

Université de Montréal

Fonction de l'AmtB dans la régulation de la nitrogénase chez *Rhodobacter capsulatus*

Par

Imen Abdelmadjid

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de

L'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

En microbiologie et immunologie

Janvier, 2010

© Imen Abdelmadjid, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Fonction de l'AmtB dans la régulation de la nitrogénase chez *Rhodobacter capsulatus*

Présenté par :

Imen Abdelmadjid

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Drolet
Président-rapporteur

Patrick C. Hallenbeck
Directeur de recherche

France Daigle
Membre du jury

RÉSUMÉ

La fixation de l'azote diatomique est un processus très important à la vie, vu sa nécessité dans la biosynthèse de plusieurs molécules de base; acides aminés, acides nucléiques, etc. La réduction de l'azote en ammoniacque est catalysée par la nitrogénase, une enzyme consommatrice de beaucoup d'énergie étant donné qu'elle nécessite 20 à 30 moles d'ATP pour la réduction d'une mole d'azote. De ce fait une régulation rigoureuse est exigée afin de minimiser le gaspillage d'énergie. Plusieurs systèmes de contrôle sont connus, aussi bien au niveau post-traductionnel que traductionnel.

Chez la bactérie photosynthétique pourpre non-sulfureuse *R. capsulatus*, la régulation de l'activité de la nitrogénase nécessite une panoplie de protéines dont la protéine membranaire AmtB, qui est impliquée dans le transport et la perception d'ammonium, et les protéines PII qui jouent plusieurs rôles clés dans la régulation de l'assimilation d'azote. Suite à l'ajout de l'ammonium dans le milieu, une inhibition réversible de l'activité de la nitrogénase est déclenchée via un mécanisme d'ADP-ribosylation de la nitrogénase. La séquestration de GlnK (une protéine PII) par l'AmtB permet à DraT, une ADP-ribosyltransférase, d'ajouter un groupement ADP-ribose sur la protéine-Fe de la nitrogénase l'empêchant ainsi de former un complexe avec la protéine-MoFe. Donc, le transfert d'électrons est bloqué, engendrant ainsi l'inhibition de l'activité de la nitrogénase qui dure aussi long que la concentration d'azote fixé reste élevé, phénomène appelé le « Switch-off/Switch-on » de la nitrogénase.

Dans ce mémoire, pour mieux comprendre ce phénomène de régulation, des mutations ponctuelles au niveau de certains résidus conservés de la protéine AmtB, dont D338, G367, H193 et W237, étaient générées par mutagenèse dirigée, afin d'examiner d'avantage leur rôle dans le transport d'ammonium, la formation du complexe AmtB-GlnK, ainsi que dans le « Switch-off » et l'ADP-ribosylation. Les résultats permettent de conclure l'importance et la nécessité de certains résidus telle que le G367 dans la régulation de la nitrogénase et le transport d'ammonium, contrairement au résidu D338

qui ne semble pas être impliqué directement dans la régulation de l'activité de la nitrogénase. Ces résultats suggèrent d'autres hypothèses sur les rôles des acides aminés spécifiques d'AmtB dans ses fonctions comme transporteur et senseur d'ammonium.

Mot clés : fixation de l'azote, nitrogénase, ADP-ribosylation, protéine AmtB, protéines PII, transport d'ammonium, mutagenèse dirigée.

ABSTRACT

The reduction of diatomic nitrogen is a very important biological process given the need of all organisms for fixed nitrogen for the biosynthesis of basic key molecules such as, amino acids, nucleic acids, etc.. The reduction of nitrogen to ammonia is catalyzed by nitrogenase, an enzyme with high energy demands since it requires 20 to 30 moles of ATP for the reduction of one mole of nitrogen. Therefore a strict control is required to minimize energy waste. Several systems of regulation are known, both at the translational and post-translational level.

In the purple non-sulfur photosynthetic bacterium *R. capsulatus*, the post-translational regulation of nitrogenase activity requires an array of proteins, including; the membrane protein AmtB, implicated in the perception and transport of ammonium, and PII proteins, which play key roles in the regulation of nitrogen assimilation. Following the addition of ammonium to the medium nitrogenase activity is reversibly inhibited (nitrogenase switch-off) via a mechanism of ADP-ribosylation of nitrogenase. Sequestration of GlnK (PII protein) by AmtB allows DraT, an ADP-ribosyltransferase, to add an ADP-ribose group to the Fe protein preventing it from forming a complex with the MoFe protein and nitrogenase activity is consequently inhibited.

To better understand this phenomenon, in this Master's thesis point mutations were created by site-directed mutagenesis at specific conserved residues of the AmtB protein, namely, D338, G367, H193 and W237, in order to examine their role in ammonium transport, formation of an AmtB-GlnK complex, and the regulation of nitrogenase

(Switch-off/ADP-ribosylation). Plasmid-borne mutant alleles were transferred to a Δ AmtB strain of *R. capsulatus*, and the resultant strains were subjected to a series of tests. These demonstrated the importance and necessity of certain residues, such as G367, in the regulation of nitrogenase and ammonium transport, in contrast to residue D338, which seems to have no direct role in the regulation of nitrogenase activity. These results suggest further hypotheses about the roles of specific amino acids of AmtB in its functions as a sensor and transporter for ammonium.

Key words: nitrogen fixation, nitrogenase, ADP-ribosylation, AmtB protein, PII proteins, ammonium transporter, site-directed mutagenesis.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iv
Abstract	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles et abréviations	xiii
Remerciements	xv
CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. INTRODUCTION	2
1.1 L'assimilation de l'azote	3
1.1.1 La glutamine synthétase	3
1.1.2 La glutamate synthétase	3
1.1.3 La glutamate déshydrogénase	4
1.2 La nitrogénase	4
1.2.1 La dinitrogénase	5
1.2.2 La dinitrogénase réductase	5
2. LA FAMILLE DE PROTÉINES Mep/Amt/Rh	6
2.1 Les protéines Mep	7
2.2 Les protéines Rhésus (Rh)	7
2.3 La protéine AmtB	7
2.4 Interaction entre AmtB et les protéines PII	9
3. SYSTÈME Ntr	10

3.1 Les protéines PII	10
3.1.1 La protéine GlnB	11
3.1.2 La protéine GlnK	12
3.2 L'uridylyltransférase GlnD	13
4. RÉGULATION DE LA FIXATION D'AZOTE	14
4.1 Système de regulation NtrB/NtrC	14
4.1.1 La protéine NtrB	14
4.1.2 La protéine NtrC	15
4.1.3 Les activateurs NifA et AnfA	16
4.1.4 La régulation transcriptionnelle et posttraductionnelle de l'activité de la nitrogénase	16
4.1.5 DraG et DraT	19
5. LA BACTÉRIE <i>Rhodobacter Capsulatus</i>	20
6. LE PROJET DE RECHERCHE	21
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
CHAPITRE III : RÉSULTATS	35
CHAPITRE IV : DISCUSSION	45
CONCLUSION	50
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51
ANNEXEA	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Caractéristiques des souches bactériennes	24
Tableau II.	Caractéristiques des différents plasmides	25
Tableau III.	Amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée	27

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	Cycle de l'azote	2
FIGURE 2.	Représentation schématique de la nitrogénase	4
FIGURE 3.	Représentation schématique du cycle d'activation de la nitrogénase	6
FIGURE 4.	Structure de l'homotrimère AmtB d' <i>E. coli</i>	8
FIGURE 5.	Structure du complexe GlnK-AmtB d' <i>E. coli</i>	9
FIGURE 6.	Structure de la protéine de transduction GlnB d' <i>E. coli</i>	11
FIGURE 7.	Schéma représentant les trois niveaux de régulation de l'expression et de l'activité de la nitrogénase molybdène et fer de <i>R. capsulatus</i>	12
FIGURE 8.	Contrôle de la fixation d'azote chez <i>R. capsulatus</i>	14
FIGURE 9.	Modèle des fonctions de l'AmtB et GlnK dans le transport d'ammonium et son intégration dans le système Ntr d' <i>E. coli</i>	15
FIGURE 10.	Régulation de la nitrogénase par séquestration membranaire de GlnK-DraG	18
FIGURE 11.	Modèle de la régulation de l'activité de DraT et de DraG d' <i>Azospirillum brasilense</i> en réponse à un choc NH ₄ ⁺	19
FIGURE 12.	La bactérie photosynthétique pourpre <i>R. capsulatus</i>	21
FIGURE 13.	Fragment d'AmtB de <i>R. capsulatus</i> muté respectivement au niveau du résidu D361 (A) du résidu G367 (B) du résidu H193(C) et du résidu W237(D)	37
FIGURE 14.	Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche sauvage SB1003 de <i>R. capsulatus</i>	38
FIGURE 15.	Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA1	39
FIGURE 16.	Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA2	39

FIGURE 17. Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA3	40
FIGURE 18. Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA4	40
FIGURE 19. ADP-ribosylation de la protéine-Fe chez les souches de <i>R. capsulatus</i> SB1003 (B) RCIA1 (C) RCIA2 (D) RCIA3 et (E) RCIA4	42
FIGURE 20. Détection de la protéine GlnK au niveau de la membrane suite à l'ajout de NH_4^+ chez la souche sauvage de <i>R. capsulatus</i>	43

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATION

A	Alanine
aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
Ap^r	Résistance à l'ampicilline
Asp	Acide aspartique
ATase	Adénylyltransférase
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cytosine
°C	Degré Celsius
CaCl₂	Dichlorure de calcium
Cm²	Centimètre carré
CO₂	Dioxyde de carbone
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Quatre désoxyribonucléosides triphosphate
DO	Densité optique
E	Phénylalanine
e⁻	Électron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FdxN	Ferrédoxine
Fe	Fer
G	Guanine
GDH	Glutamate déshydrogénase
GLN	Glutamine
GLU	Glutamate
GOGAT	Glutamine synthétase
GR	Globules rouges
GS	Glutamine synthétase
h	Heure
H⁺	Proton
His	Histidine
IgG	Immunoglobine G
Kb	Kilopaires de base
kDa	kilodalton
Km^r	Résistance à la kanamycine
LB	<i>Luria broth</i>
M	Molaire

Mg⁺²	Magnésium
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
Mn⁺²	Manganèse
Mo	Molybdène
mol	Mole
N₂	Azote
NaCl	Chlorure de sodium
NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NaOH	Hydroxyde de sodium
NH₃	Ammoniaque
NH₄⁺	Ammonium
NH₄Cl	Chlorure d'ammonium
(NH₄)₂SO₄	Sulfate d'ammonium
NO₂⁻	Nitrite
NO₃⁻	Nitrate
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pb	Paire de base
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RCV	Na-lactate, sels, tampon K-phosphate
rpm	Révolution par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel polyacrylamide avec SDS
TAE	Tampon tris-acétate EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline avec tween 20</i>
Tc^r	Résistance à la tétracycline
Tyr	Tyrosine
ug	Microgramme
ul	Microlitre
UMP	Uracile monophosphate
UR	<i>Uridylremoving</i>
UTase	Uridyltransférase
V	Volte
YPS	Yeast extract/peptone/salts
α	Alpha
β	Bêta
σ	Sigma

REMERCIEMENT

Mon travail a été effectué au sein du laboratoire de Dr. Patrick C. Hallenbeck au département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada.

