le vecteur de surexpression pTrc99A pour créer le plasmide pAKOB2. Mais il y a une séquence inversement répétée de 70 nt (fig.16) en amont du promoteur *RcpdhR* qui serait à l'origine de nos difficultés à surexprimer RcPdhR à partir de pAKOB2. Nous avons donc été amenés à éliminer les 70 nt, en faisant une PCR inverse, pour essayer de résoudre ce problème.

La PCR inverse illustrée dans la (fig.10) a été réalisée avec ``ExpandTM Long Template PCR System`` de Boehringer Mannheim. Le protocole a été suivi selon les recommandations du fabricant. Les amorces utilisées s'hybrident de part et d'autre des 70 nt de la matrice d'ADN qui contient la séquence inversement répétée qu'on veut déléter. Le site de restriction de *BglIII* (absent sur pAKOB2) a été rajouté en 5' des amorces pdhR1 : 5'CCAGATCTGCTGCTTACCGGTTCGGACG^{3'}, et pdhR2 : 5'CCAGATCTGTTTCTGACCACGGGAGAGA^{3'}. Le produit de la PCR est digéré par *BglIII* pendant toute une nuit, et ligué pour donner le plasmide pAKOB21.

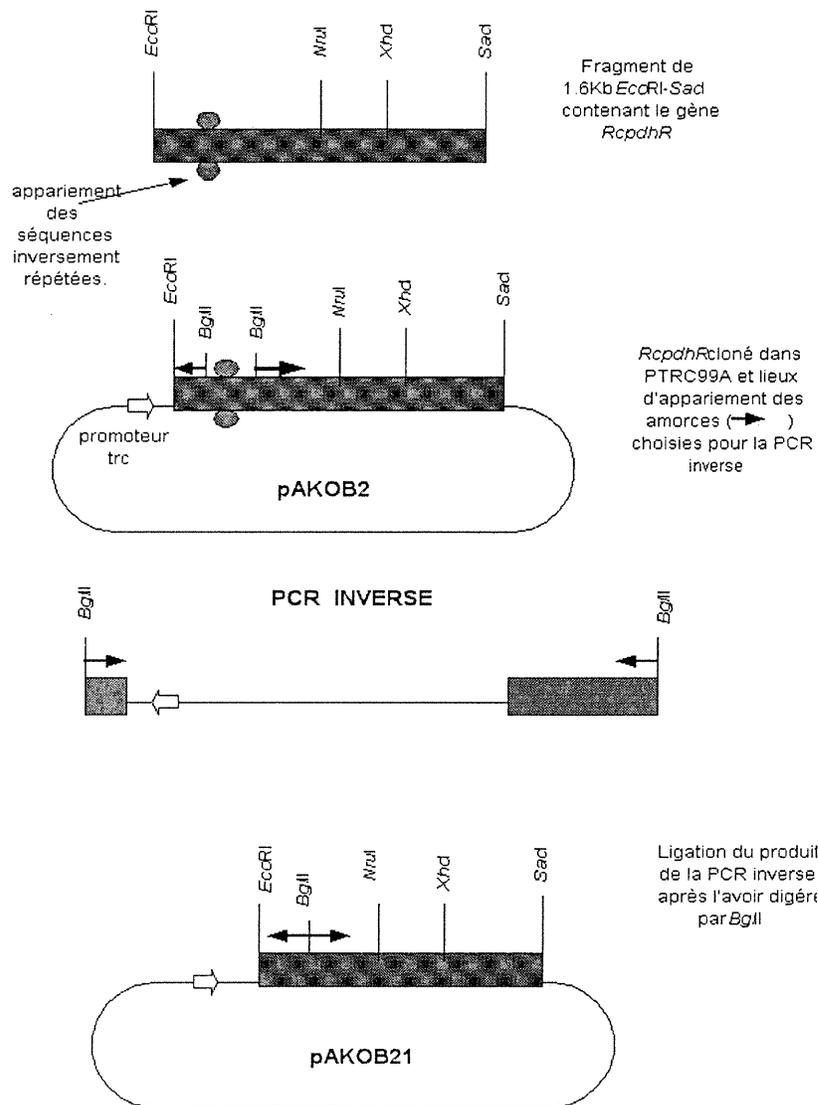


Figure 10. Schématisation de la délétion de la séquence inversement répétée située par la PCR inverse.

2.11.2 Surexpression de RcPdhR

10 ml de bouillon 2YT (ou LB), auxquels on a ajouté l'ampicilline, sontensemencés avec 100 μ l d'une culture de nuit des souches d'*E. coli* AKOB20 ou AKOB21, faite dans le même milieu. On incube la culture à 37⁰C sous agitation, une fois que sa D.O. à 600 nm se situe entre 0,6 et 1, on induit la surexpression de la protéine on ajoutant 1mM d'IPTG. La culture est incubée à 37⁰C avec agitation pour une nuit. Ensuite la culture induite est centrifugée à 12 000 rpm pendant 10 minutes et le culot est resuspendu dans 1 à 2 ml de Tris-HCl (pH 8) 100mM et soumis à la sonication(2 fois 30 secondes).

2.11.3 Purification partielle de RcPdhR

Une culture d'11 d'AKOB21, induite par l'IPTG, est centrifugée à 10000 rpm pendant 15 minutes et le culot est repris dans 30 ml de tampon PdhR A (glycérol 20%). Après la sonication, on centrifuge à 15000 tpm pendant 1 heure et le surnageant est soumis à la chromatographie sur colonne d'Heparine-sepharose (``Hi-TRAP Heparin Agarose`` d'Amersham Pharmacia Biotech) équilibré avec le tamponA. Après avoir lavé la colonne avec 10 volumes de tampon A, l'élution est faite selon un gradient linéaire de 0 à 0,5 M de (NH₄)₂SO₄ dans le tamponA. On ajoute 5 volumes de tampon A (sans sels) au produit de l'élution et on fait une dialyse contre le tampon A avant de le concentrer par ultrafiltration dans le PM10 (Amicon).

2.12 Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

Le fragment d'ADN de 1,043 kb *EcoRI-HindIII* de pAMO10, contenant la région du promoteur *pyc* et les premiers 270 pb de la séquence codante du gène *pyc*, est marqué à son extrémité 3' par la DIG en utilisant la Terminal Transférase. La réaction est réalisée en suivant le protocole du

fournisseur Amersham Pharmacia Biotech. Les expériences d'Electrophoresis Shift Mobility Assay (EMSA) sont menées selon le protocole développé précédemment pour la protéine PdhR d'*E. coli* (90). La réaction est faite dans un volume final de 15µl qui comprend, 21ng d'ADN marqué à la DIG; 5µM de RcPdhR; 110 ng d'ADN de sperme de saumon; 3 µl de Tampon de liaison 5X et 1mM des intermédiaires du TCA si nécessaire et la réaction est incubée à 30⁰C pendant 30 minutes. Après avoir rajouté 3µl de solution stop 5X, on soumet l'ensemble à l'électrophorèse (6 Volt / cm à 4⁰C) dans un gel d'agarose 0,8% (fait dans du TBE 0,5X) pendant 4 heures.

Une fois que la migration est terminée, on transfère par capillarité l'ADN sur une membrane de nylon par la technique de Southern (106). Après au moins une nuit le transfère est arrêté et la membrane est fixée de manière covalente par une exposition aux rayons ultraviolets (UV Stratalinker). La détection des bandes d'ADN sur la membrane par chimiluminescence, est faite selon le protocole décrit dans Amersham DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids.

CHAPITRE III
RÉSULTATS

3.1 RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE L'ACTIVITÉ DU PROMOTEUR *pyc* CHEZ *R. capsulatus*

3.1.1 Régulation de l'expression de la fusion *pyc-lacZ* par les conditions de cultures

Afin de déterminer à quel niveau s'exerce la régulation de la synthèse de la pyruvate carboxylase par le ratio le pyruvate / C-4 dicarboxylates et l'oxygène chez *R. capsulatus*, nous avons choisi d'étudier l'effet du pyruvate, du lactate, du glutamate, du fumarate et de l'oxygène sur l'expression de la fusion *pyc-lacZ*.

Comme on peut le voir dans la figure 11A, l'activité du promoteur *pyc* varie selon les conditions de culture. Ainsi l'activité β -galactosidase (β -Gal) maximale, en anaérobiose, est observée dans un milieu contenant le lactate comme source de carbone. Cette activité est deux fois plus petite en présence du pyruvate, ce résultat conforme aux résultats obtenus par le dosage de l'activité PC (87), est tout de même surprenant compte tenu du fait que le lactate est un substrat métabolisé via le pyruvate. Le glutamate et le fumarate, un intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques, réduisent d' au moins 75% l'expression de la fusion *pyc-lacZ*. Par ailleurs, la présence de l'oxygène dans un milieu de culture contenant le lactate, augmente de 100% l'induction de la transcription du gène *pyc* par le lactate. Ces résultats nous permettent d'abord de confirmer les résultats obtenus par immunoblot et par le suivi de l'activité PC (87), la synthèse de la PC est régulée par le rapport pyruvate / C-4 dicarboxylates intracellulaire et par l'oxygène chez *R. capsulatus*. Mais le plus important pour nous, est que ces résultats nous permettent de situer la régulation de la synthèse de la PC chez *R. capsulatus*, par les conditions de culture, au niveau transcriptionnel. Ainsi le lactate, le pyruvate et l'oxygène activent la transcription du gène *pyc* alors que les intermédiaires du TCA l'inhibent.

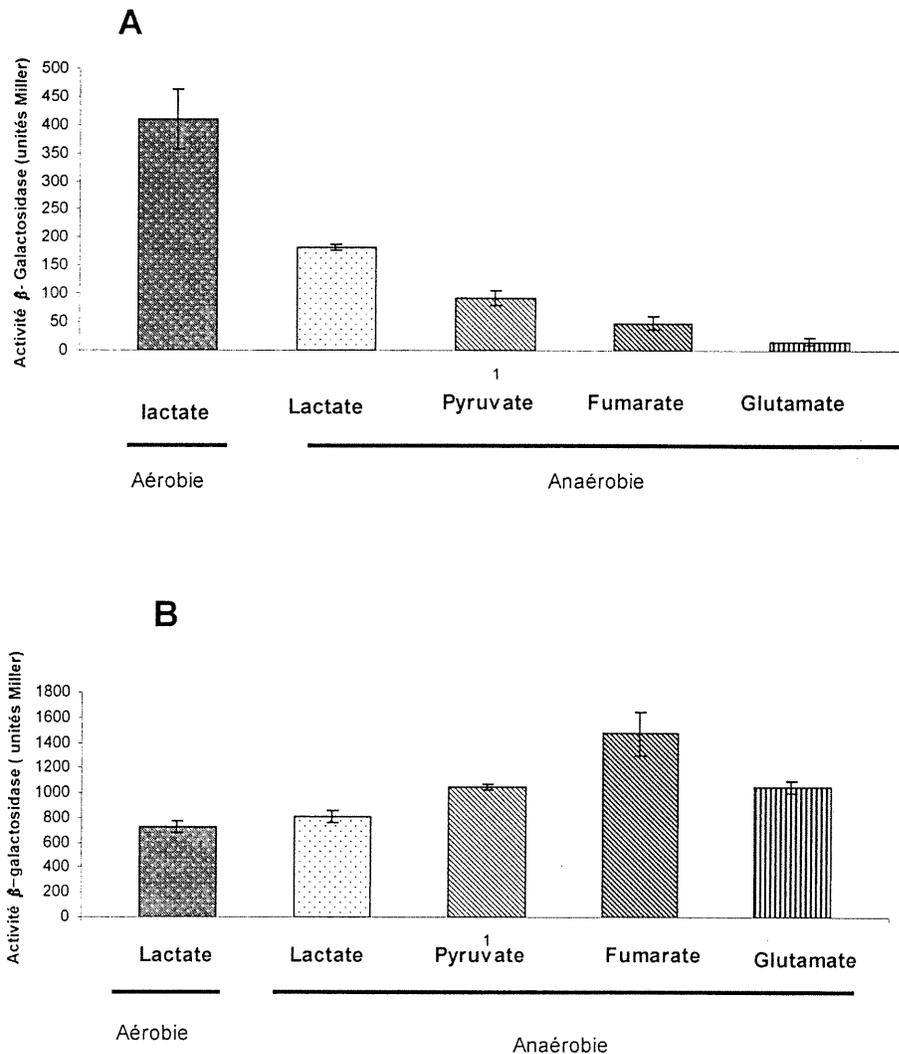


Figure 11. Régulation de l'expression de la fusion *pyc-lacZ* par les conditions de culture.