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Dr Patrick Hallenbeck de m'avoir accepté dans son laboratoire, pour son soutien, ses conseils et ses orientations bénéfiques.

Ainsi que mes confrères Rim, Nesrine et Mona pour leurs soutiens moral et leurs encouragements.

Le grand merci revient aux deux êtres chers à mon cœur mes parents Mohamed Larbi et Soraya qui sont les piliers sur lesquels je me suis appuyée pour l'accès au savoir, et à la recherche.

A ma chère sœur Selma et mon petit frère adorable Amine.

A mes grands parents mes tantes et oncles ainsi que mes cousines et cousins et à tous mes ami(e)s qui m'ont soutenus de loin ou de près.

CHAPITRE I
REVUE DE LITTÉRATURE

1. Introduction

L'azote peut exister sous plusieurs formes, en plus de la forme diatomique (N_2) qui représente 78% de l'atmosphère terrestre, on a l'ammoniaque (NH_3), l'ammonium (NH_4^+), le nitrite (NO_2^-), le nitrate (NO_3^-) et l'azote organique (ADN, protéines) (22). C'est l'un des éléments les plus importants pour la survie de la plupart des organismes vivants, vu sa nécessité dans la production des acides nucléiques, des acides aminés, du NAD et des sucres aminés, qui sont impliqués dans la synthèse des lipopolysaccharides et peptidoglycane. L'azote est utilisé par la majorité des organismes seulement lorsqu'il est fixé, c'est-à-dire transformé en NH_3 . La fixation de l'azote se fait de façon non biologique (combustion), par la foudre ou l'industrie, et de façon biologique par les bactéries symbiotiques et les bactéries fixatrices d'azote.

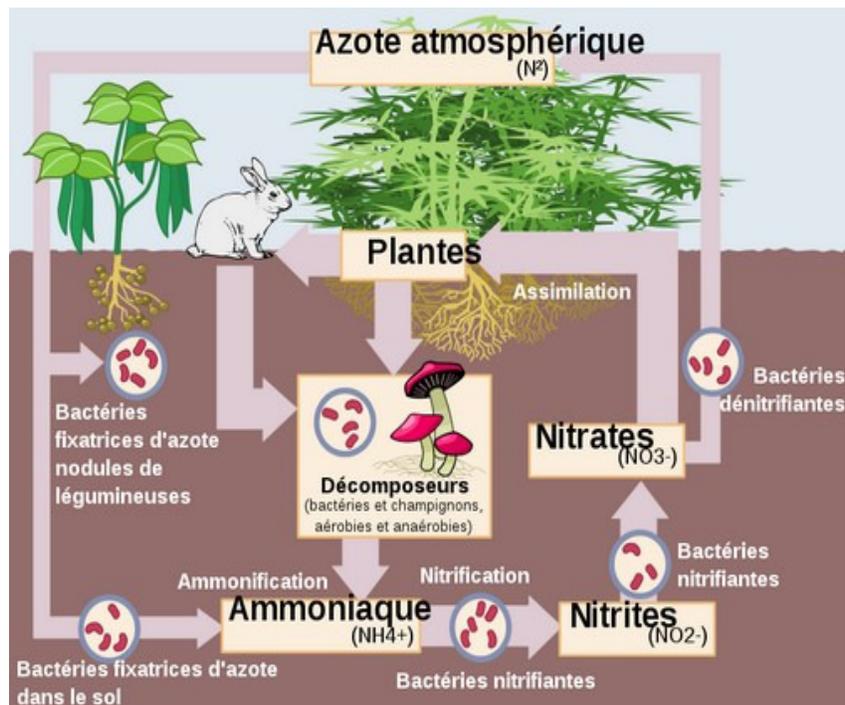


Figure 1. Cycle de l'azote (figure tirée de www.techno-science.net/?onglet=news&news=6700).

1.1 L'assimilation de l'azote

Plusieurs composés organiques et inorganiques azotés peuvent être utilisés par les micro-organismes, et transformés en NH_4^+ avant d'être assimilés. À son tour, l'assimilation d'ammonium se fait par deux voies métaboliques : glutamine synthétase/glutamate synthétase (GS/GOGAT) et le glutamate déshydrogénase (GDH) (22).

1.1.1 Glutamine synthétase

La glutamine synthétase (GS) est utilisée par la plupart des organismes comme voie alternative en cas d'épuisement de source d'ammonium. (22). Elle est un dodécamère de ~ 620 kDa, formée de 12 sous unités identiques de 55 KDa, encodées par le gène *glnA* qui se trouve dans l'opéron *glnBA* chez *R. capsulatus* (61). La GS joue un rôle important dans le métabolisme de l'azote, elle permet son introduction dans la cellule, en combinant le NH_3 avec le glutamate pour donner la glutamine. Cette réaction est défavorable pour la cellule, vu qu'elle consomme beaucoup d'ATP. Donc, les bactéries possèdent plusieurs moyens afin de contrôler l'activité de GS. Cette régulation se fait par adénylation/déadénylation au niveau du résidu Tyr-397 par une enzyme bidirectionnelle (ATase) encodée par *glnE*. L'activité d'ATase est à son tour contrôlée par PII (61). L'importance physiologique de la régulation post-transcriptionnelle de GS est de prévenir la diminution de la concentration d'ATP et de protéger le niveau de glutamate, permettant ainsi une croissance rapide (87).

1.1.2 Glutamate synthétase

Le glutamate synthétase est impliqué dans la production du glutamate en transférant un groupement amide de la glutamine au 2-oxoglutarate. Le glutamate synthétase de la bactérie *Azospirillum brasilence* est composé de quatre hétéro-dimères formés d'une sous unité de 160 KDa et d'une autre de 52 KDa.

1.1.3 Glutamate déshydrogénase

Le glutamate déshydrogénase encodé par *gdhA*, est un hexamère dont le poids moléculaire est de 300 kDa. Il catalyse l'ajout de NH_3 au 2-oxoglutarate pour donner le glutamate (72). En présence de NH_3 , l'organisme utilisera la voie de glutamate déshydrogénase, étant donné qu'elle ne consomme pas d'ATP contrairement à la GS.

1.2 Nitrogénase

La réduction du dinitrogène en ammonium est réalisée par le complexe enzymatique nitrogénase, qui nécessite 16 molécules de MgATP pour la réduction d'une molécule de N_2 , selon la réaction suivante :

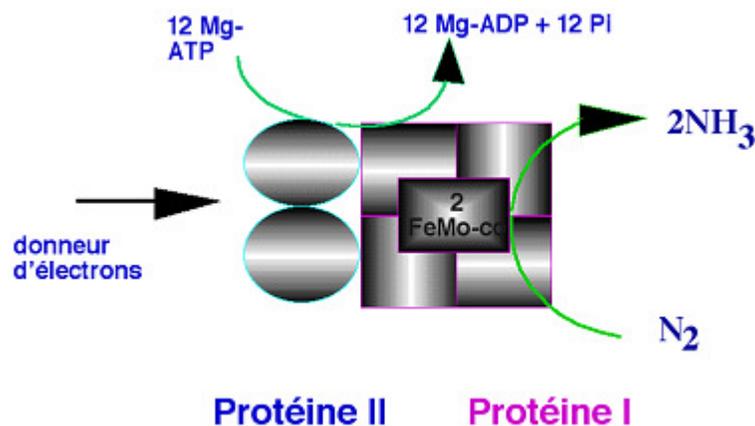
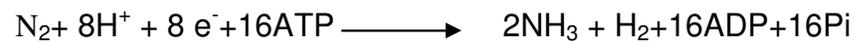


Figure 2. Représentation schématique de la nitrogénase.

En plus du dinitrogène, la nitrogénase peut réduire de nombreux autres substrats tels que; l'acétylène, l'azoture, et le cyanure (12). Ce processus de réduction nécessite un environnement anaérobie vu la sensibilité de la nitrogénase à l'oxygène. Dans le cas des bactéries aérobies telles que les *Azotobacters*, elles réduisent le flux d'oxygène, tout en

maintenant un niveau intracellulaire bas, par un niveau élevé de respiration (16, 102). Les deux composants de cette enzyme, la protéine Mo-Fe et la protéine-Fe, s'associent avec une hydrolyse de 2 MgATP pour chaque électron transféré.

1.2.1 La dinitrogénase (protéine-MoFe)

La dinitrogénase est un hétéro-tétramère composé de deux sous-unités non identiques $\alpha_2\beta_2$ codées par *nifD* et *nifK*. Les protéines α (NifD) et β (NifK) ont un poids moléculaire de 59 et 54 kDa respectivement. La dinitrogénase est composée du cofacteur MoFe contenant du fer, du molybdène et du soufre (9), qui est le site d'attachement et de réduction du substrat, ainsi qu'un centre P composé de fer et de soufre qui reçoit l'électron transféré directement de la dinitrogénase réductase (NifH ou protéine-Fe) (79). La dinitrogénase ne peut pas être exprimée sous sa forme active en absence de la protéine-Fe. Puisque cette dernière est essentielle à la biosynthèse du cofacteur FeMoCo et à sa maturation (101). La bactérie *R. capsulatus* possède six ferrédoxines dont la plus importante pour la fixation de l'azote est FdxN, qui intervient dans la stabilisation de la nitrogénase Mo et dans le transport d'électrons. Une mutation au niveau de la FdxN a donné une nitrogénase molybdène 20 fois moins active que celle de la souche sauvage (43).

1.2.2 La dinitrogénase réductase (protéine-Fe)

La dinitrogénase réductase est un homo-dimère de 64 KDa (23,27). Codée par le gène *nifH*, elle contient un centre d'oxydoréduction (4Fe-4S) (101). La protéine-Fe joue un rôle dans le transfert d'électrons à la dinitrogénase, nécessaire à la réduction du substrat (N_2). L'activité de la nitrogénase se fait selon un cycle précis qui comporte quatre étapes essentielles. En premier lieu, on a la formation du complexe entre la protéine-Fe, deux molécules d'ATP et la protéine-MoFe, suivie du transfert d'électrons entre les deux protéines avec hydrolyse de l'ATP. Ensuite, une dissociation de la protéine-Fe du complexe aura lieu avec une réduction du centre (4Fe-4S) et un échange

de l'ATP en ADP. Ce cycle se répète plusieurs fois jusqu'à l'accumulation d'un nombre suffisant d'électrons apte à réduire le substrat (83).

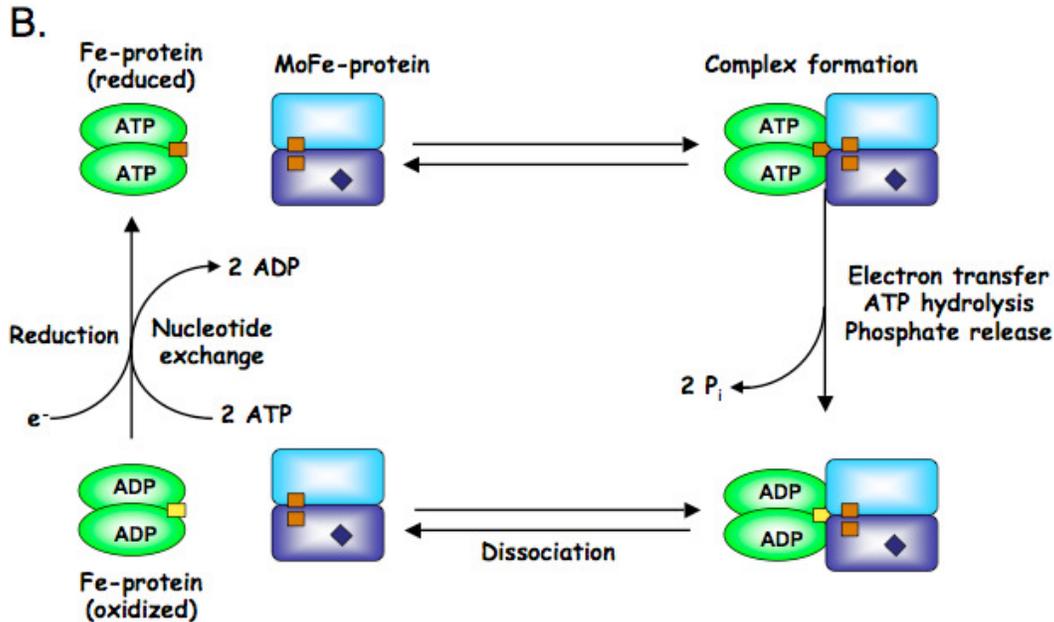


Figure 3. Représentation schématique du cycle d'activation de la nitrogénase (17).

2. La famille Mep/Amt/Rh

L'ammonium (NH_4^+) est une excellente source d'azote pour plusieurs organismes, incluant les procaryotes, les plantes et les champignons. Son transport à l'intérieur de la cellule est assuré par les protéines membranaires de la famille Mep/Amt/Rh (50), quoi qu'il puisse aussi passer à travers la membrane sous sa forme gazeuse (NH_3), par diffusion. Les séquences de ces protéines membranaires étaient déterminées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Mep1) (53) et chez *Arabidopsis thaliana* (Amt-1,1) (71). Aujourd'hui un vaste nombre de protéines de cette famille est connu, dont Amt, qui est spécifique aux bactéries, Mep (méthylammonium perméase) chez les levures et Rh (protéine Rhésus) chez les vertébrés (3). La plupart des procaryotes contiennent des

gènes codant pour une protéine Amt, dans certains cas 2 ou 3 homologues sont présents, comme chez la bactérie *R. capsulatus* qui possède deux protéines membranaires AmtB et AmtY (37). Les gènes *amt/mep* codent pour des polypeptides de 400-500 acides aminés, possédant 11 hélices transmembranaires (3), avec une séquence N-terminale extrasolique et une C-terminale cytoplasmique (55,90).

2.1 Les protéines Mep

La protéine Mep joue un rôle important dans l'assimilation et la compensation des fuites d'ammonium (54,10). *Saccharomyces cerevisiae* possède trois homologues de la protéine membranaire Mep (méthylammonium perméase), Mep1, Mep2 et Mep3. Malgré qu'il y ait une forte homologie entre ces protéines, la protéine Mep2 a une forte affinité pour NH_4^+ , contrairement à Mep3 dont l'affinité à NH_4^+ est beaucoup plus faible (54). Il a été révélé que la protéine Mep2 joue le rôle de senseur quand l'ammonium devient limitant, induisant ainsi une croissance pseudohyphale (51,55)

2.2 Les protéines Rhésus (Rh)

La protéine Rh, homologue d'Amt, se trouve à la surface des érythrocytes (GR) des mammifères. Elle est reconnue pour son caractère immunologique (3), dont la négativité et la positivité du groupe sanguin. Elle comporte 12 hélices transmembranaires dont les deux terminaisons (N et C-terminale) sont intracellulaires. En plus de RhD et RhCE, les globules rouges humaines possèdent également une glycoprotéine membranaire de 50 kDa (30), qui contribue à la perméabilité des érythrocytes pour le CO_2 (20).

2.3 La protéine AmtB

L'AmtB est une protéine membranaire, qui possède 11 hélices transmembranaires avec une région N-terminale extra-cytoplasmique et une région C-terminale intracytoplasmique (50,90), est un homotrimer de 46,8 kDa. Elle est caractérisée par la

présence d'un pore hydrophobe dans chaque une de ses sous-unités qui intervient dans le transport d'ammonium (2,45). La plupart des études reliant la fonction et la structure de l'AmtB ont été faites sur *E. coli*, et comme il y a beaucoup de homologie entre les AmtBs d'*E. coli* et *R. capsulatus* on peut supposer que les résidus d'AmtB de *R. capsulatus* peuvent être impliqués de la même manière que chez *E. coli*.

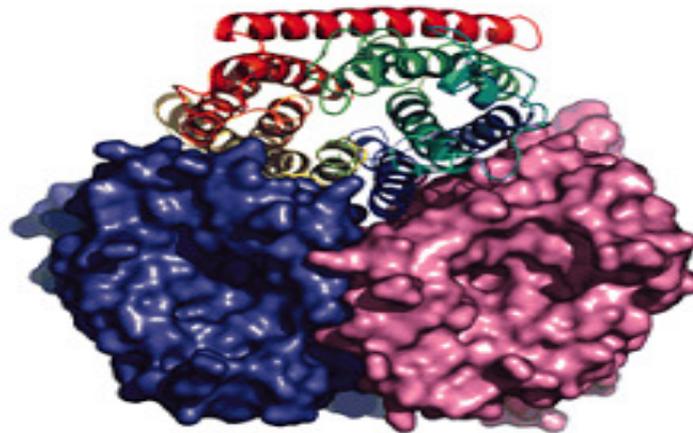


Figure 4. Structure de l'homo-trimère AmtB d'*E. coli*. Vue de la surface périplasmique (106).

L'embouchure périplasmique de l'AmtB est fermée par deux résidus de phenylalanine conservés, F131 et F240 chez *R. capsulatus* (F107 et F215 chez *E. coli*), nécessitant un réarrangement de la protéine lors du transport de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (3). Le site de recrutement de NH_4^+ , situé au creux de la surface périplasmique, est constitué de F127, F131, W172 et S244 de *R. capsulatus* (F103, F107, W148 et S219 chez *E. coli*) (3). Le D185 d'AmtB de *R. capsulatus* pourrait jouer un rôle structural dans les vestibules de recrutement (45,106), aussi comme un accepteur final d'un proton provenant du substrat suite à un réarrangement du vestibule (entrée de NH_4^+) (75).

Deux résidus histidines conservés, H193 et H342 de *R. capsulatus* (H168 et H318 d'*E. coli*) sont localisés à l'intérieur du pore hydrophobe et peuvent jouer le rôle d'accepteur de protons (11). Par contre, au niveau de l'entrée cytoplasmique du pore, le

résidu D334 de *R. capsulatus* (D309 d'*E. coli*) intervient dans le réarrangement d'AmtB lors de son interaction avec GlnK (14), ou bien comme donneur de protons au substrat après sa traversé à travers la membrane (45,75). L'AmtB possède également une fonction de transduction de signal, en signalant à GlnK la présence d'ammonium dans le milieu extracellulaire (100). Donc la protéine membranaire AmtB joue un rôle essentiel dans le transport d'ammonium et comme un senseur (106).

2.4 Interaction entre les protéines PII et AmtB

La localisation des gènes *amtB* et *glnK* au niveau du même opéron suggère que les protéines synthétisées par la suite vont s'interagir ensemble (90). Cette interaction, la formation du complexe AmtB-GlnK, joue un rôle important dans la régulation de l'activité de la nitrogénase et le transport d'ammonium (90). Une concentration élevée d'ammonium dans le milieu externe entraîne une diminution relative de la concentration de 2-oxoglutarate et du rapport ATP/ADP (37). Sous ces conditions la protéine GlnK, une protéine PII qui sera décrite avec plus de détails un peu plus tard, sera deuridylylée par GlnD (enlève le groupement UMP sur la Tyr 51), ce qui lui permet de s'ancrer au niveau de la membrane par l'insertion de sa boucle T dans le pore hydrophobe d'AmtB, empêchant ainsi le passage de NH_4^+ à travers le pore. Ceci a été montré par les études cristallographiques faites sur le complexe AmtB-GlnK d'*E. coli* (14,24).

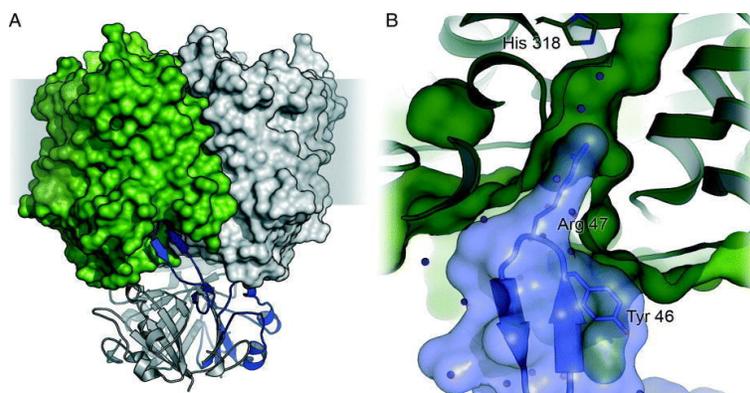


Figure 5. Structure du complexe GlnK-AmtB d'*E. coli*. a. vue latérale du complexe. b. détail du blocage du canal cytoplasmique de sortie de l'AmtB par GlnK. Légende : vert= AmtB; bleu=GlnK. (3).

La formation du complexe engendrera un «Switch-off» de l'activité de la nitrogénase par l'ajout d'un groupement ADP-ribose sur la protéine-Fe par DraT (dinitrogénase réductase ADP-ribosyltransferase) (17), ce qui va empêcher le transfert d'électrons entre les deux protéines de la nitrogénase. En suite, la protéine DraG (glycohydrolase) qui catalyse l'enlèvement du groupement ADP-ribose, va former un complexe avec GlnK et sera donc séquestrée au niveau de la membrane. Cela va inhiber son activité, et elle sera inapte à faire le «Switch-on» de la nitrogénase (33). De cette manière la bactérie peut éviter une dilapidation d'énergie.

3. Système Ntr

L'expression des gènes d'assimilation et du catabolisme d'azote est coordonnée par un système de régulation central (Ntr), composé de quatre protéines; UTase/UR, GlnB, et NtrB/NtrC (4).

3.1 Les Protéines PII

Les protéines PII jouent aussi un rôle central dans la régulation de l'activité de la nitrogénase (91). Elles sont présentes chez la majorité des bactéries, des archa, des plantes et des algues rouges. La première découverte de la famille des protéines PII, a été vue chez le génome des chloroplastes de *Porphyra purpura* (algue rouge) (84). Malgré leur prédominance dans plusieurs organismes, certains ne codent pas pour ces protéines PII, y compris *Helicobacter abyssi*, *Mycoplasma genitalium*, *Campylobacter jejuni*, *Pyrococcus abyssi* dont la plus part sont pathogènes (4). Parmi les membres de la famille des protéines PII, on trouve GlnK, GlnB et GlnJ chez *R. rubrum* et seulement GlnK et GlnB chez *E. coli* et *R. capsulatus*.