Les souches de *R. capsulatus* ont été cultivées dans le milieu minimum RCV contenant soit du lactate (30mM); pyruvate (40mM); fumarate (30mM); glutamate (30mM). Les incubations en anaérobiose et aérobie ont été réalisées tel que décrit dans matériels et méthodes. (A) représente les activités β -gal obtenues chez RcAB1 (la souche sauvage) et (B) les activités β -gal obtenues chez RcSAB1(mutant PdhR).

Les résultats représentent les activités β -galactosidase (en Unités Miller) moyennes de la fusion *pyc-lacZ* de 3 essais distincts réalisés en triplicata.

3.1.2 Effets de la mutation RcPdhR sur l'activité du promoteur *pyc*

La possibilité que la protéine RcPdhR, homologue à la PdhR d'*E. coli*, régule la synthèse de la PC chez *R. capsulatus* a été explorée en introduisant la fusion *pyc-lacZ* dans une souche mutée dans le gène *RcpdhR*.

D'une manière générale, les activités β -galactosidase de la fusion *pyc-lacZ* sont de 3 à 24 fois plus élevées chez la souche mutante RcPdhR que chez la souche sauvage (fig.11B). Mais c'est la comparaison des activités du promoteur *pyc* dans les mêmes conditions de culture qui met à jour les différences intéressantes entre les deux souches. En effet, on se rend compte que l'absence de la protéine RcPdhR lève l'inhibition de la transcription du gène *pyc* par le fumarate et le glutamate à un point tel que, c'est avec le fumarate qu'on a l'expression maximale de la fusion. De plus, on constate chez le mutant RcPdhR que le pyruvate active plus la transcription de *pyc* que le lactate. Ces résultats nous montrent que le gène *RcpdhR* isolé code pour un régulateur transcriptionnel de la synthèse de la PC chez *R. capsulatus*. Ainsi nous pouvons dire que l'inhibition de la transcription par le fumarate et le glutamate en particulier, et les intermédiaires du TCA en général, est médié par la protéine RcPdhR.

Par ailleurs, il semble que chez le mutant RcPdhR⁻ le niveau d'expression du promoteur *pyc* en aérobie est identique à celui obtenu en anaérobie si on tient compte de l'activité en présence du lactate (fig.11B). La régulation de la transcription du gène *pyc* par rapport à l'oxygène semble être perdue chez le mutant RcPdhR, ce qui nous permet de penser que la protéine RcPdhR est impliquée dans la régulation de la synthèse de la PC par l'oxygène.

3.1.3 Identification des éléments régulateurs agissant en cis sur l'activité du promoteur *pyc*

Dans le but d'identifier les éventuels sites régulateurs, situés en amont de l'extrémité 5' du gène *pyc*, impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *pyc*, nous avons créé une série de délétions unidirectionnelles de 5' vers 3' dans le fragment de 1,043 kb *EcoRI* – *HindIII* (fig.12 et fig.13). Ce fragment contient le début du gène *pyc* (270pb) et la région en amont. Les fragments délétés obtenus ont été utilisés pour construire les fusions *pyc-lacZ*, et les dosages des activités β -galactosidase chez la souche sauvage (RcAB) ou chez le mutant PdhR (RcSAB) ont été réalisés dans différentes conditions de culture (fig.14).

On observe une réduction de l'ordre de 35% de l'activité du promoteur *pyc* quand on passe de RcAB1(1043 pb) à RcAB11 (900 pb) dans un milieu contenant le lactate (fig.14A). Alors que la même délétion augmente de 60% l'activité du promoteur en présence du fumarate. Ces données nous suggèrent que la région située entre -773 et -630 (après la soustraction des 270 premiers nucléotides du gène *pyc*) contienne au moins un site régulateur impliqué dans la régulation de la transcription du gène *pyc* par le pyruvate, le lactate et le fumarate.

L'activité β galactosidase de la fusion s'annule, et devient parfois indétectable (fig.14B et fig.15), chez RcAB15 qui ne contient plus que 30 nucléotides de la région en amont du gène *pyc*. Ce résultat nous permet de dire que la région située entre -230 et -30 contient la séquence minimale et nécessaire au maintien de l'activité du promoteur *pyc*, nous pouvons ainsi situer le promoteur du gène *pyc* dans cette région.

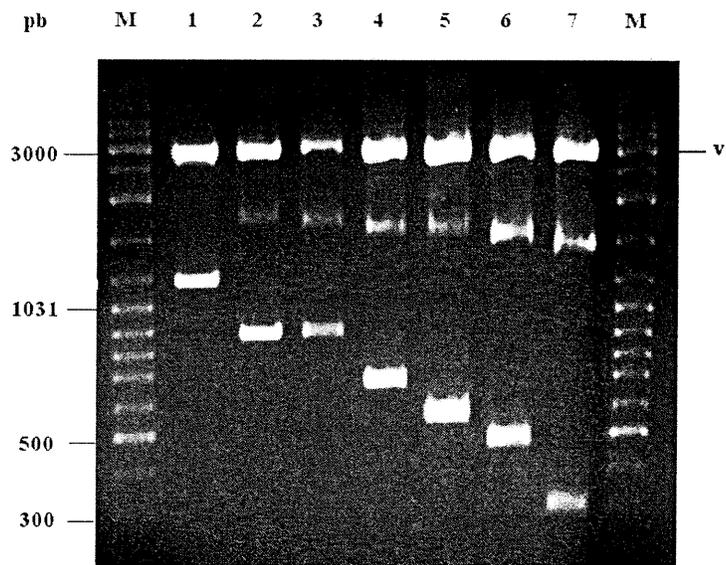


Figure 12. Délétion progressive du fragment *EcoRI-HindIII* (1,043kb).

Environ 200ng des plasmides pAMO10 (puit 1), pAMO11 (puits 2 et 3), pAMO12 (puit 4), pAMO13 (puit 5), pAMO14 (puit 6) et pAMO15 (puit 7), portant le début du gène *pyc* et la région en amont de ce gène, ont été digérés par les enzymes de restriction *KpnI* et *EcoRI* dans un volume final de 20 μ l. **M** désigne le marqueur de taille de la compagnie fermentas (# SMO333S) utilisé, de haut en bas à gauche de la figure, sont indiqués les tailles des fragments d'ADN principaux : 3000pb, 1031pb, 500pb, 300pb. **V** correspond au vecteur de clonage pBluescript.

Les poids moléculaires des fragments délétés correspondent à 1,043kb* (puit1), 900pb (puits 2 et 3), 700pb (puit 4), 600pb (puit 5), 500pb (puit 6) et 300pb (puit 7).

* l'augmentation du poids moléculaire du fragment *KpnI-EcoRI* (1100pb) est due aux paires de bases qui séparent le site de restriction *KpnI* DU site *HindIII* sur le vecteur pBluescript.

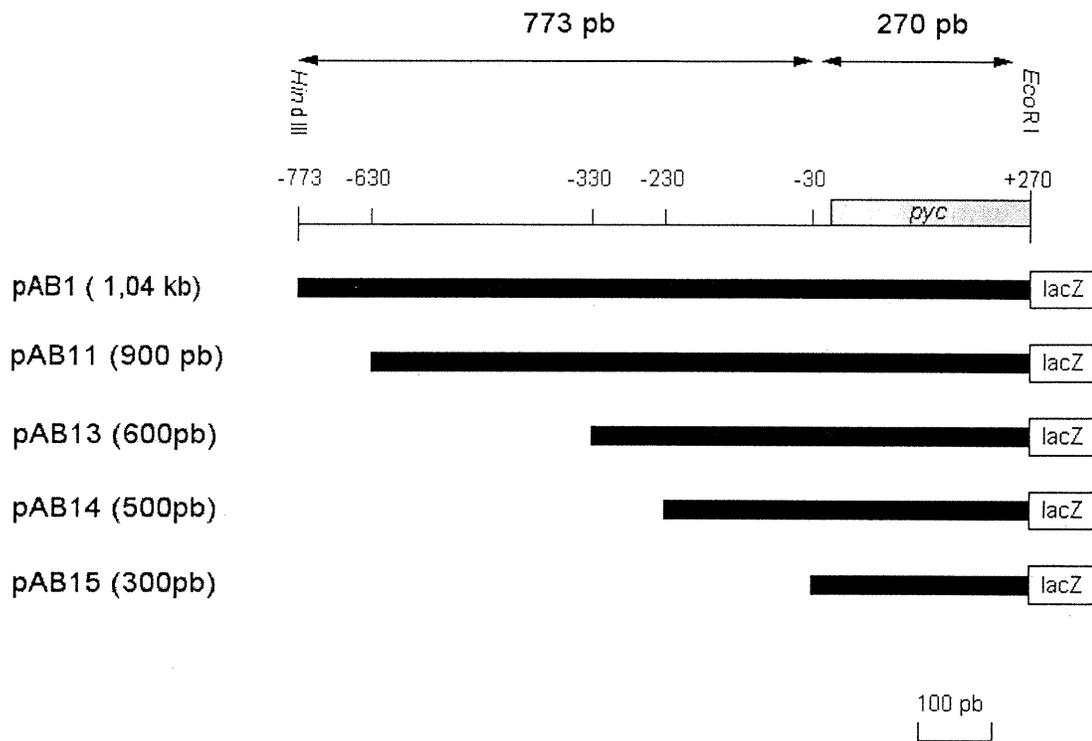


Figure 13. Schématisation des fragments délétés, impliqués dans la fusion traductionnelle *pyc-lacZ*