3.1.1 La protéine GlnB

La protéine GlnB est un monomère de ~12,4 kDa qui présente une homologie de 67% avec GlnK (1). Le gène *glnB*, qui a été identifié en 1984 (94), se trouve associé et transcrit avec *glnA* (*glnBA*), qui code pour la glutamine synthétase chez les α -protéobactéries (47). La protéine GlnB possède trois boucles, T, B et C. La boucle T est essentielle dans son interaction avec l'ATase, l'UTase et NtrB (4,35).

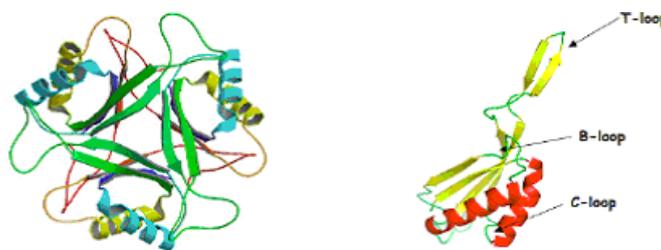


Figure 6. Structure de la protéine de transduction GlnB d'*E. coli*. a. vue en haut de la structure trimérique de GlnB d'*E. coli*. b. vue de côté des boucles T-, B et C de la structure monomérique de GlnB d'*E. coli*. Légende : rouge=hélice- α ; jaune=feuillet- β . (PDB ID : 2PII)

La protéine GlnB joue un rôle primordial dans la régulation transcriptionnelle de la Mo-nitrogénase en présence d'une concentration élevée d'ammonium (18). La GlnB règle l'expression à partir des promoteurs Ntr-dépendant en se fixant sur NtrB (78). Dans cette condition l'activité de phosphatase de NtrB est favorisée et le NtrC sera déphosphorylé. Par conséquent, l'activité de NtrC comme activatrice de transcription sera inhibée (57). La protéine GlnB est nécessaire également dans le contrôle post-transcriptionnel de l'activité de NifA en présence d'ammonium. Elle se lie sur le domaine N-terminal de cette dernière et empêche son interaction avec le domaine central catalytique, inhibant ainsi son activité (5). Ceci a été révélé chez *R. capsulatus* et *R. rubrum*.

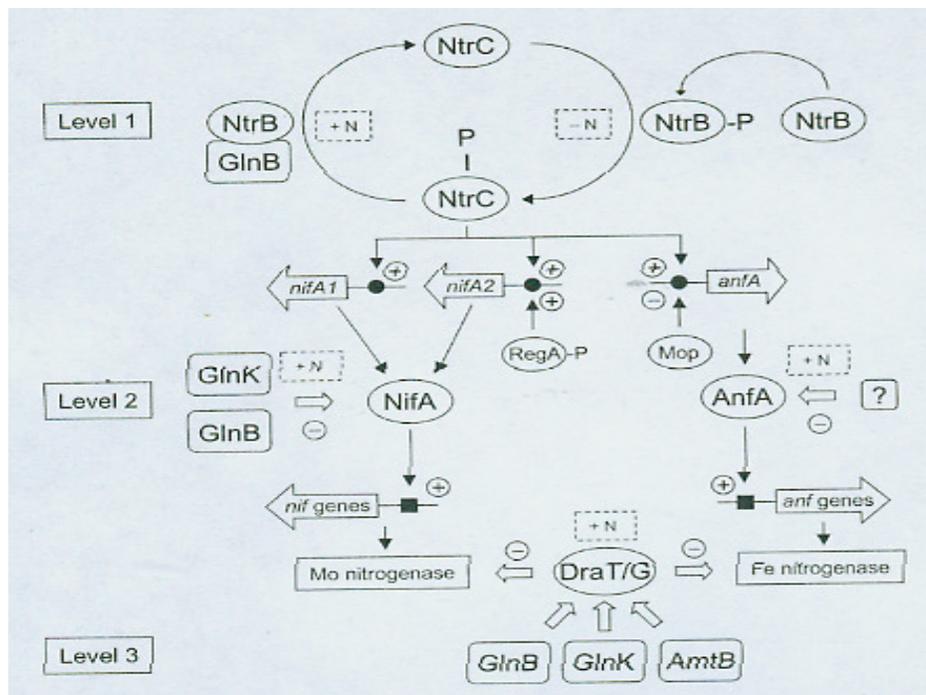


Figure 7. Schéma représentant les trois niveaux de régulation de l'expression et de l'activité de la nitrogénase molybdène et fer de *R. capsulatus* (58).

3.1.2 La protéine GlnK

La protéine GlnK, découverte en 1990 (98), est un trimère de 44 kDa composée de 112 acides aminés (1). Elle contient deux hélices α et six feuilletts β reliées par trois boucles. La plus grande est la boucle T localisée entre les résidus 37-55, elle contient le site d'uridylylation (Tyr 51) (13,39), qui lui permet d'interagir avec NtrB et l'UTase. La boucle T de GlnK, étant plus flexible que celle de GlnB (70), peut adopter plusieurs conformations et joue un rôle important dans l'interaction protéine-protéine (98,103). La connexion entre l'hélice α_2 et le feuillet β_4 est assurée par la loupe B, qui est située entre les résidus 82-88 (13,39), et enfin la loupe C qui se trouve au niveau C-terminal entre le résidu 102-105 (13,39), elle possède le site de liaison à l'ATP.

La protéine GlnK est impliquée dans une cascade de régulation qui contrôle le métabolisme d'azote. Y compris la régulation de l'activité de NtrC via son interaction avec NtrB (7,8). GlnK est exprimée seulement en conditions de carence en azote fixé contrairement à la GlnB qui est exprimée de façon constitutive (94). En absence d'ammonium, GlnK est modifiée par uridylation, par l'ajout du groupement UMP sur le résidu Tyr 51 par GlnD, qui empêche la formation du complexe AmtB-GlnK, donc sa séquestration au niveau de la membrane (8, 88,94). Il a été montré par les études cristallographiques chez *E. coli* que GlnK possède un site de fixation pour 2-oxoglutarate (8) et trois sites pour la fixation d'ATP. La fixation de ces métabolites influence la formation du complexe en affectant la structure et la mobilité de la boucle T nécessaire pour la formation du complexe avec AmtB (98).

3.2 L'uridylyltransférase GlnD

La protéine GlnD, codée par *glnD*, est un monomère de ~120 KDa qui possède deux activités enzymatiques, une uridylyltransférase (UTase) et l'autre « uridyl removing » (UR). GlnD est considérée comme le senseur primaire du statut du nitrogène à l'intérieur de la cellule, qui est reflété par le niveau de glutamine (34,40). En absence d'ammonium un niveau bas de glutamine active la fonction UTase de GlnD qui va ajouter un groupement UMP sur le résidu Tyr 51 de chaque sous-unité du trimer PII (40). Par contre, en présence d'ammonium, la concentration de glutamine augmente activant la fonction UR de GlnD, qui va enlever le groupement UMP. Il faut noter que le cation Mg^{+2} est essentiel pour les deux activités de GlnD (40). Deux domaines putatifs ACT (aspartokinase-chorismate mutase TyrA), ont été identifiés à l'extrémité C-terminale de GlnD de *R. rubrum*. Étant donné le rôle de GlnD comme senseur de glutamine et 2-oxoglutarate, il a été supposé que ces domaines joueront le rôle de senseur, mais ça reste à prouver expérimentalement.

4. Régulation de la fixation d'azote

4.1 Système de régulation NtrB/NtrC

L'activité et la répression des gènes de régulation de la fixation du nitrogène sont régulées par la protéine NtrC «Nitrogen Regulatory Protein C» et la protéine NtrB «Nitrogen Regulatory Protein B» qui règle l'activité de NifA, régulateur transcriptionnel des gènes *nif* (66).

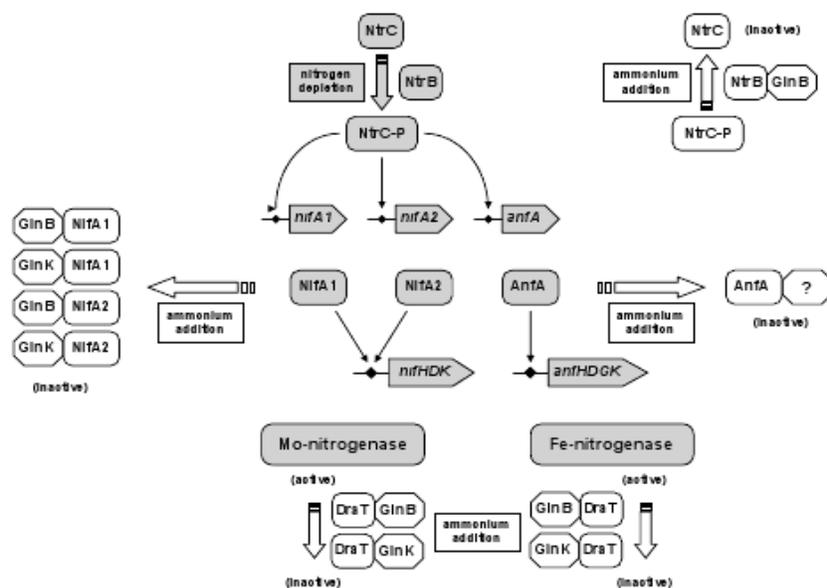


Figure 8. Contrôle de la fixation d'azote chez *R. capsulatus* (59).

4.1.1 La protéine NtrB

NtrB, protéine homodimérique cytoplasmique de 36 kDa possède deux activités: une phosphatase et l'autre kinase (69,76). Elle est constituée de trois domaines, un domaine N-terminal impliqué dans la transduction du signal, un domaine central (phosphotransférase/phosphatase/dimerization) et le domaine kinase C-terminal qui

comporte le site de liaison d'ATP et de GlnB (4). Chez *R. capsulatus* seulement GlnB joue un rôle majeur sur l'activité kinase et phosphatase de NtrB contrairement à *E. coli* où la GlnK est aussi impliquée (57).

4.1.2 La protéine NtrC

NtrC, une protéine de ~52 kDa, possède un domaine C-terminal de 90 résidus, qui contient le site de liaison d'ADN, un domaine central de 240 résidus hautement conservé nécessaire à l'activation de la transcription par l'ARN polymérase σ^{54} , et un domaine N-terminal de 124 résidus (76). En présence d'une concentration basse d'azote fixé, NtrC est phosphorylée au niveau du résidu Asp-54 dans le domaine N-terminal, rendant la protéine active (44). Par conséquent, elle active à son tour la transcription d'autres gènes *nif* et certains gènes impliqués dans le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle.