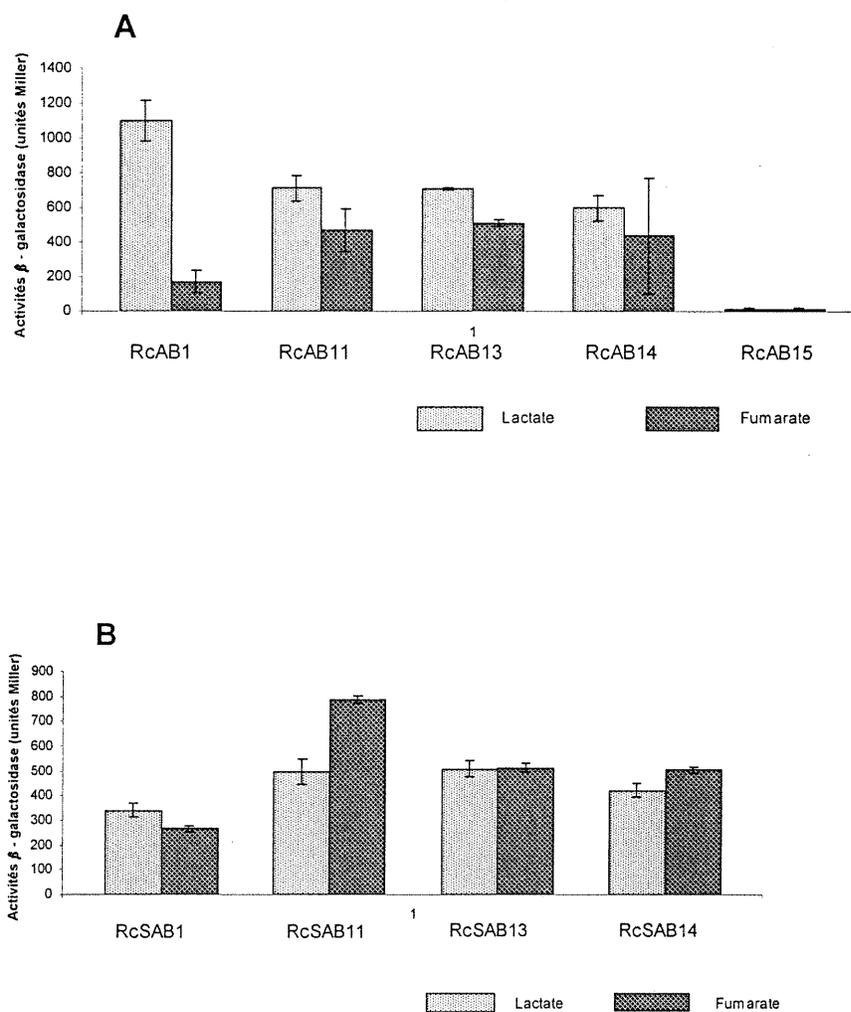


Figure 14. Activités β galactosidase des fusions construites avec les produits de délétions du fragment de 1,043kb *EcoRI-HindIII*

Les souches de *R. capsulatus* ont été cultivées dans le milieu minimum RCV contenant soit du Lactate (30mM); Fumarate (30mM). **A.** représente les activités β galactosidase chez les souches sauvages RcAB1, 11, 13,14 et 15. **B.** représente celles des souches mutées RcPdhR⁻, RcSAB1, 11, 13, 14, 15.

Les résultats représentent les activités β -galactosidase (en Unités Miller) moyennes de la fusion *pyc-lacZ* de 3 essais distincts réalisés en triplicata.

Chez le mutant RcPdhR (fig.14 B), nous avons eu du mal à relancer la culture de notre souche de référence RcSAB1 (1,043kb) après sa congélation à -70° C. Ce qui pourrait expliquer les faibles valeurs d'activité β galactosidase obtenues avec RcSAB1. En effet, le vecteur de fusion PHU235 que nous avons utilisé est un plasmide à bas nombre de copie, l'activité β -galactosidase de nos fusions étant directement liée au nombre de copies du vecteur dans la bactérie, nous pouvons penser que le faible taux de croissance obtenu avec cette souche est en partie à l'origine des faibles valeurs obtenues. Nous avons cependant tenu compte de la forme en cloche de la variation de l'ensemble des activités β galactosidase en présence du fumarate. En effet, cette allure générale est conforme à celle obtenu chez le sauvage (fig.11A), l'activité du promoteur *pyc* en présence du fumarate augmente de 60 % après la délétion de la région située entre -773 et -630 ensuite, cette activité décroît de 34 % chez RcSAB13 avant de s'annuler chez RcSAB15. On peut ainsi conclure que la région comprise entre -773 et -630 est réellement impliquée dans l'inhibition de la transcription du gène *pyc* par le fumarate. Une deuxième région comprise entre -630 et -330 semble contenir un site de fixation pour un régulateur positif, indépendant de RcPdhR, impliqué dans l'activation de la transcription du gène *pyc* par le fumarate. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la délétion de cette dernière région diminue l'effet activateur du fumarate chez le mutant RcPdhR sans affecter l'effet du lactate.

Enfin nous avons essayé de localiser la région impliquée dans la régulation de la transcription du gène *pyc* par l'oxygène chez *R. capsulatus*. Pour cela, nous avons fait des cultures des souches RcAB1, 11, 13, 14 et 15 dans le milieu RCV-lactate en présence ou non d'oxygène. Les activités β galactosidase obtenues (fig.15) confirment la tendance générale observée chez les mêmes souches cultivées en anaérobiose sur le lactate (fig.14 A). En effet, une fois de plus, on voit qu'en absence d'oxygène, l'expression de la fusion *pyc-lacZ* chute de 46% après la délétion de la région située entre -773

et -630. Toutefois, on peut noter que l'effet activateur de l'oxygène, sur la transcription de *pyc*, disparaît chez RcAB13 dont le niveau d'expression de la fusion demeure identique en présence ou non d'oxygène. Il est important de signaler à ce niveau de notre étude que cette abolition de l'activation de la transcription de *pyc* est identique à celle observée chez le mutant RcPdhR (fig.13 B). Toutes ces données prises en compte, nous permettent de conclure que la région comprise entre -630 et -330 est nécessaire à l'activation de la transcription de *pyc* par l'oxygène chez *R. capsulatus*. Et le fait que la délétion de cette région et la mutation RcPdhR aient des effets identiques, nous indique que cette région contient un site de fixation pour un deuxième régulateur dont la synthèse implique la présence de RcPdhR.

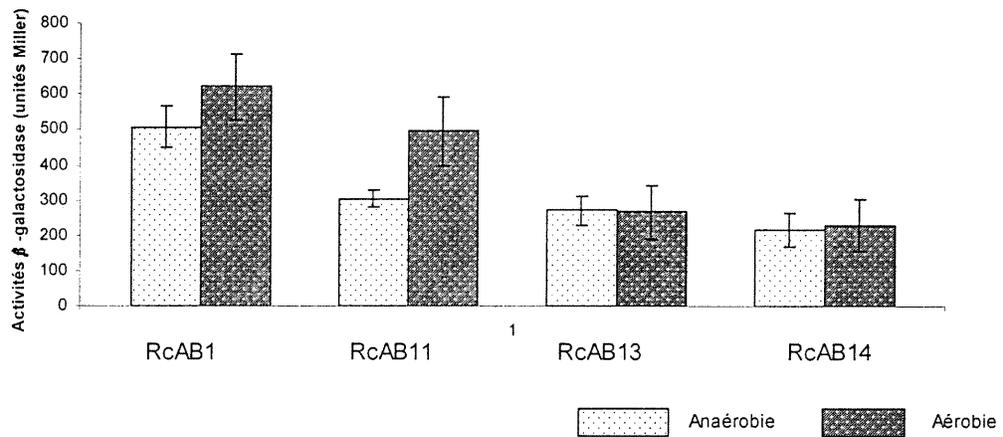


Figure 15. Activités β galactosidase des fusions construites avec les produits de délétions du fragment de 1,043kb *EcoRI*- *HindIII*

Les souches de *R. capsulatus* sauvages, contenant les différentes fusions *pyc-lacZ*, ont été cultivées dans le milieu minimum RCV-lactate (30mM) en aérobie ou en anaérobie. Les cultures en présence ou non d'oxygène ont été faites comme décrit dans matériels et méthodes.

Les résultats représentent les activités β -galactosidase (en Unités Miller) moyennes de la fusion *pyc-lacZ* de 3 essais distincts réalisés en triplicata.

3.2 SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE RcPdhR

3.2.1 Construction du plasmide pAKOB21

Le gène *RcpdhR*, contenu dans le fragment de 1,6 kb *EcoRI*-*SacI* du plasmide pAY34, a été cloné dans le vecteur de surexpression pTrec99A pour créer le plasmide pAKOB2. Mais il nous a été difficile de surexprimer la protéine RcPdhR à partir de cette construction. Soupçonnant la séquence inversement répétée située en amont du gène *RcpdhR* (fig.16) à l'origine de notre difficulté, nous avons délété une région de 70 nucléotides contenant cette séquence par PCR inverse (voir matériels et méthodes).

Nous avons deux façons de vérifier la suppression de cette région, d'abord en réalisant la digestion du nouveau plasmide pAKOB21, par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BglIII*. En effet, le site de restriction *BglIII*, absent sur pAKOB2, a été rajouté aux amorces utilisées pour la PCR inverse seul le plasmide pAKOB21 peut générer un fragment de restriction *EcoRI*-*BglIII*. La deuxième méthode a consisté à comparer la taille du fragment *EcoRI*-*NcoI*, renfermant la séquence inversement répétée, des plasmides pAKOB2 et pAKOB21 (fig.17). Ainsi qu'on peut le voir, après la PCR inverse, le fragment *EcoRI*-*NcoI* provenant de pAKOB21 est plus léger (467 pb) que le fragment *EcoRI*-*NcoI* (de 537 pb) du départ. Nous avons donc considéré que le plasmide pAKOB21 était dépourvu de la séquence inversement répétée située en amont du gène *RcpdhR* de *R. capsulatus*.

```

                                     -35          -10          S.D.
1  GAATTCATGATCCGTCGGAAACCCGTAAGCAGCGCCCGCCGACAAACAGCGCGGGCTTGGCGCCCGCCGCTGCCA TTTCCCATTGCCCGTCTTCCCAATGGTGATAGTTTCTGACCACGGGAG 120
121 AGAGAAATGCCATTCGAGAAGATCGAATCCGAGAAACTTGGCTCGGCCCTCGTGGGTGAGATCGAAATCTGATCGTCGAGGGCGTGGTCCGCCCGCGGAAACGGTCCCGTCCGAAACGC 240
      H P F Q K I E S E K L A S A V V R Q I E N L I V E G V L R P G E R L P S E R
241 GAATTGTCGAAACGGCTTCCGGTGTCCGGCCCTCGGTGCGCGAGGGCGGTGGCGGAATTGCAGCAGGAAGGCCTGCTGACCCACCGCGCCGGATCGGGGATCTTCGTCGCCGAAGTGCTG 360
      E L S E R L A V S R P S L R E A V A E L Q Q E G L L T T R A G S G I F V A E V L
361 GGCTCGGCSTTTTCCGCCCGCTGATCCGGCTTTTCCGCCCAACGATCAGGCGGTCTTCGACTATCTCGCCTTCCGGCCGATCTGGAGGGGATGGCGCGGAACCGCCGCCAAGATG 480
      G S A F S P A L I R L F A R N D Q A V F D Y L A F R R D L E G M A A E R A A K H
481 GGCTCGGACACCGATCTGAAGGTGATCGACCGGATCCTGACCGCGATGGAAACGGCCCATGGCAAGCGCAACCCCGCGACGAGGGCGCGCTGGATGGCGCAATTCACATGGCGATCGTC 600
      G S D T D L K V I D A I L T R M E T A H G K R N P A D E A A L D A Q F H M A I V
601 GAGGCGAGCCACAACATCATCGCTGCACATGATCGCGCGGATGTTGACCGCTTTTGTGGGAAGGGTGTCTTACAACCGCCAGATCATGTCCGCAACCGCTCCACCCCGGAGCGCGTG 720
      E A S H N I I M L H M H R A M F D L L S E G V F Y N R Q I M F R N R S T R E A L
721 CTGGAGCAGCACCGGGCGATCAACCGCGGATTCAGGCGCGCGACGGSTTTGCGCGCGCGGGCGCGGGTGGCGCGGCATATGGATTTCTCGCAAGTGGCGCTGACCGAGTGGCGCAAGGCC 840
      L E Q H R A I N A A I Q A R D G F A A R A A V A A H M D F V E V A L T E L R K A
841 GAACGCCACGAGGGCTGGCCCGGCTCGCGCTGCAACATCAAAGCGCGAAACCGCCGTAACCGCGCGCGCTCAGCCCCCGCGCGCGCGCGAGGGCGCGGATCGCGCAGCATTTCGCCA 960
      E R H E A L A R L R L Q K Q S A K A P *

```

Figure 16. Séquence du gène *RcpdhR* de *R. capsulatus* tiré de (98). La séquence inversement répétée est soulignée par des flèches en pointillé.

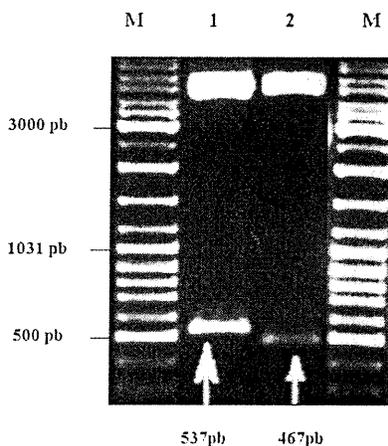


Figure 17. Délétion de la séquence inversement répétée en amont du gène *RcpdhR*.

Environ 200ng d'ADN des plasmides pAKOB2 et pAKOB21 ont été digérés par *EcoRI* et *NcoI*, dans un volume final de 20 μ l, avant d'être soumis à l'électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. M correspond au marqueur (# SMO333S) de poids moléculaire de la compagnie Fermentas dont la taille de quelques fragments est indiquée à gauche. Le puit 1 correspond au produit de digestion de pAKOB2 et 2 à celui de pAKOB21. La taille des fragments *EcoRI-NcoI* est indiquée en bas.

3.2.2 Surexpression et purification de RcPdhR

Nous avons entrepris d'induire la surexpression de RcPdhR, par l'IPTG (1mM) et le lactose (1%), chez les souches DH5 α et BL21 d'*E. coli* transformées par pAKOB21. Seules les souches portant le plasmide pAKOB21 sont capables de surexprimer une protéine dont le poids moléculaire se situe vers 30kDa, après l'induction par l'IPTG ou le lactose (fig.18). Alors que les souches AKOB2 et notre témoin négatif, la souche BL21 contenant le vecteur pTrc99A, sont incapables de surproduire cette protéine après l'induction par l'IPTG. Le poids moléculaire de RcPdhR déduit de sa séquence d'acides aminés étant de 28,684 kDa, nous avons conclu que la protéine surexprimée de 30kDa correspond à la RcPdhR. Avec cette expérience nous avons mis en évidence le fait que la séquence inversement répétée, située en amont du gène *RcpdhR*, constitue un obstacle pour l'expression de ce gène. Nous pensons que ces deux séquences qui ont une forte probabilité de s'apparier à cause de leur complémentarité. Ainsi elles formeraient une boucle qui bloquerait la RNA polymérase et arrêterait la transcription du gène *RcpdhR* à partir du promoteur pTrc du vecteur pTrc99A. Ces deux séquences doivent jouer un rôle dans la régulation naturelle de la synthèse de RcPdhR chez *R. capsulatus*.

La chromatographie sur une colonne d'héparine-sépharose, suivant un gradient linéaire d'ammonium sulfate, nous a permis de purifier la protéine RcPdhR (fig.19). C'est à partir d'une concentration d'ammonium sulfate de 0,4 M, que RcPdhR se détache de la matrice de la colonne de chromatographie. Les fractions d'élution riches, puits 9 et 10 de la figure 19, en RcPdhR ont été concentrées par ultrafiltration, nous avons pu, de cette manière, avoir 5mg de protéine dans une solution de 27,5 μ moles / l. Il est intéressant de noter qu'à ce stade, RcPdhR avait une tendance à s'agréger, le même phénomène a été observé lors de la purification de la PdhR chez *E. coli* (90).

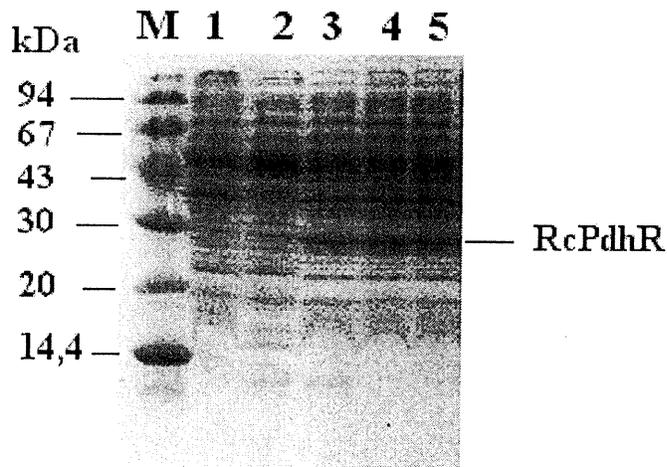


Figure 18. Surexpression de RcPdhR.

Les extraits cellulaires (30 μ l) des souches induites à l'IPTG (1mM) ou au lactose (1%), ont été soumis à l'électrophorèse sur 1% Gel de polyacrylamide SDS 15%. Les puits **1-3**, contiennent les extraits cellulaires de la souche BL21 portant le vecteur pTrc99A (**1**), pAKOB2 (**2**) et pAKOB21 (**3**) induite par l'IPTG. Le puit **4**, correspond à la souche DH5 α portant pAKOB21 induite par l'IPTG. Le puit **5** contient les extraits de BL21 refermant pAKOB21 induite par le lactose. **M** représente les protéines standards utilisées comme marqueur de poids moléculaire, de haut en bas on a : la phosphorylase (94kDa), le sérum albumine bovin (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'anhydrase carbonique(30 kDa), l'inhibiteur de la trypsine des grains de soja (20 kDa) et l' α lactalbumine (14,4 kDa) les tailles des différentes protéines sont indiquées à gauche. La position de RcPdhR est indiquée à droite. Le gel a été coloré au bleu de coomassie

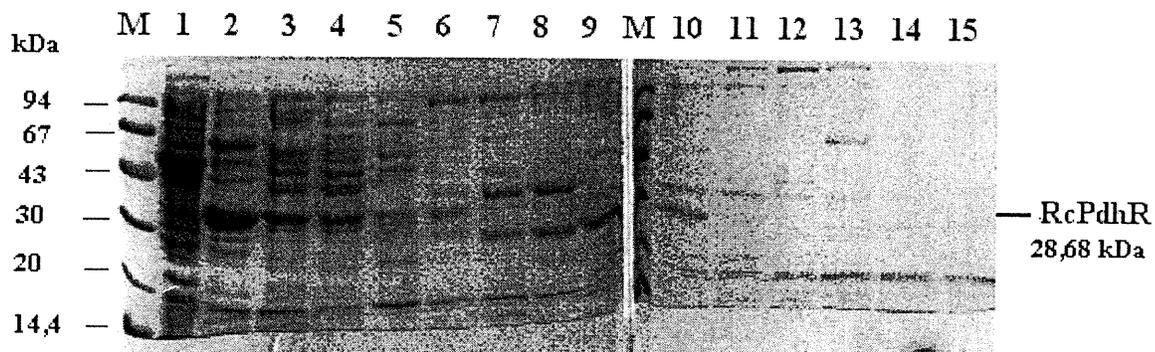


Figure 19. Purification de RcPdhR.

La purification a été effectuée à partir des extraits cellulaires de la souche AKOB21, induite à l'IPTG dans 1 litre de milieu LB. Après l'électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 12,5%, le gel a été révélé au bleu de coomassie. **M** représente le marqueur de poids moléculaires dont les protéines standards sont citées dans la figure précédente. Le puit **1**, contient les extraits cellulaires de AKOB21 avant la chromatographie sur colonne d'héparine sépharose. Et les puits allant de **2** à **15** contiennent les fractions, successives, obtenues après la chromatographie sur colonne héparine sépharose, suivant un gradient d'ammonium sulfate de 0 à 0,6M.

3.2.3 Étude de la capacité de RcPdhR purifiée de se fixer sur l'ADN

La structure primaire de RcPdhR révèle la présence d'une structure de type hélice-tour-hélice spécifique aux protéines qui se lie à l'ADN. Nous avons décidé de tester la capacité de la protéine purifiée de se fixer sur l'ADN. En tenant compte du fait que son homologue chez *E. coli*, PdhR, se fixe sur le promoteur *pdh* et sur son propre promoteur (92), nous avons choisi de faire l'expérience de retard de migration sur gel avec le fragment *Bam*HI-*Pst*I du plasmide pMAS. Ce fragment de 0,961 kb renferme le promoteur du gène *pdh* de *R. capsulatus*, si la protéine purifiée est l'homologue de la PdhR d'*E. coli* elle doit se fixer sur ce fragment.

Nos résultats préliminaires montrent que, la protéine RcPdhR purifiée retarde la migration du fragment de 0,967 kb *Bam*HI-*Pst*I qui, contient le promoteur du gène *pdh* de *R. capsulatus* (fig.20). L'addition des quantités croissantes d'ADN compétiteur, l'ADN de sperme de saumon, réduit l'affinité du fragment pour RcPdhR sans l'annuler. Nous avons ainsi pu montrer que la protéine purifiée est capable de se lier à l'ADN de façon spécifique car, son aptitude de se lier au promoteur *pdh* se maintient même en présence de 330ng d'ADN compétiteur. Cette étude nous a aussi permis de dire que, la protéine surexprimée et purifiée pourrait être un régulateur transcriptionnel de la synthèse du complexe PDH chez *R. capsulatus*, à ce titre elle mérite d'être nommée RcPdhR.

La grande difficulté rencontrée dans cette expérience était la taille importante des fragments d'ADN utilisés. En effet travaillant avec des fragments d'ADN de taille supérieure à 500 pb, il nous était difficile de faire sortir les complexes ADN-protéine des puits d'un gel de polyacrylamide 4% non dénaturant. La seule alternative qui nous restait, était de travailler avec les gels d'agarose 0.8% (109 et 110), avec lesquels la discrimination entre les complexes ADN-protéine et les fragments d'ADN libres était plus faible que sur un gel de polyacrylamide.

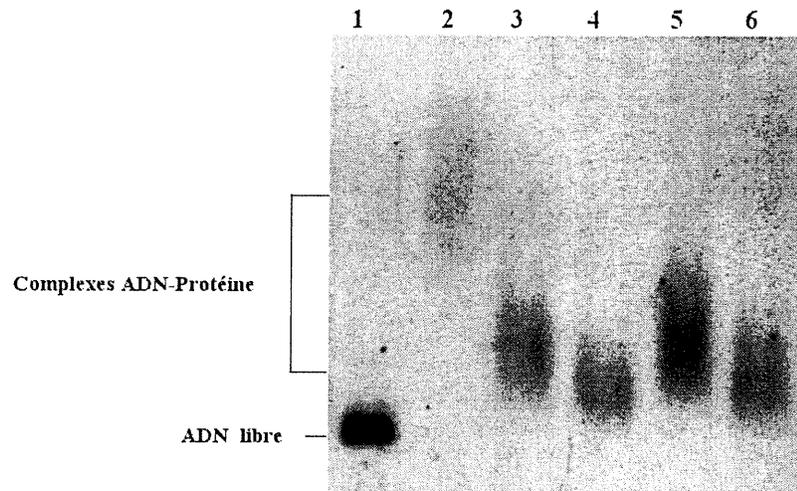


Figure 20. Étude de la liaison de RcPdhR au promoteur du gène *pdh* de *R. capsulatus*.