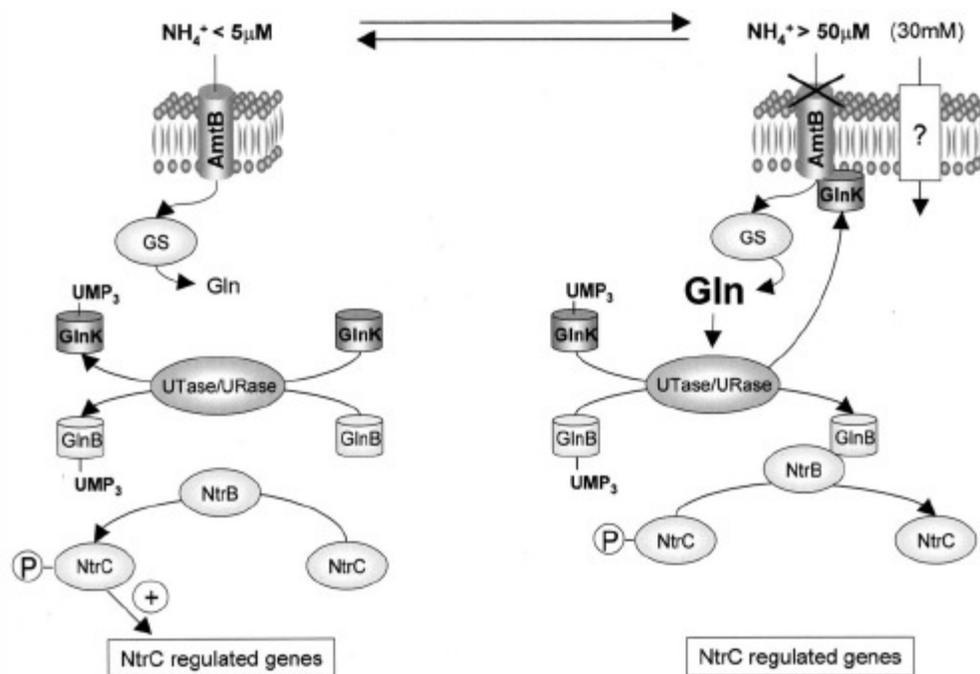


Figure 9. Modèle des fonctions de l'AmtB et GlnK dans le transport d'ammonium et son intégration dans le système Ntr d'*E. coli* (36).

4.1.3 Les activateurs NifA et AnfA

La protéine NifA est un activateur de la transcription de *nifHDK* et d'autres gènes *nif*. Elle comporte un domaine C-terminal qui lie l'ADN (63), un domaine central contient le site de liaison d'ATP (66), et un domaine N-terminal régulateur du σ^{54} . Contrairement aux autres diazotrophes, *R. capsulatus* possède deux copies de *nifA* (46), NifA1 (579 aa) et NifA2 (582 aa) qui se différencient au niveau de l'extrémité N-terminal (31,77), 19 acides aminés pour NifA1 et 22 pour NifA2. NifA1 et NifA2 stimulent la transcription des gènes *nif* en collaboration avec le facteur σ^{54} -ARN polymérase. Chez *R. capsulatus* la régulation de la fixation d'azote comporte l'activation de NifA1 et NifA2 par NtrC. Ces dernières sont toujours présentes à niveau basal dans la cellule afin de permettre une activation rapide de la transcription des gènes *nif* en cas d'épuisement de source d'azote fixé. Chez certaines bactéries diazotrophiques, dont *Klebsiella pneumoniae* et *Azotobacter vinelandii*, la transcription des gènes *nif* est aussi régulée par un deuxième régulateur, le NifL (19,64), qui inhibe l'activité de NifA par interaction directe en présence de NH_4^+ ou d'oxygène (49,63). Chez d'autres bactéries diazotrophiques, tel que *R. capsulatus*, la protéine NifA est capable de sentir directement la présence d'oxygène.

4.1.4 La régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'activité de la nitrogénase

La réduction d'une mole de N_2 nécessite 20-30 mol MgATP. Comme ce processus est très coûteux en énergie, l'activité de la nitrogénase est régulée de façon rigoureuse à plusieurs niveaux transcriptionnel et post-traductionnel (60). Chez les bactéries diazotrophiques, la transcription des gènes de fixation du nitrogène (*nif*), est faite par la protéine NifA, en combinaison avec σ^{54} -ARN polymérase (28,65). Chez *R. capsulatus*, la fixation de l'azote est régulée sur trois niveaux (18,57), au niveau transcriptionnel par le système Ntr, par une régulation de l'activité de NifA, et enfin sur un troisième niveau impliquant DraT/DraG et les protéines PII (58).

L'ajout d'ammonium dans le milieu diminue la concentration de Gln déclenchant la déuridylylation de GlnB et GlnK par GlnD. GlnK déuridylylée sera capturée par AmtB bloquant le transport de NH_4^+ à l'intérieur de la cellule (48), GlnB déuridylylée, à son tour va réprimer l'expression du promoteur Ntr en se fixant sur le domaine C-terminal de NtrB (48, 57) inhibant ainsi son activité kinase et activant son activité phosphatase (48). NtrB va déphosphoryler NtrC qui est responsable de la transcription de la protéine NifA, qui va à son tour induire l'expression de d'autres gènes *nif* (47). En cas de carence en azote fixé, la protéine GlnB est sous forme urydylylée (GlnB-UMP), ce qui l'empêche de former un complexe avec NtrB (6). Alors, NtrB s'auto phosphoryle sur le résidu H139 chez *E. coli* (H214 chez *R. capsulatus*) (15), avant de transférer le groupement phosphate à NtrC (68). Un système levure à double hybride a permis de voir que GlnK d'*E. coli* est capable d'interagir avec NtrB (86), et stimuler son activité phosphatase (8).

Les études ont montré que les protéines GlnK et GlnB sont aussi impliquées dans la régulation de l'activité de NifA. Lorsque NifA est exprimée de façon constitutive en présence de NH_4^+ , on observe une diminution de la synthèse de la nitrogénase (77). L'utilisation d'un double mutant *glnBglnK* a révélé qu'elles sont nécessaires pour cet effet, suggérant ainsi qu'elles jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de NifA1 et NifA2 par interaction directe en présence d'ammonium (18, 57,62). AnfA, protéine homologue de NifA(38), est nécessaire pour l'expression des gènes *anf* de la nitrogénase alternative. L'activité de cette dernière est inhibée en présence d'ammonium même chez le mutant *glnBglnK*. Donc, les protéines PII ne sont pas impliquées dans la régulation de l'activité d'AnfA et le mécanisme est jusqu'à maintenant inconnu (18,58).

Au niveau post-traductionnel, la régulation de la nitrogénase se fait par ADP-ribosylation qui consiste en un transfert par DraT du groupement ADP-ribose du NAD^+ à la NifH (protéine-Fe) aux résidus 101 de *R. rubrum* (81) et 102 de *R. capsulatus* (42). Cette modification empêchera l'association de la nitrogénase réductase et la dinitrogénase, par conséquent il y aura ni transfert d'électrons entre les deux sous-unités, ni hydrolyse d'ATP (67). Ce qui va engendrer une inhibition complète de courte durée de

l'activité de la nitrogénase (89) «Switch-off» (67). Ce type de régulation, «Switch-off/Switch-on» est observée chez plusieurs bactéries photosynthétiques et chimiotrophiques (26,41).

Comme cette régulation est réversible, une protéine DraG catalyse l'enlèvement du groupement ADP-ribose (85) lors de la diminution de la concentration de NH_3 , permettant ainsi le «Switch-on» de la nitrogénase. En fin, il semble que la régulation post-traductionnelle s'avère plus compliquée chez *R. capsulatus* parce que l'ajout d'ammonium induit trois réponses différentes : ADP-ribosylation de la protéine-Fe (29), « Switch-off » indépendant de l'ADP-ribosylation (99), observé chez des souches mutées au niveau de l'arginine 102 de la protéine-Fe (80), et une réponse de magnitude où la quantité de NH_4^+ ajoutée affecte le degré d'inhibition (99). Ce type de régulation semble être spécifique à *R. capsulatus*, étant donné qu'elle n'a pas été jusqu'à maintenant observée chez d'autres organismes.

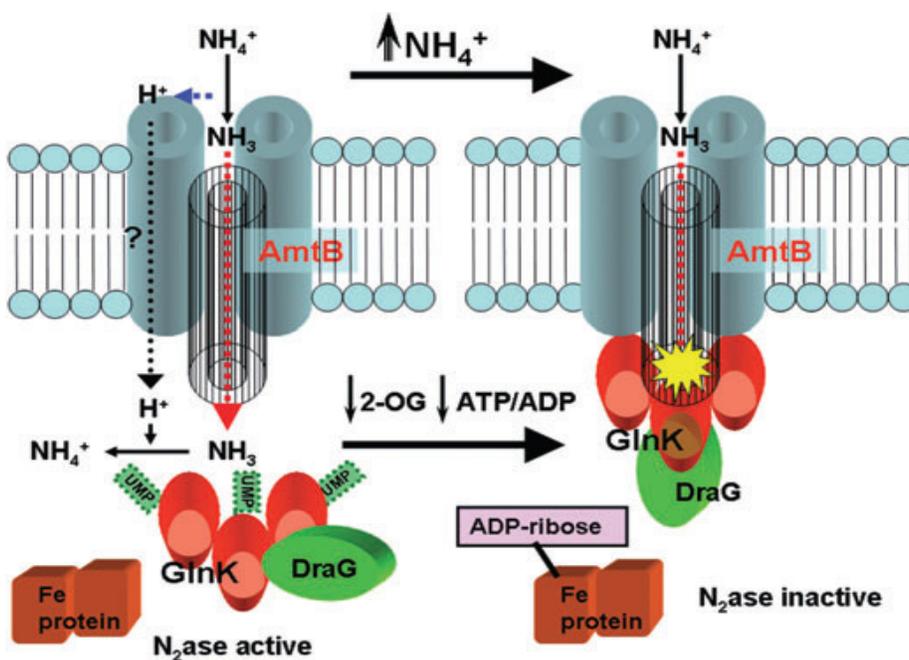


Figure 10. Régulation de la nitrogénase par séquestration membranaire de GlnK-DraG (93).

4.1.5 DraG et DraT

La présence d'ammonium dans le milieu déclenche l'ajout d'un groupement ADP-ribose du NAD^+ sur l'arginine 102 de *R. capsulatus* de NifH lui rendant inactive («Switch-off») (73,104). Cette modification est effectuée par la protéine DraT «dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase», qui est un monomère de 30 kDa (52). L'épuisement en ammonium ajouté par le métabolisme cellulaire induit l'enlèvement du groupement ADP-ribose brisant ainsi le lien N-glycosidique formé entre l'ADP-ribose et l'arginine (82). Ceci est catalysé par DraG «dinitrogenase reductase activating glycohydrolase» une enzyme monomérique de 32 kDa possédant un site actif à manganèse bi-nucléaire (85). Elle fonctionne en présence de MgATP et son substrat est la forme réduite de la dinitrogénase réductase contrairement à DraT qui modifie la forme oxyde (25).