Le fragment de 0,961kb *Bam*HI-*Pst*II de pMAS, qui contient le promoteur *pdh*, marqué à la DIG est incubé à 30⁰ C pendant 30 minutes sans protéines (1), avec 2,5 μ M de RcPdhR et les quantités croissantes d'ADN de sperme de saumon : 0ng (2), 110ng (3), 220ng (4), 275ng (5) et 330ng (6). L'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose 0,8%, dans du TBE 0,5X, à 4⁰ C pendant 4 heures.

3.2.4 Effets du pyruvate et des intermédiaires du cycle des TCA sur la liaison de RcPdhR sur le promoteur *pdh*

À cette étape de notre investigation, nous avons cherché à savoir si la liaison de RcPdhR au promoteur *pdh* était affectée par la présence du lactate, du pyruvate et des intermédiaires du cycle des TCA. Pour ce faire, nous avons repris l'expérience précédente en présence de ces effecteurs potentiels et de 110ng d'ADN compétiteur.

Le pyruvate (1mM) n'a aucun effet sur la fixation de RcPdhR (2,5 μ M) au promoteur *pdh* (fig.21), alors qu'à la même concentration, le citrate, le fumarate et l' α -ketoglutarate semblent diminuer son affinité pour le promoteur *pdh*. Ce nouveau résultat est intéressant car il semble indiquer que, bien qu'elle soit homologue à la protéine PdhR d'*E. coli*, RcPdhR n'a pas la même fonction biologique que son homologue. En effet chez *E. coli*, PdhR réprime la transcription du gène *pdh* en présence des intermédiaires du cycle des TCA et le pyruvate l'empêche de se lier au promoteur *pdh* (93). Ceci semble être différent chez *R. capsulatus* où, RcPdhR semble être un activateur de la synthèse du complexe PDH dont la liaison au promoteur *pdh* est gênée par les intermédiaires due cycle des TCA. Nous pensons que cette différence est due à la présence de la répression catabolite inverse chez *R. capsulatus*.

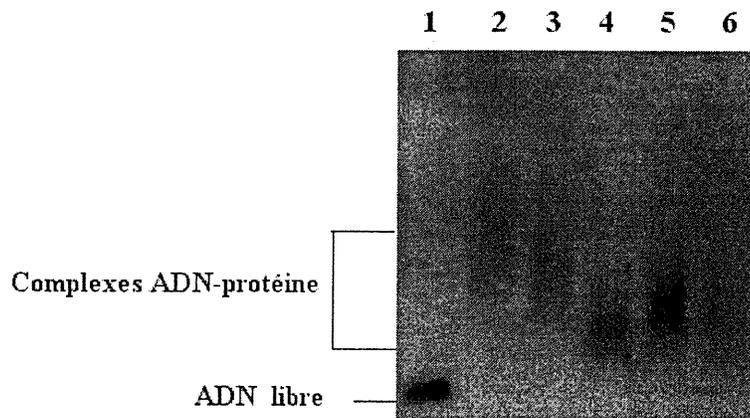


Figure 21. Effet du pyruvate et des intermédiaires du cycle des TCA sur la liaison de RcPdhR au promoteur *pdh*

Le fragment de 0,961kb *Bam*HI-*Pst*I de pMAS, qui contient le promoteur *pdh*, marqué à la DIG est incubé à 30⁰ C pendant 30 minutes sans protéines (1), avec 2,5 μ M de RcPdhR et : 0 coeffecteur (2), pyruvate 1mM (3), fumarate 1mM (4), citrate 1mM (5), α ketoglutarate 1mM (6) L'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose 0,8%, dans du TBE 0,5X, à 4⁰ C pendant 4 heures.

3.2.5 Effets du lactate et du fumarate sur la liaison de RcPdhR au promoteur *pyc*

Après avoir montré que la protéine purifiée était capable de se fixer au promoteur *pdh* chez *R. capsulatus*, nous avons voulu savoir si RcPdhR pouvait se fixer dans la région du promoteur *pyc*. Nous avons travaillé avec le fragment *EcoRI-HindIII* (1,0434kb) du plasmide pAMO10.

Nos résultats préliminaires indiquent que c'est à une concentration de 5 μ M (au lieu de 2,5 μ M comme dans le cas de *pdh*) que RcPdhR se lie au promoteur *pyc* (fig.22). Contrairement à ce qu'on a observé pour le promoteur *pdh*, le fumarate (1mM) semble augmenter l'affinité de RcPdhR pour le promoteur *pyc* alors que le pyruvate (1mM) semble réduire cette affinité.

Pour augmenter la discrimination entre les complexes ADN-protéines et l'ADN libre, nous avons décidé d'augmenter le temps de migration sur le gel d'agarose 0,8% de 3 heures (fig.23). Le résultat obtenu confirme la tendance observée dans la figure 22. En effet si on compare les puits 1, 3, 6 et 7 (fig.23), on constate que la présence du pyruvate (1mM) affecte légèrement la liaison de RcPdhR au promoteur *pyc*, alors que le fumarate (1mM) augmente de façon significative la capacité de cette protéine de se lier au promoteur *pyc*. Ces nouveaux résultats nous ont amené à conclure que l'affinité de RcPdhR pour le promoteur *pdh* est plus grande que son affinité pour le promoteur *pyc*, et que c'est en interagissant directement sur la région du promoteur de *pyc* en présence du fumarate, que RcPdhR pourrait réprimer la transcription du gène *pyc* de *R. capsulatus*.

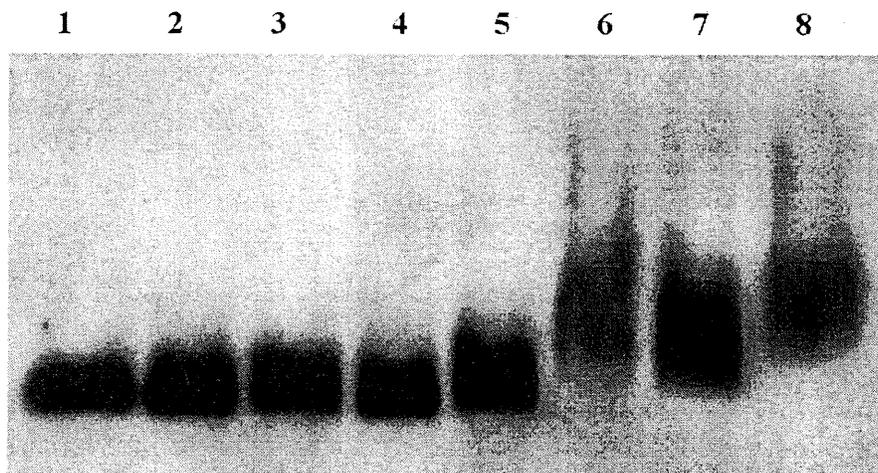


Figure 22. Mis en évidence de l'interaction de RcPdhR avec le promoteur *pyc* et l'effet du pyruvate et du fumarate sur cette interaction

Le fragment de 1,043kb *EcoRI*-*HindIII* de pAMO10, qui contient le début du gène *pyc* ainsi que la région de son promoteur, marqué à la DIG est incubé à 30⁰C pendant 30 minutes sans protéines (1), avec 0,02μM de RcPdhR (2), 0,5μM de RcPdhR (3), 1μM de RcPdhR (4), 2,5μM de RcPdhR (5), 5μM de RcPdhR (6), 5μM de RcPdhR et 1mM de pyruvate (7), 5μM de RcPdhR et 1mM de fumarate (8) L'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose 0,8%, dans du TBE 0,5X, à 4⁰ C pendant 4 heures.

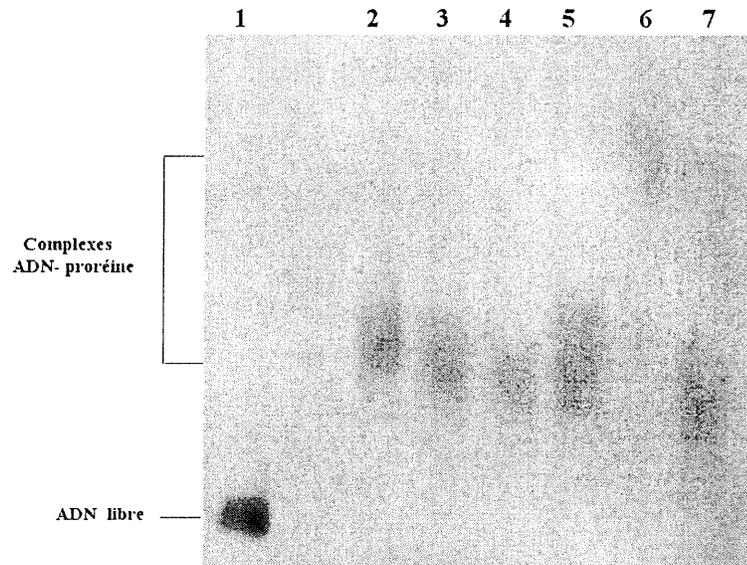


Figure 23. Effet du pyruvate et du fumarate sur la liaison de RcPdhR au promoteur *pyc*

Le fragment de 1,043kb *EcoRI-HindIII* de pAMO10, qui contient le début du gène *pyc* ainsi que la région de son promoteur, marqué à la DIG est incubé à 30⁰ C pendant 30 minutes sans protéines (1), avec 5 μ M de RcPdhR et 1mM de pyruvate (2), 5 μ M de RcPdhR et 5Mm de pyruvate (3), 5 μ M de RcPdhR et 10Mm de pyruvate (4), 5 μ M de RcPdhR (5), 5 μ M de RcPdhR 1Mm de fumarate (6), 5 μ M de RcPdhR 5Mm de fumarate (7) L'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose 0,8%, dans du TBE 0,5X, à 4⁰ C pendant 6 heures.

CHAPITRE IV
DISCUSSION

La synthèse de la pyruvate carboxylase, chez *R. capsulatus*, est régulée au niveau transcriptionnel par les conditions de culture. En effet nous avons pu montrer dans cette étude (fig.11A) que l'activité du promoteur *pyc* est activée par le pyruvate et le lactate, et inhibée par le glutamate et le fumarate en particulier et les intermédiaires du cycle des TCA en général. Par ailleurs, il ne fait aucun doute que l'oxygène active la transcription de *pyc*. Ces résultats viennent renforcer les conclusions d'une étude précédente qui a mis en évidence, par immunoblot, la régulation de la synthèse de la PC par l'oxygène et la balance entre les niveaux intracellulaires de pyruvate et des C-4 dicarboxylates (le rapport pyruvate / C-4 dicarboxylates) (90). La régulation par le rapport pyruvate / C-4 dicarboxylates doit être attribuée au métabolisme versatile de *R. capsulatus*. Ainsi en présence d'une source de carbone métabolisée via le pyruvate, il y a une augmentation du pool intracellulaire de pyruvate qui va induire la synthèse de la PC pour convertir une partie de pyruvate en oxaloacétate. De la même manière, quand *R. capsulatus* utilise les intermédiaires du cycle des TCA, certains acides aminés, le butyrate, le propionate et l'acétate, des sources de carbone assimilées sans la formation du pyruvate, il y a une accumulation d'intermédiaires du TCA qui va provoquer la répression de synthèse de la PC. Nous pensons que la synthèse de la PC est réprimée, dans ce dernier cas, parce que sa fonction anaplérotique n'est pas nécessaire.

La présence d'une mutation dans le gène *RcpdhR*, qui code pour une protéine appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels GntR, lève l'inhibition de la transcription de *pyc* par les C-4 dicarboxylates et, supprime l'activation de la synthèse de la PC par l'oxygène (fig.11B). Il nous apparaît, au vu de ces résultats, que la protéine RcpdhR de *R. capsulatus* régule de façon négative la synthèse de la PC en présence des intermédiaires du cycle des TCA. D'autre part, RcpdhR semble être impliquée dans la régulation de cette synthèse par l'oxygène par un mécanisme inconnu.

Nous avons pu localiser deux régions qui régulent en *cis* la synthèse de la PC, dans la région du promoteur du gène *pyc* de *R. capsulatus*, en introduisant les délétions unidirectionnelles dans cette région (fig.12 et fig.13).

La première région située entre -773 et -630, par rapport au début du gène *pyc*, est impliquée dans la régulation de la transcription du gène *pyc* par le rapport pyruvate / C-4 dicarboxylates (fig.14A). Sachant que le régulateur sollicité dans cette régulation est RcPdhR, nous pensons que cette région renferme le site de fixation de RcPdhR. L'analyse de cette région nous a permis de localiser deux sites potentiels pour cette fixation. Le premier, le plus intéressant, est composé de deux séquences symétriques (CTGGACG-N₂₀-CGTTCAG) situées entre -687 et -654, la deuxième constituée d'une séquence répétée (GCCGAT-N₁₃-GCCGAT) située entre -729 et -705. Fait intéressant, ces deux séquences sont différentes du site de fixation de PdhR sur le promoteur *pdh* chez *E. coli* (AATTGGT aag ACCAATT) (93), ce qui nous amène à penser que, bien qu'elles soient homologues, ces deux régulateurs n'ont pas la même fonction biologique.

La seconde région située entre -630 et -330, semble intervenir à la fois dans la régulation de la synthèse de la PC par l'oxygène et, dans la régulation par le rapport pyruvate / C-4 dicarboxylates (fig.14B et fig.15). L'implication de cette région dans la régulation de la transcription de *pyc* par la balance entre les pools intracellulaires de pyruvate et C-4 dicarboxylates nous permet de suggérer que le site de fixation de RcPdhR se situe entre -687 et -654. En effet ce site chevauche les deux régions que nous avons identifiées. Il serait intéressant, d'introduire les mutations par la technique de mutagenèse dirigée dans le site potentiel pour la liaison de RcPdhR ou, de déléter ce site, et de voir si ces mutations affectent l'expression de la fusion *pyc-lacZ*.

D'un autre côté, nous avons pu établir que cette région (située entre -630 et -330) qui couvre 300pb comprend aussi le site de fixation d'un deuxième régulateur, que nous avons appelée OxR, impliqué dans

l'activation de la synthèse de la PC en aérobiose (fig.15). Une autre étude complémentaire visant à identifier ce régulateur est indiquée. En effet on pourrait introduire la fusion *pyc-lacZ* dans les souches de *R. capsulatus* mutées dans les gènes qui codent pour les protéines qui régulent la transcription des gènes par l'oxygène. Plusieurs régulateurs répondant à la présence d'oxygène ont été identifiés chez les bactéries. Parmi eux on trouve, FNR le régulateur transcriptionnel des gènes impliqués dans la respiration anaérobie et le métabolisme du pyruvate (111); le système de régulation à deux composantes RegB-RegA qui régule le métabolisme du carbone (112) et le système à deux composantes ArcB / ArcA qui régule le métabolisme aérobie (113).

Par ailleurs, nous avons pu situer le promoteur *pyc* dans la région comprise entre -230 et -30. Mais des délétions supplémentaires, restent à introduire dans cette région afin d'identifier la position exacte du promoteur *pyc*.

Dans la dernière partie de cette étude, nous avons pu surexprimer la protéine RcPdhR dans deux souches d'*E. coli* (fig.18). Nos résultats préliminaires montrent qu'une fois purifiée (fig.19), cette protéine a la capacité d'interagir de façon directe et spécifique avec les promoteurs *pdh* et *pyc* de *R. capsulatus*.

La liaison de la RcPdhR au fragment, de 0,961kb *Bam*HI-*Pst*I du plasmide pMAS, qui renferme le promoteur du gène *pdh* de *R. capsulatus* semble être renforcée, en présence du pyruvate et, affaiblie en présence des intermédiaires du cycle des TCA (fig.20). Il a été montré que la liaison de PdhR, son homologue chez *E. coli*, sur l'opérateur *pdh* réprime la transcription de ce gène en présence des C-4 dicarboxylates (93). Nous pouvons émettre l'hypothèse que, contrairement à son homologue, RcPdhR est un activateur de la synthèse du complexe PDH, en présence du pyruvate, chez *R. capsulatus*. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en étudiant l'expression d'une fusion traductionnelle *pdh-lacZ* dans la souche sauvage

SB1003 et dans la souche RcAY67 (mutée dans *RcpdhR*) de *R. capsulatus* en présence du pyruvate ou les C-4 dicarboxylates.

Nous avons eu des indications supplémentaires en étudiant l'interaction de RcPdhR sur la région située en amont du gène *pyc* de *R. capsulatus*. En effet, les résultats préliminaires que nous avons obtenus (fig.22 et fig.23) nous montrent que RcPdhR interagit directement avec la région promotrice de *pyc*. L'affinité de la RcPdhR est deux fois plus grande pour la région promotrice de *pdh* que celle de *pyc*, si on tient compte du fait que ce n'est qu'à partir de 5 μ M que RcPdhR se fixe au promoteur *pyc* (fig.22) alors qu'à 2,5 μ M elle se lie au promoteur *pdh* (fig.20 et 21). Enfin, conformément aux résultats obtenus avec les activités β galactosidase, le fumarate semble être un coeffecteur pour la liaison de RcPdhR à la région promotrice de *pyc*.

En tenant compte de l'ensemble des résultats collectés dans cette étude, nous pensons avoir établi le mécanisme moléculaire de la régulation de la synthèse de la PC par les conditions de culture chez de *R. capsulatus*. Nous pensons que la présence du fumarate et des autres C-4 dicarboxylates, augmente l'affinité de RcPdhR pour la région promotrice de *pyc*. En se liant à son site de fixation, RcPdhR empêche la fixation de la RNA polymérase, ce qui se traduit par la répression de la transcription de *pyc*. Par contre, il semble que la liaison de RcPdhR observée en présence du pyruvate n'est pas assez forte ou stable pour empêcher la transcription de *pyc*. Une expérience de footprinting réalisée avec les fragments portant les promoteurs *pyc* et *pdh*, la protéine RcPdhR, en présence de fumarate ou du pyruvate nous permettrait d'identifier le site de fixation de ce régulateur sur ces fragments et de les comparer pour voir s'ils sont identiques. De la même manière, il serait intéressant de faire l'expérience de retard de migration sur gel avec les fragments de la région promotrice délétés, pour confirmer les résultats obtenus en suivant l'expression des fusions *pyc-lacZ* construites avec ces fragments.

D'une façon générale, nous proposons un modèle (fig. 24) pour la régulation transcriptionnelle de la synthèse de la PC chez *R. capsulatus*.

En présence du pyruvate ou des sources de carbone métabolisées via le pyruvate et en anaérobiose (fig.24A) *R. capsulatus* a besoin du complexe PDH pour alimenter le cycle des TCA en acétyle CoA. De cette manière la cellule assure le maintien du cycle des TCA pour lui fournir de l'énergie sous forme de pouvoirs réducteurs (NADH, FADH et NADPH). Dans de telles conditions de culture, elle aurait besoin de la fonction anaplérotique de la PC pour assurer la poursuite du cycle des TCA. C'est ce qui pourrait expliquer, la fixation de RcPdhR sur la région promotrice de *pdh* en présence du pyruvate, donc l'induction de la synthèse de PDH et, le peu d'effet que le pyruvate a sur l'affinité de RcPdhR pour le promoteur *pyc*. En parallèle RcPdhR active la synthèse de OxR, par un mécanisme inconnu, et à son tour OxR active la synthèse de la PC en aérobiose. On peut penser que pendant le métabolisme aérobie, il y a plus de biosynthèse et donc plus de prélèvement des intermédiaires du TCA et la cellule a besoin d'une forte activité pyruvate carboxylase.

Alors que quand *R. capsulatus* utilise des intermédiaires du TCA, comme le glutamate ou le fumarate (fig.24B), comme source de carbone en anaérobiose elle n'a plus besoin d'induire la synthèse du complexe PDH, et de la PC, toutes les deux utilisant le pyruvate comme substrat. RcPdhR inactive la synthèse de la PC en interagissant avec la région promotrice de *pyc* et cette interaction n'affecte pas la liaison d'OxR à son site de fixation inconnu en présence de l'oxygène. On peut suggérer qu'en anaérobiose et en présence des intermédiaires du cycle des TCA, *R. capsulatus* utilise d'autres voies métaboliques pour maintenir le fonctionnement du cycle des TCA.

La protéine RcPdhR que nous avons purifiée apparaît donc à la fois comme un régulateur positif, pour la synthèse du complexe PDH et d'OxR, et un régulateur négatif pour la synthèse de la pyruvate carboxylase. Ce qui n'est pas nouveau car le complexe CAP-AMPC, qui contrôle l'expression

des gènes et des opérons soumis à la répression catabolite chez de nombreuses bactéries, régule de façon positive la transcription de l'opéron lactose alors qu'il réprime la transcription de gène *crp* qui code pour la protéine CAP chez *E. coli* (114, 115).

Cette étude nous apporte de meilleures connaissances pour comprendre les mécanismes de la répression catabolite inverse. En effet il est intéressant de voir que *R. capsulatus* utilise les gènes existant chez d'autres organismes, comme *pdh*, *RcpdhR*. Mais chez elle les produits de ces gènes ont une sensibilité et une affinité inverse pour les métabolites, ce qui se manifeste par un effet métabolique inverse. De façon générale on peut dire que la bactérie n'a pas besoin de créer et d'utiliser les nouveaux gènes pour répondre à la répression catabolite inverse, elle change simplement l'affinité des régulateurs existants pour les métabolites. Il serait intéressant de travailler avec les régulateurs impliqués dans le métabolisme du carbone chez d'autres bactéries, comme Cra (13) et CsrA (14, 15), pour développer un modèle général sur la répression catabolite inverse. Un modèle dans lequel les bactéries qui exercent la répression catabolite inverse changent simplement l'affinité des régulateurs connus pour les métabolites. Cependant des études supplémentaires restent à entreprendre sur les autres systèmes anaérobies, chez *R. capsulatus*, tels que le cycle du glyoxalate et la voie du propionyle CoA, pour valider ce modèle.