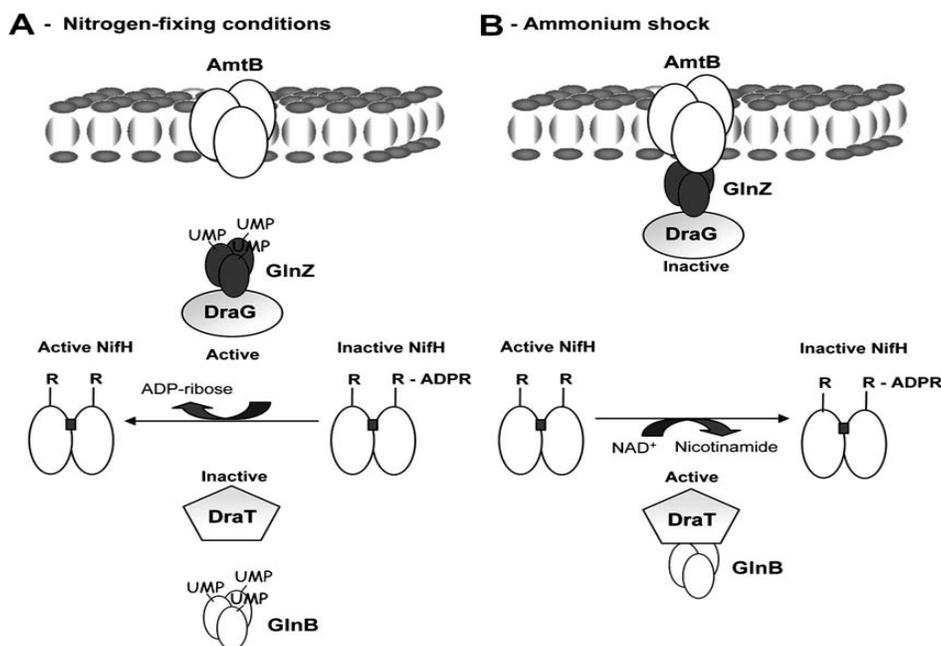


Figure 11. Modèle de la régulation de l'activité de DraT et de DraG d'*Azospirillum brasilense* en réponse à un choc NH_4^+ (33).

DraG et DraT sont exprimées de façon constitutive à partir de l'opéron *draTG* chez *R. capsulatus* ou de *draTGB* chez *R. rubrum* et *A. brasilense*, (21,56). Il a été montré que les protéines de la famille PII et Amt sont impliquées dans la régulation de l'activité de DraT/DraG chez de nombreux diazotrophes dont *R. capsulatus* et *R. rubrum*. Une mutation au niveau de GlnJ et GlnB de *R. rubrum* et GlnK, GlnB de *R. capsulatus* empêche la modification de la protéine-Fe suite à l'ajout d'ammonium ou bien en noirceur (18,105). L'activité de DraT peut être régulée par la disponibilité de NAD⁺ (74). Par conséquent chez *R. capsulatus* et *R. rubrum* la séquestration de DraG à la membrane par PII et AmtB semble être le mode de régulation de l'activité de cette protéine (32,96). Le système levure à double hybride a montré que DraT interagit avec GlnB chez *R. rubrum* (107) et chez *R. capsulatus* (78).

5. *Rhodobacter capsulatus*

La bactérie *R. capsulatus*, appartient à la famille des α -protéobactéries, est une bactérie pourpre non sulfureuse, Gram (-) non pathogène (91). Elle est sous forme bacille, mais souvent organisée en zigzag (95). Elle possède plusieurs modes de croissance sous différentes conditions, soit en anaérobiose avec présence de lumière ou bien en noirceur avec présence d'oxygène. Elle peut produire des bactériocines ainsi que s'engager dans des recombinaisons génétiques (97). Ses propriétés font d'elle un organisme modèle pour plusieurs études.

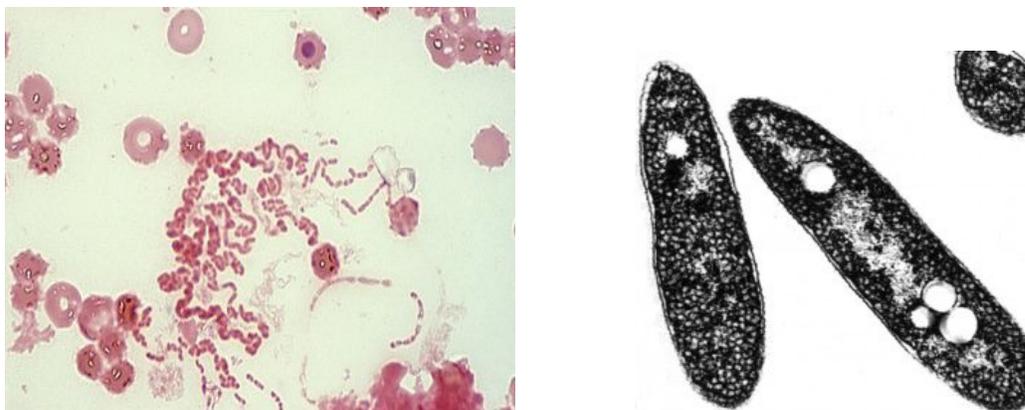


Figure 12. La bactérie photosynthétique pourpre *Rhodospirillum rubrum*.

(Figure tirée de www.iet.uni-duesseldorf.de/Photobiotechnology
microbewiki.kenyon.edu/index.php/Rhodospirillum).

La bactérie *R. capsulatus* se développe à température de 30°C (95), utilisant plusieurs sources de carbone telle que les sucres, le pyruvate et les acides dicarboxylique dont le lactate qui a été révélé comme la source de carbone la plus favorisé. Il a été révélé que toutes les souches de *R. capsulatus* sont sensibles à la streptomycine (200 ug/ml), kanamycine (50 ug/ml) et la néomycine (50 ug/ml) (97).

6. Projet de recherche

Des études précédentes sur une série de variantes d'AmtB de *R. capsulatus* ont montré le rôle et l'implication de ces résidus dans la régulation de l'activité de la nitrogénase. Des mutations au niveau des acides aminés hautement conservés ont donné des effets différents. Une mutation au niveau de D185 a donné une souche avec un taux de transport d'ammonium réduit mais quand même capable de former le complexe GlnK-AmtB. De l'autre côté, chez le double mutant D334/D335 il avait une diminution du transport de méthylammonium mais cette fois avec une absence de formation du complexe GlnK-AmtB et donc l'abolition complète de l'ADP-ribosylation et le « Switch-off » de la nitrogénase.

Mon travail consistait à étudier le rôle et la participation de d'autres résidus conservés de la protéine AmtB dans la régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche *R. capsulatus*. Les mutants ont été créés par mutagenèse dirigée par PCR, le dosage de l'activité de la nitrogénase a été réalisé par CPG, et l'état de la modification de la protéine-Fe (ADP-ribosylation) a été analysé par western-blot avec des anticorps spécifiques. En deuxième lieu, nous avons essayé de démontrer la séquestration de la protéine GlnK au niveau membranaire, en effectuant une séparation des compartiments cellulaire suivi par immunobuvardage.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

1. Plasmides et souches bactériennes

Les différentes souches et plasmides qui ont été utilisés et construits dans ce projet sont listés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau I. Caractéristiques des souches bactériennes.

Souches	Caractéristiques	Références
<u>E. coli</u>		
DH5 α	$\emptyset 80dlacZ\Delta M15$ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>recA endA hsdR supE</i>	GIBCO-BRL
S17.1	RP4-2 (Tc :: Mu) (Km :: Tn7) intégré dans le chromosome	Simon et al., 1983
<u>R. capsulatus</u>		
SB1003	Rif ^r ; souche sauvage	Yen et Marrs., 1976
RCAY63	<i>amtB</i> :: Km ^r	Yakunin., 2002
RCIA1	RCAY63 portant pIA1	Cette étude
RCIA2	RCAY63 portant pIA2	Cette étude
RCIA3	RCAY63 portant pIA3	Cette étude
RCIA4	RCAY63 portant pIA4	Cette étude

Tableau II. Caractéristiques des différents plasmides

Plasmides	Caractéristiques	Références
pMECA	Ap ^r , SCM dans <i>lacZ</i> , (286 pb)	Thomson J.M., 1998
pJB3Tc20	Ap ^r , Tc ^r , Vecteur conjugaison navette (7069pb)	Blatny J.,1997
pAY98	Ap ^r , Rc <i>glnKamtB</i> (2,4Kb), dans pMECA aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Yakunin A., 2000
pIA1	Ap ^r , Tc ^r , <i>amtBD338A</i> (2,3Kb) dans pJB3Tc20 aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Cette étude
pIA2	Ap ^r , Tc ^r , <i>amtBG367C</i> (2,3Kb) dans pJB3Tc20 aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Cette étude
pIA3	Ap ^r , Tc ^r , <i>amtBH193E</i> (2,3Kb) dans pJB3Tc20 aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Cette étude
pIA4	Ap ^r , Tc ^r , <i>amtBW237A</i> (2,3Kb) dans pJB3Tc20 aux sites <i>PstI/EcoRI</i>	Cette étude

2. Culture bactérienne

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées dans du LB avec antibiotiques appropriés dans des conditions d'aérobiose à 37°C/24h sous agitation, dans l'agitateur G24 (environmental incubator shaker, New-Brunswick Co., Inc). Les souches de *R. capsulatus* ont été cultivées dans des tubes vissés de 17 ml remplis de YPS ou

RCV+30mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^+$, en condition anaérobie à 30°C en présence de lumière, dans l'incubateur Biotronette mark III environmental chamber (Labline instruments) munie par des ampoules de 150W. En suite les cultures de *R. capsulatus* ont été transférées dans 17 ml de RCV sans ammonium. Ce dernier est un milieu sans source d'azote, et contient du lactate comme source de carbone. Les tubes étaient incubés à 30°C toujours dans des conditions d'anaérobies et en présence de lumière.

3. Extraction de l'ADN plasmidique (mini-préparation)

C'est une technique de purification, qui permet d'isoler un plasmide à partir d'une culture bactérienne, qui sera utilisé par la suite dans plusieurs expériences. Elle peut être réalisée à l'aide d'un kit commercial ou bien par méthode chimique.

En premier lieu, une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes a été faite, ensuite 100 µl de TEG (25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, et 50 mM glucose) et 200 µl de SDS/NaOH (0,2N NaOH et 1% de SDS), ont été ajoutés au culot, le tout a été mis sur glace pendant 5 minutes. 150 µl de potassium acétate + acide acétique (5M potassium acétate+ acide acétique +H₂O pH 4,8) ont été ajoutés au culot et mélangés jusqu'à l'apparition d'un caillot. Suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm, le surnageant qui contient l'ADN purifié a été par la suite récupéré et précipité avec 900 µl d'éthanol 100%, et centrifugé à 13000 rpm pendant 15 minutes. Un deuxième lavage avec de l'éthanol 70% a été effectué, puis le culot a été séché à l'air libre pendant 20 minutes. Avant d'être resuspendu dans 30 µl de H₂O stérile contenant de la RNAase A (5 µg/ml), et laisser 15 minutes à température de pièce. Ensuite 220 µl d'H₂O, 25 µl de sodium acétate 3M et 550 µl d'éthanol 100% ont été ajoutés au mélange et incubés à -20°C. Après 30 minutes d'incubation le mélange a été centrifugé pendant 10 minutes à 13 000 rpm. Le culot a été séché à nouveau à l'air libre pendant 5 minutes puis dans un «Speed-Vacuum», avant de le resuspendre dans 40 µL d'eau distillée. Cela représente le plasmide qui peut être utilisé directement ou stocké à -20°C.