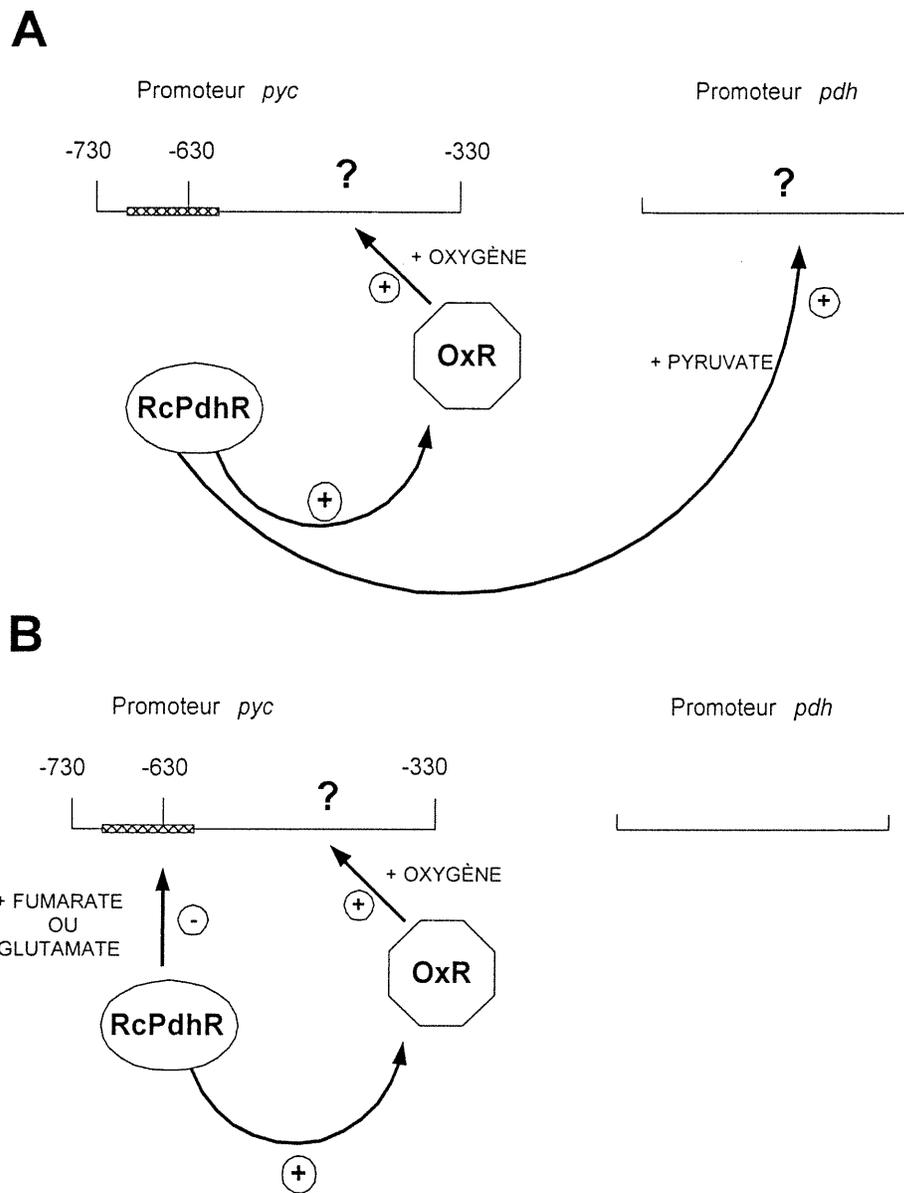


Figure 24. Schéma récapitulatif de la régulation de la synthèse du mode d'action de RcPdhR sur la synthèse de la PC et du complexe PDH chez *R. capsulatus*.

A, en présence du pyruvate et les sources de carbone métabolisées via le pyruvate. **B**, en présence des intermédiaires du cycle des TCA.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Amit Mukherjee et Sudhamoy Ghosh.** 1987. Regulation of fructose uptake and catabolism by succinate in *Azospirillum brasiliense*. J. of Bacteriol. **169** : 4361-4367
2. **Monod, J.** 1947. The phenomenon of enzymatic adaptation and its bearing on problems of genetics and cellular differentiation. Growth Symp. **11** : 223-289
3. **Lee, I. H., Frederickson, A.G. et Tsuchiya.H.M.** 1974. Diauxic growth of *Propionibacterium shermanii*. Appl. Microbiol. **28** : 831-835
4. **Bajpai, R. K. et Ghose T. K.** 1978. An induction-repression model for growth of yeasts on glucose-cellobiose mixtures. Biotechnol. Bioeng. **20** : 927-935
5. **Saier, M. H. Jr.** 1979. The role of the cell surface in regulating the internal environment. Academic Press, New York. **7** : 167-227.
6. **Rall, T. W. et Sutherland, E. W.** 1981. The regulatory role of adenosine-3'. 5' phosphate. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. **26** : 347-354
7. **Sutherland, E. W. et Rall, T. W.** 1960. The relation of adenosine-3'. 5' phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Revs. **12** :265-299
8. **Makman, R. S. et Sutherland, E. W.** 1965. Adenosine 3', 5'-phosphate in *Escherichia coli*. J. of Biological Chemistry. **240** : 1309-1314

9. **Pastan, I. et Adhya, S.** 1976. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* **40** : 527-551
- 10 **Chin, A. M., Feldheim, D. A. et Saier, M. H. Jr.** 1989. Altered transcriptional patterns affecting several metabolic pathways in strains of *Salmonella typhimurium* which overexpress the fructose regulon. *J. of Bacteriol.* **171** : 2424-2434
- 11.**Geerse, R. H. Van der Pluijm, J. et Postman, P. W.** 1989a. The repressor of PEP: fructose phosphotransferase system is required for the transcription of the *pps* genes of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **218** : 348-352
11. **Geerse, R. H., Izzo, F. et Postman, P. W.** 1989b. The PEP: fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium* : FPr combines enzyme III^{Fru} and pseudo-HPr activities. *Mol. Gen. Genet.* **216** : 517-525
13. **Ramseir, T. M.** 1996. Cra and the control of carbon flux via metabolic pathway. *Res. Microbiol.* **147** : 489-493
14. **Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y. et Brun-Zinkernagel, A. M.** 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. of Bacteriol.* **175** : 4744-4755
15. **Liu, M. Y., Yang. H. et Romeo, T.** 1995. The product of pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. of Bacteriol.* **177** : 2663-2672

16. **Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M.H.Jr. et Reizer J.** 1995. Novel proteins of phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant. *J. Biol. Chem.* **270** : 4822-4839
17. **Hartmann, A. et Boos, W.** 1993. Mutations in *phoB*, the positive gene activator of the *pho* regulon in *Escherichia coli*, affect the carbohydrate phenotype on MacConkey indicator plates. *Res. Microbiol.* **144** : 285-293
18. **Kredich, N. M.** 1992. The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6** : 2747-2753
19. **Tsolis, R. M., Bäumlér, A. J., Stojilkovic, I. et Heffron, F.** 1995. Fur regulon of *Salmonella typhimurium* : identification of new iron-regulated genes. *J. of Bacteriol.* **177** :4628-4637
20. **Neilands, J. B.** 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270** : 26723-26726
21. **Saier, M. H. Jr., Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J. et Ye, J. -J.** 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **20** : 267-271
22. **Martin, A.** 1996. Role of alternate sigma factors in starvation protein synthesis- novel mechanisms of catabolite repression. *Res. Microbio.* **147** : 494-505

23. **Krulwich, T. A. et Ensign, J.C.** 1969. Alteration of glucose metabolism of *Arthrobacter crystallopoietes* by compounds which induce sphere to rod morphogenesis. *J. Bacteriol.* **97** : 526-534
24. **Lessie, T. G. et Phibbs, P. V. Jr.** 1984. Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu. Rev. Microbiol.* **38** : 359-387
25. **Ucker, D. S. et Signer, E. R.** 1978. Catabolite-repression-like phenomenon in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **136** : 1197-1200
26. **Beatty, J. T. et Gest, H.** 1981. Biosynthetic and bioenergetic functions of citric acid cycle reactions in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* **148** : 584-593
27. **Prescott. Harley. Klein.** 1995. Chapitre 8 : Conversion de l'énergie. *Dans Microbiologie* p150
28. **Dunn, M.F.** 1998. Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiol. Rev.* **22** : 105-123
29. **Gest, H.** 1981. Evolution of Citric Acids Cycle and respiratory energy conversion in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Lett.* **12** : 209-215
30. **Hansford, R. G.** 1980. Control of mitochondrial substrate oxydation. *Curr. Top. Bioenerg.* **10** : 217-278
31. **John, E., Cronan, Jr. et Laporte, D.** 1996. Chapitre 16 : Tricarboxylic Acids Cycle and Glyoxalate bypass. *Dans : Escherichia coli and Salmonella*, ASM Press. **1** : 206-216

32. **Kornberg, H. L.** 1996. The role and control of glyoxalate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **99** : 1-11
33. **Wood, H. G. et Utter, M. F.** 1965. The role of CO₂ fixation in metabolism. *Essays in biochemistry* **1** : 1-27
34. **McAlister, L. E., Evans et Smith T.E.** 1981. Properties of a mutant *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase deficient in coregulation by intermediary metabolites. *J. Bacteriol.* **146** : 200-208
35. **Bridger, G.P. et Sundaram, T. K.** 1976. Occurrence of phosphoenolpyruvate carboxylase in the extremely thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **125** : 1211-1213
36. **Schobert, P. et Bowien, B.** 1984. Unusual C₃ and C₄ metabolism in the chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **159** : 167-172
37. **Prescott, Harley. Klein.** 1995. Chapitre 9 : L'utilisation de l'énergie dans la biosynthèse. *Dans Microbiologie* p 182
38. **Wallace, J. C.** Distribution and biological function of pyruvate carboxylase in nature. 1985. In Keech, D. B. AND Wallace, J.C.(ed.), pyruvate carboxylase. CRC Press, Boca Raton. P.5-63
39. **Wood, H.G. et Barden, R. F.** 1977. Biotin enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **46** : 385-413
40. **Wallace, J.C., Phillips, N. B., Snoswell, M. M., Goodall, G. J., Attwood, P. V. et Keech, D. B.** 1985. Pyruvate carboxylase :

mechanism of the partial reaction. *Annals New York Academy of Sciences*. **447** : 169-188

41. **Attwood, P. V.** 1995. The structure and the mechanism of action of pyruvate carboxylase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **27** : 231-249
42. **Goodall, G.J., Baldwin, G. S., Wallace, J. C. et Keech, D. B.** 1981. Factors that influence the translocation of the N-carboxybiotin moiety between the two sub-sites of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **199** : 603-609
43. **Dunn, M. F., Encarnación, S., Araiza, G., Vargas, M. C., Peralta, H., Mora, Y. et Mora, J.** 1996. Pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli* : mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. *J. of Bacteriol.* **178** : 5960-5970
44. **Cohen, N. D., Duc, J. A., beegen, H. et Utter, M. F.** 1979. Quaternary structure of pyruvate carboxylase from *Pseudomonas citronellolis*. *J. Biol. Chem.* **254** : 9262
45. **Jitrapakdee, S. et Wallace, J. C.** 1999. Structure, fonction and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **340** : 1-16
46. **Kumer, G . K., Haase, F. C., Phillips, N. F. B. et Wood, H. G.** 1988. Involvement and identification of a tryptophane residue at pyruvate binding site of transcarboxylase. *Biochemistry*, **27** : 5978-5983
47. **Scrutton, M. C., Griminger, P. et Wallace, J. C.** 1972. Pyruvate carboxylase. Bound metal content of the vertebrate liver enzyme as a function of diet and species. *J. Biol. Chem.* **247** : 3305-3313

48. **Scrutton, M. C., Young, M.R. et Utter, M. F.** 1970. Pyruvate carboxylase from baker's yeast. The presence of bound zinc. *J. Biol. Chem.* **245** :6220-6227
49. **Carver, J. A. Baldwin, G.S., Keech, D. B. et Wallace, J. C.** 1988. Inactivation of chicken liver pyruvate carboxylase by 1,10-phenanthroline. *Biochem. J.* **252** : 501-507
50. **Jitrapakdee, S. et Wallace, J. C.** 1999. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **340** : 1- 46
51. **Osmani, S. A. et Scrutton, M. C.** 1985. The structure and regulation of fungal pyruvate carboxylase. *Ann. N. Y. Acad. of Sci.* **447** : 56-71
52. **Barden, R. F., Fung, C. H., Utter, M. F. et Scrutton, M. C.** 1972. Pyruvate carboxylase from chicken liver. Steady state kinetic studies indicate a ``two-site`` ping-pong mechanism. *J. Biol. Chem.* **247** :1323-1333
53. **Chapman, S. A., Forbs, B. E., Wallace, J. C. et Cronan, J. E. Jr.** 1997. Covalent modification of an exposed surface turn alters the global conformation of the biotin carrier domain of *Escherichia coli* acetyl CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **272** : 26017-26022
54. **Sundaram, T. K., Cazzulo, J. J. et Kornberg, H. L.** 1971. Synthesis of pyruvate carboxylase from its apoenzyme and (+)-biotin in *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. J.* **122** : 663-669
55. **Mac Donald.** 1995. Influence of glucose on pyruvate carboxylase expression in pancreatic islets. *Arch. Biochem. Biophys.* **139** : 128-132

56. **Mac Donald, M. J., Efendic, S. et Otenson, C. -G.** 1996. Normalization by insulin treatment of low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of GK rats. *Diabetes*. **45** : 886-890
57. **Rothman, D. L., Magnusson, I., Katzz ,L. D., Shulman, R. G. et Shulman, G. I.** 1991. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR. *Science*. **254** :573-576
58. **Owen, O. E., Patel, M. S., Block, B. S. B., Kreulen, T. H., Reichle, F.A. et Mozzoli, M. A.** 1976. *Dans* Gluconeogenesis (Hanson, R. W. et Mehlman, M. A., eds.) p.533-558, Jhon Wiley et sons, New York.
59. **Mackall, J. C. et Lane, M. D.** 1977. Role of pyruvate carboxylase in fatty acid synthesis : alterations during preadipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79** :720-725
60. **Ballard, F.J. et Hanson, R. W.** 1970. Immunochemical studies with soluble and mitochondrial pyruvate carboxylase activities from rat tissue. *Biochem. J.* **8** :73-79
61. **Benjamin, A. M. et Quastel, J. H.** 1974. Fate of L-glutamate in the brain. *J. Neurochem.* **23** :457-464
62. **Cooper, A. J. et Plum, F.** 1987. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* **67** :440-419
63. **Wallace, J. C., Jitrapakdee, S. et Chapman-Smith, A.** 1998. Pyruvate carboxylase. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology.* **30** :1-5

64. **Petra, G., Wendisch, P., Wendisch, V. F., Paul, S., Eikmanns, B. J. et Sahm, H.** 1997. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, **143** : 1095-1103.
65. **Gokarn, R.R., Eitman, M. A. et Altman, E.** 2000. Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of the carboxylating enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *Applied and Environmental Microbiology*. **66** :1844-1850.
66. **Dietrerhaft M. D. et Freese E.** 1973. Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **218** : 6062-6070.
67. **Wurtele E. S. et Nikolau, B. J.** 1990. Plants contain multiple biotin enzymes : discovery of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase propionyl CoA carboxylase and pyruvate carboxylase in the plant kingdom. *Arch. Biochem. Biophys.* **278** : 179-186
68. **Osmani, S. A., Scrutton, M. C. et Mayer F.** 1985. The structure and regulation of fungal pyruvate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **47** : 56-71
69. **Webb, G. C., Jitrapakdee, S., Bottema, C. D. K. et Wallace, J. C.** 1997. Assignment of the pyruvate carboxylase gene to rat chromosome band 1q43 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.* **79** :151-152
70. **Jitrapakdee, S., Walker, M. E. et Wallace, J. C.** 1996. Identification of novel alternatively spliced pyruvate carboxylase mRNA with divergent 5'-untranslated regions which are expressed in tissue-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223** : 695-700

71. **Jitrapakdee, S., Booker, G. W., Cassady, A. I. et Wallace, J. C.** 1997. The rat pyruvate carboxylase gene structure. Alternate promoters generate multiple transcripts with the 5'-end heterogeneity. *J. Biol. Chem.* **272** : 20522-20530
72. **Jitrapakdee, S., Gong, Q., MacDonald, M.J. et Wallace, J. C.** 1998. Regulation of rat pyruvate carboxylase gene expression by alternate promoters during development, in genetically obese rats and in insulin-secreting cells. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity modulate translation. *J. Biol. Chem.* **273** : 34422-34428
73. **MacDonald, M. J.** 1995. Influence of glucose on pyruvate carboxylase expression in pancreatic islets. *Arch. Biochem. Biophys.* **319** : 128-132
74. **Stucka, R., Dequin, S., Salmon, J. et Gancedo, C.** 1991. DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isozymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **229** : 307-315
75. **Lim, F., Morris, C. P., Occhiodoro, F. et Wallace, J. C.** 1988. Sequence and domain structure of yeast pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **263** : 11493-11497
76. **Val, D. L., Chapman-Smith, A., Walker, M. E., Cronan, J. E. Jr. et Wallace, J. C.** 1995. Polymorphism of the yeast pyruvate carboxylase 2 gene and protein : effects on protein biotinylation. *Biochem. J.* **312** : 817-825
77. **Brewster, N. K., Val, D. L., Walker, M.E. et Wallace, J. C.** 1994. Regulation of pyruvate carboxylase isoenzyme (*pyc1*, *pyc2*) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and non-fermentative growth. *Arch. Biochem. Biophys.* **311** : 62-71

78. **Kim, S., Mellor, J. Kingsman, A. J. et Kingsman, S.M.** 1988. An AT rich region of dyad symmetry is a promoter element in the yeast TRP1 gene. *Mol. Gen. Genet.* **211** : 472-576
79. **Struhl, K.** 1985. Naturally occurring poly (dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82** :8419-8423
80. **Cazzulo, J.J., Sundarama, T. K., et Kornberg, H. L.** 1970. Properties and regulation of pyruvate carboxylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **176** : 1-19
81. **Cazzulo, J. J., Sundarama, T. K., et Kornberg, H. L.** 1969. Regulation of pyruvate carboxylase formation from the apo-enzyme and biotin in a *Thermophilic bacillus*. *Nature. Lond.* **223** :1137-1138
82. **Cazzulo, J. J., Sundarama, T. K., Dilks, S. N. et Kornberg, H. L et al.** 1971. *Biochem. J.* **122** : 653-656
83. **Dehodar, A. D. et Mistry, S. P.** 1969. Restoration of gluconeogenesis in biotin-deficient rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **131** : 507-512
84. **Mukhopadhyay, B., Stoddard, S. F. et Wolfe, R. S.** 1998. Purification, regulation, molecular and biochemical characterization of pyruvate carboxylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain deltaH. *J. Biol. Chem.* **173** : 5155-5166
85. **Taylor, B. L., Routman, S. ET Utter, M. F.** 1975. The control of the synthesis of pyruvate carboxylase in *Pseudomonas citronellolis*. Evidence from double labeling studies. *J. Biol. Chem.* **250** : 2376-2382

86. **Willison, J. C.** 1993. Biochemical genetics revised : the use of mutants to study carbon and nitrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **104** :1-38
87. **Tabita, F. R.** 1995. Chapitre 41 : The Biochemistry and Metabolic Regulation of Carbon Metabolism and CO₂ Fixation in Purple Bacteria. *In* : Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (Blankenship, R.E., Madigan, M.T. Eand Bauer. C. E. eds) Kluiver Acad. Pub. 1995
88. **Gibson, J. L.** Chapitre 51 : Genetic Analysis of CO₂ Fixation Genes. *In* : *Escherichia coli* and *Salmonella* (Neidhart, F. C., Ed. in Chief), Vol.1, ASM Press. 1996
89. **Wilison, J. C.** 1986. Pyruvate and acetate metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Gen. Microbiol.* **134** : 2429-2439
90. **Yakunin, A. F. et Hallenbeck, P. C.** 1997. Regulation of synthesis of pyruvate carboxylase in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. bacteriol.* **179** : 1460-1468
91. **Modak, H.V. et Kelly, D. J.** 1995. Acetyl-CoA dependent pyruvate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* : rapid and efficient purification using dye-ligand affinity chromatography. *Microbiology* **141** : 2619-2628
92. **Quail, M. A., Haydon, D. J. et Guest, J. R.** 1994. The *pdhR-aceEF-ipd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol. Microbiol.* **12** : 95-104

93. **Quail, M. A. et Guest, J. R.** 1995. Purification, characterization and mode of action of PdhR the transcriptional repressor of *pdhR-aceEF* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **15** : 519-529
94. **Knappe, J. et Sawers, G.**1990. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **75** ; 383-398
95. **Sawers, G. et Bock, A.** 1988. Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170** : 5330-5336
96. **Zeilstra-Ryalls, J. H., Gabbert, K., Mouncey, N. J., Kaplan, S. et Kranz, R. G.** 1997. Analysis of *fnrL* gene and its function in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.***179** : 7264-7273
97. **Mackay, N., Rigat, B., Douglas, C., Chen, H. -S. et Robinson, B. H.** 1994. cDNA cloning of human kidney pyruvate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202** : 1009-1014
98. **Haydon, D. J. et Guest, J. R.**1991. A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **79** : 291-296
99. **Scrutton, M. C., et Taylor, B. L.** 1974. Isolation and characterization of pyruvate carboxylase from *Azotobacter vinelandii* OP¹. *Arch. Biophys.* **164** : 641-654
100. **Simon, R., Priefer, U. et Puhler, A.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio / Technology* p. 784-791

101. **Yen, H. H. et Marrs, B.** 1976. Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* **126** : 619-629.
102. **Hubner, P., Willison, J. C., Vignais, P. M. et Biele, T. A.** 1991. Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **173** : 2993-2999
103. **Tabor, S et Richardson, C. C.** 1985. Bacteriophage T7 RNA polymerase / promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82** :1074-1078.
104. **Birboim, H. C. et Doly, J.** 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** :1513-1523
105. Rubidium chloride method for transformation competent *E. coli*; U. S. Dept. Commerce/ NOAA/ NMFS/ NWFSC/ Molecular Biology protocols. [http:// www. nwfs. noaa. Gov/ protocols/ rbcl. html](http://www.nwfs.noaa.Gov/protocols/rbcl.html)
106. **Zabarovsky, E. R. et Winberg, G.** 1990. High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res.* **18** : 5912
107. **Black, P. N. et Dirusso, C.C.** 1994. Molecular and biochemical analysis of fatty acid transport, metabolism and gene regulation in *Escherichia coli* *Biochem. Biophys. Acta.* **1210** : 123-145
108. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

109. **Crothers, D. M., Gatenberg, M. R. et Shrader.** 1991. Chapitre 9 : DNA bending in protein-DNA complexe *dans Methods in enzymology*, vol.208.
110. **Rodgers, J. T., Patel, P., Hennes, J. L., Bologna, S. L. et Mascotti, D. P.** 2000. Use of biotin-labeled nucleic acids for protein purification and agarose-based chemiluminescent electromobility shift assays. *Analytical Biochemistry*, **277** : 254-259
111. **Spiro, S. et Guest, Jr.** 1991. Adaptative responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *TIBS* **16** : 310-314
112. **Mosley, C., Suzuki, J. Y. et Bauer, C. E.** 1994. Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. *J. Bacteriol.* **176** : 7566-7573
113. **Luchi, S. et Lin, E. C. C.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* **9** : 9-15
114. **Hanamura, A. et Aiba, H.** 1992. Molecular mechanism of negative autoregulation of *Escherichia coli crp*. *Nucleic Acids Res.* **19** : 4413-4419
- 115 **Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. et Adhya, S.** 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Ann. Rev. Biochem.* **62** : 749-795