Tableau III. Les amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée

Mutant	Nom des amorces	Séquences 5'-3'
D338A	PhusD338AI	5'-ACGACAGCCTGGCCGTGTTTCGGCGT-3'
	PhusD338AII	3'CGTATTTGAACATC <u>GCC</u> TTACCTTGGTGA-5'
G367C	RcAmtBG367CI	5'-GGCGTGCATTGCATCGGCGGGATCGTCG-3'
	RcAmtBG367CII	3'-GCCGAT <u>GCA</u> ATGCACGCCGAACACGTCC-5'
H193E	RcAmtBH193E	5'-TGATCCC GCGTTGAT <u>TTC</u> CACCACGGT-3'
	RcAmtBH193reverse	3'-CCGGTCTGATGGCGGGCGATCGTTC-5'
W237A	RcAmtBW237A	5'-TTGAAGCCGAATGCGCCGACCCAGA-3'
	RcAmtBW237reverse	3'-CGCCGGGTCCAACCTTGAGGCGACCTC-5'

- Les amorces ont été fabriquées par la compagnie alpha DNA, et ont été purifiées par PAGE.

4. Mutagenèse dirigée par PCR

La mutagenèse dirigée est une technique largement utilisée dans l'étude des gènes et des protéines, permet d'effectuer des mutations ponctuelles, des insertions et des délétions dans n'importe quel type d'ADN plasmidique. Plusieurs enzymes ont été utilisées dont la Pfu produite dans le laboratoire de Dr Patrick Hallenbeck mais sans résultats, donc on a opté pour la Phusion High-Fidelity (FINNZYMES) DNA Polymérase qui permet l'amplification de grands plasmides jusqu'à 10 Kb tout en réduisant les mutations secondaires indésirables. Grâce à cette enzyme on a pu obtenir notre produit de PCR qui contient la mutation désirée. La réaction a été effectuée en 30 cycles comprenant une période de dénaturation initiale de 30 secondes à 98°C une autre dénaturation à 98°C/10 secondes une phase d'extension de 30 secondes à 65-72°C et une extension finale de 10 minutes à 72°C. La réaction de PCR contient du dNTPs, de l'ADN

plasmidique, et deux amorces dont une contient la mutation voulue. Du DMSO a été ajouté à la réaction, à cause de la richesse des amorces en C+G, vue sa propriété de solubilisation.

Le tout a été mis dans le thermocycleur Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer). Ensuite le produit a été digéré avec du *DpnI* afin de couper les séquences méthylées puis cloné dans le vecteur navette pJB3Tc20. Tout ça est dans le but d'obtenir des souches mutantes RCIA1, RCIA2, RCIA3 et RCIA4 au niveau de 4 résidus différents de la protéine AmtB. D338A (acide aspartique remplacé par alanine à la position 338 qui est impliqué dans le réarrangement d'AmtB lors de son interaction avec GlnK) G367C (glycine à la position 367 a été remplacé par une cystéine ce dernier est impliqué dans le transport), H193E (aussi impliqué dans le transport dont la histidine à la position 193 a été remplacé par l'acide glutamique) et enfin W237A (le tryptophane à la position 327 a été remplacé par une alanine, comme il a été révélé que chez *E. coli* une mutation au niveau de ce résidu provoque une augmentation du transport d'ammonium).

5. Digestion

Les digestions enzymatiques ont été réalisées par des enzymes de restriction spécifiques pendant 1h à 37°C suivie d'une étape de chauffage de 20 minutes à 70°C qui sert à arrêter l'activité enzymatique. D'autres digestions ont été réalisées pour les produits de PCR avec l'enzyme *DpnI* dont le but est de digérer les séquences méthylées.

6. Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose

Après avoir migré les échantillons sur gel d'agarose de 0,8% pendant 1h à 60-100V grâce à l'appareil OWL Easycast B1A (Thermo Scientific) et en utilisant comme marqueur le Gene Ruler 1Kb DNA ladder de (Fermentas), la bande correspondant à la bonne taille a été découpée du gel et mise dans des tubes eppendorfs, suivie d'une purification de la bande par le kit «Gel extraction» (Qiagen) et stocker à - 20°C.

7. Ligation

On a eu recours à deux méthodes différentes à cause des problèmes qu'on a rencontré lors des expériences. On n'a pas pu avoir un produit de ligation, et jusqu'à maintenant on n'a pas pu détecter la cause. La première consiste à migrer les échantillons sur gel Seaplaque 0,7% sans ajouter du bromure, le but c'est que le gel fond à température élevée et peut être utilisé dans le mélange de ligation. Après migration et extraction, la purification de la bande se fait par une dialyse afin d'éliminer le reste du tampon TAE par l'ajout de 1 ml d'eau et incubation à température de pièce. Après 15 minutes l'eau sera enlevée, suivie d'une incubation de 10 minutes à 70°C afin de faire fondre le gel sans détruire l'ADN.

Une concentration de 0,1 à 5 ug d'ADN a été utilisée pour la ligation, pour un total final de 50 ul. Par la suite une incubation à 16°C pendant toute la nuit a été effectuée dans le Microcooler. La deuxième méthode consiste à liguer un fragment d'ADN dans un vecteur après sa digestion avec des enzymes de restriction appropriées, un ratio de 4 :1 (insert-vecteur) a été utilisé. La réaction de ligation a été faite à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase d'(Invitrogène), pendant toute la nuit à 16°C.

8. Séquençage

Le séquençage a été effectué à l'institut de recherche en immunologie et cancérologie (IRIC).

9. Clonage d'*amtBD338A*, *amtBH193E*, *amtBG367C*, et *amtBW237A* dans pJB3Tc20

Ces fragments d'ADN contenant la mutation désirée ont été obtenus par mutagenèse dirigée à partir du plasmide pAY98 (*amtBglNK*). Ils ont été clonés dans le vecteur navette pJB3Tc20 aux sites *PstI/EcoRI* pour avoir pIA1, pIA2, pIA3 et pIA4

suivie d'une transformation dans les cellules compétentes DH5 α et en suite dans les cellules de conjugaison S17.1.

10. Préparation des cellules compétentes

Le traitement au chlorure de calcium avec un choc au froid, est la technique la plus utilisée pour rendre les cellules DH5 α d'*E. coli* compétentes. En premier lieu une culture de 25 ml des cellules DH5 α a été mise à 37°C toute la nuit. Le lendemain une dilution 1/50 à partir de la culture de nuit a été effectuée suivi par une incubation à 37°C. Lorsque la DO₆₀₀ a atteint 1,0, les cellules ont été centrifugées 15 minutes à 4°C. Puis resuspendues dans du CaCl₂ 0,1M froid et conservées 10 minutes sur glace, avant d'être centrifugées pour une deuxième fois et resuspendues dans 200 ul de CaCl₂. Finalement les cellules peuvent être utilisées directement ou conservées à -80°C.

11. Transformation chimique

La transformation est une méthode qui consiste à introduire de l'ADN plasmidique dans les cellules compétentes. La transformation a été effectuée dans *E. coli* (DH5 α) pour le stock et le clonage ainsi que dans S17.1 pour la conjugaison. 10 ul d'ADN après ligation ou 1 ul d'ADN plasmidique après PCR ont été ajoutés à 100 ul de cellules compétentes et incubées 15 minutes sur glace. Ensuite un choc thermique de 90 secondes à 42°C a été fait suivie d'une incubation de 2 minutes sur glace. 600 ul de LB ont été ajoutés avant de mettre le tout sous agitation pendant 1h à 37°C. Après une centrifugation de 1 minute, les cellules ont été resuspendues dans 100-200 ul de LB, et étalées sur pétri LB avec antibiotiques appropriés, puis incubées à 37°C pendant 24h. Une colonie ou plusieurs ont été par la suite inoculées dans un tube de LB plus antibiotique et incubées à 37°C. Le lendemain les cultures ont été congelées dans du glycérol à -80°C, pour conservation ou bien utilisées pour extraire le plasmide qui sera par la suite utilisé dans d'autres expérimentations.

12. Conjugaison

Les plasmides de cette étude ont été transférés par conjugaison dans la souche RCAY63 de *R. capsulatus* après leur transformation dans S17.1. Les transformants ont été cultivés dans du LB plus antibiotique jusqu'à une DO600 de 1,0. Les souches de RCAY63 ont été mises en culture dans du YPS ou RCV+30 mM d'ammonium toujours en présence d'antibiotique approprié. Par la suite un mélange de 50 ul de chaque culture a été effectué puis étalé sur 2 cm² d'une boîte de pétrie YPS sans antibiotique et incubé à 30°C. Après une nuit d'incubation le mélange a été récupéré et resuspendu dans 1 ml de RCV puis étalé sur pétri RCV+antibiotiques, et cultivé dans une jarre anaérobie à 30°C en présence de lumière pendant quelques jours jusqu'à l'apparition de colonies brunes. Ces dernières ont été par la suite transférées dans du YPS ou RCV+30 mM ammonium et cultivées dans les mêmes conditions pour la congélation ou pour effectuer les tests désirés dont le dosage de l'activité de la nitrogénase.

13. Dosage de l'activité de la nitrogénase

C'est une expérience qui permet de déterminer l'état de la nitrogénase. Le dosage se fait par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec l'appareil Gas Chromatograph GC-8A (Shimadzu). Les cultures de *R. capsulatus* SB1003, RCIA1, RCIA2, RCIA3 et RCIA4 ont été parties dans un milieu riche YPS ou bien RCV+30 mM NH₄⁺ puis transférées dans du RCV sans NH₄⁺. De l'argon a été ajouté à des flacons vides de 25 ml pendant 10 minutes. Par la suite 5 ml de la culture ont été ajoutés à l'une des flacons avec une seringue et du NH₄Cl 10 mM dans l'autre. La culture a été incubée pendant 15 minutes dans un bain agitant éclairé et maintenu à 30°C. 2 ml d'acétylène produit à partir de calcium carbide ont été ajoutés à la culture à l'aide d'une seringue, après 5 minutes, 50 ul de la phase gazeuse de la culture anaérobie ont été prélevés et injectés au niveau de la CPG. Ceci a été répété chaque 5 minutes. Après 20 minutes, 100 ul de NH₄Cl (10 mM) ont été ajoutés, afin de voir son influence sur l'activité de la nitrogénase. La réduction d'acétylène en éthylène a été représentée dans le

chromatographe par des pics et la quantité d'éthylène produit en nmole a été calculée à partir de l'équation suivante : Hauteur du pic en mm x atténuation x 4,2

14. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et transfert

L'électrophorèse est une technique utilisée en biologie moléculaire pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire grâce au détergeant SDS. Elle était réalisée grâce à l'appareil Mini trans-Blot cell (Bio-Rad). La séparation des protéines a été faite sur un gel de polyacrylamide de 15%, en utilisant le marqueur «Prestained Protein Marker Broad Range» (Biolabs). 100 ul d'échantillon plus 50 ul de tampon d'échantillon SDS(X3) ont été mélangés et incubés pendant 5 minutes à 100°C avant d'être migrés pendant 1 h à 200V, suite à l'ajout du tampon d'électrophorèse qui est composé de Tris 4 mM, de la glycine 39 mM et du 0,1% SDS. En suite, un transfert des protéines du gel d'électrophorèse a été effectué sur membrane de PVDF après son émergence dans du méthanol. L'électroélution a été faite dans l'appareil «Migration Gene Power Supply GPS 200/400» dans du tampon contenant 20% de méthanol, du Tris 4 mM et de la glycine 39 mM à 16V toute la nuit.

15. Hybridation avec des anticorps

La membrane de PVDF sur la quelle les protéines ont été transférées, a été incubée avec des anticorps spécifiques à la protéine en étude, en passant par différentes étapes. La membrane a subi en premier lieu un lavage avec du TBST pendant 5 minutes, ensuite bloquée dans du TBST avec 5% de lait en poudre (solution de blocage) 30 min avant d'être lavée à nouveau 2 fois avec du TBST. Ceci a été suivie par une incubation dans le premier anticorps, l'IgG de lapin anti-RcGlnK ou anti-RcFe dilué 1/5000 dans la solution de blocage pendant 2 h, poursuivie de deux lavages toujours avec du TBST afin d'éliminer les anticorps non liés. Finalement 25 ml d'anticorps secondaire IgG-HRP (horse radish peroxidase couplé à l'IgG) de chèvre anti IgG de lapin, dilué 1/25000 ont été ajoutés à la membrane pendant 1 h 30 minutes, suivie de deux lavages dans du TBST et un dans du TBS.

16. détection de la protéine

La détection des protéines fixées sur la membrane PVDF a été faite grâce au kit «Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate» de (Thermo-Scientific), qui a été ajouté sur la membrane pendant une minute. Ensuite l'excès a été retiré à l'aide du papier Whatman. La membrane a été enveloppée par la suite dans une pellicule plastique, et déposée dans une cassette. Une exposition de 5 minutes ou plus selon la nature de la protéine du film BioMax (Kodak) a été réalisée. Finalement le film a été inséré dans le développeur, dans la chambre noir.

17. Fractionnement cellulaire

Cette technique a pour but de vérifier la présence de la protéine GlnK au niveau de la membrane suite à un choc d'ammonium, et cela a été effectué pour les différentes souches de *R. capsulatus* SB1003, RCIA1, RCIA2, RCIA3 et RCIA4. Les cultures ont été parties dans du RCV+30 mM ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^+$ et incubées à 30°C dans des conditions d'anaérobie en présence de lumière. Le lendemain, les cultures ont été transférées dans du RCV sans ammonium dans des bouteilles de 310 ml et incubées dans les mêmes conditions. Après 24 h, 1 mM de NH_4Cl a été ajouté dans une des deux bouteilles à l'aide d'une seringue étanche et incubées pendant 15 minutes, suivie d'une autre incubation de 5 minutes mais sur glace, en présence de lumière. Les cellules ont été centrifugées à 10 000 rpm pendant 30 minutes, le culot a été resuspendu dans 10 ml de tampon Sodium-Phosphate et soniqué 6x durant 30 secondes à une amplitude de 39%. Une autre centrifugation à 14 000 rpm pendant 30 minutes a été faite. Le surnageant récupéré a subi une centrifugation à une vitesse de 52 000 tours/minutes pendant 30 minutes dans une centrifuge de haute vitesse (Beckman). Le premier ml du surnageant a été récupéré comme fraction cytoplasmique et conservé à - 80°C. Le culot résiduel a été resuspendu dans 10 ml de tampon Sodium-Phosphate et centrifugé à nouveau à 52 000 tours/minutes durant 30 minutes, finalement le culot obtenu a été resuspendu de nouveau dans 1 ml du tampon, ceci correspondant à la fraction membranaire. La concentration

protéique des deux fractions a été déterminée, par le dosage de Bradford par spectrométrie «Milton Roy compagny spectronic 20D».

CHAPITRE III
RÉSULTATS

ÉTUDE DU RÔLE DE LA PROTÉINE MEMBRANAIRE AmtB DANS LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DE LA NITROGÉNASE

1. Création des mutants au niveau des résidus de la protéine AmtB

Les mutations au niveau des différents acides aminés de la protéine AmtB de *R. capsulatus* ont été obtenues par PCR. Un ou deux acides aminés ont été remplacés afin de créer les mutants désirés dans les parties conservées du gène *amtB*, qui se trouve sur le même opéron que GlnK (*amtBglnK*). L'amplification a été réalisée en utilisant comme source d'ADN le plasmide pAY98, qui comporte l'opéron au complet *amtBglnK* (voir Tableau II), (contenant les gènes *glnK*, *amtB*), et les deux amorces spécifiques pour chaque mutant dont une contient le site de mutation désiré ainsi que les sites d'*EcoRI* et *PstI*. Suite à une digestion avec les enzymes de restrictions *EcoRI* et *PstI*, le fragment obtenu de 2,3 Kb a été cloné dans le vecteur de conjugaison pJB3Tc20 donnant pIA1 (D338A), pIA2 (G367C), pIA3 (H193E) et pIA4 (W237A). Les plasmides produits ont été conjugués dans la souche de *R. capsulatus* RCYA63 (Δ *amtB*) à partir de la souche de conjugaison S17.1 d'*E. coli*, donnant respectivement les souches suivantes: RCIA1, RCIA2, RCIA3 et RCIA4.

La figure 13 représente les produits d'amplification issus de PCR pour chaque mutant créés. Dans la plupart des cas, le PCR n'a donné que le produit désiré, mais à la figure 13C, qui représente le produit de PCR du mutant H193E, on peut observer plusieurs bandes de taille inférieure. Dont on ignore la raison de leur apparition, on peut supposer qu'elles représentent des amplifications non spécifiques.

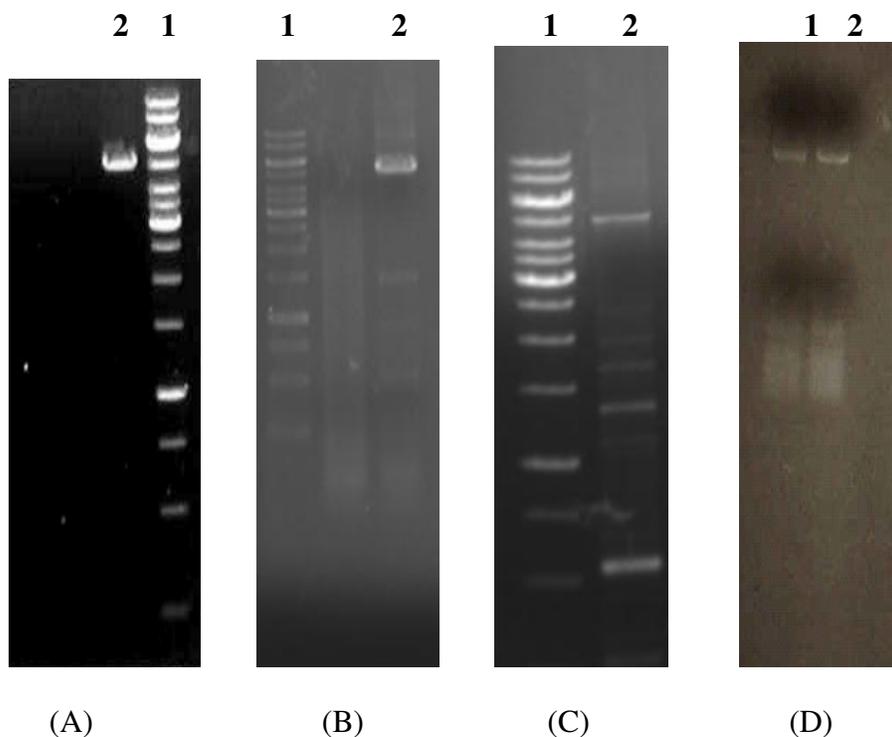


Figure 13. Fragment d'*amtB* de *R. capsulatus* muté respectivement au niveau du résidu D338 (A) du résidu G367 (B) du résidu H193 (C) et du résidu W237 (D).

Puit 1 : Marqueur « Gene Ruler 1Kb DNA ladder ».

Puit 2 : le produit de PCR contenant la mutation au niveau de l'*AmtB*.

2. Régulation de l'activité de la nitrogénase

La régulation de l'activité de la nitrogénase a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse pour les souches mutantes RCIA1(D338A), RCIA2(G367C), RCIA3(H193E) et RCIA4 (W237A) et comparé à la souche sauvage (SB1003) suivant les étapes décrites dans la section 13 de matériel et méthodes. Les souches ont été cultivées pendant 24 h dans du RCV + ammonium en anaérobie à 30°C en présence de

lumière, puis 1 ml de cette culture a été inoculé dans du RCV sans ammonium et incubée 24 h de plus dans les mêmes conditions pour permettre la synthèse de la nitrogénase. Un prélèvement de 50 μ l de la phase gazeuse a été effectué chaque 5 minutes et injecté dans la CPG. Après 20 minutes d'incubation, du NH_4Cl (10 mM) a été ajouté à la culture afin de vérifier son influence sur l'activité de la nitrogénase. La quantité d'éthylène produit par réduction de l'acétylène donne un indice sur la capacité de fixation d'azote in vivo.

Un résultat typique pour la souche sauvage, montrant l'effet du « Switch-off » est montré à la figure 14. On peut remarquer suite à l'ajout de NH_4Cl , une inhibition de l'activité de la nitrogénase pendant quelques minutes, qui reprend son activité normalement après l'épuisement de la source d'azote ajouté, ce qui signifie que la régulation de l'enzyme est réversible.

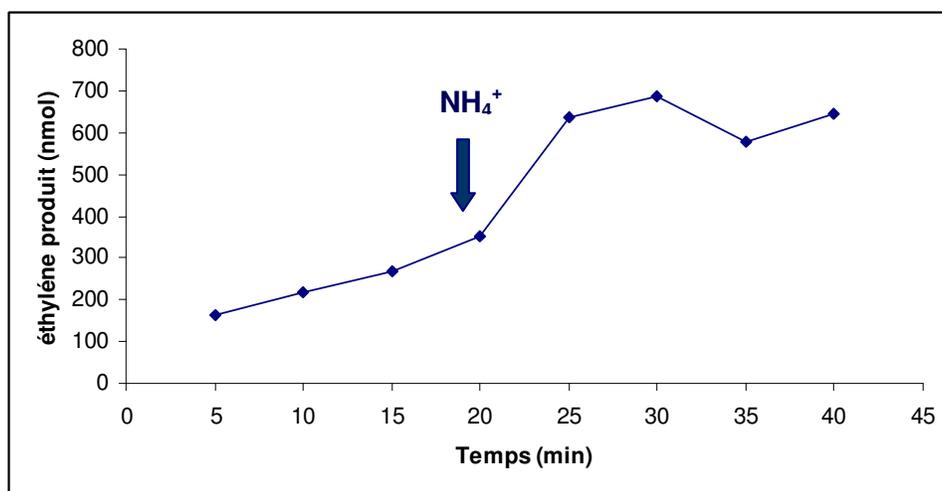


Figure 14. Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche sauvage SB1003 de *R. capsulatus*.

En ce qui concerne RCIA1 (D338A) qui est représentée par la figure 15, on observe la même chose que chez la souche sauvage c'est-à-dire une inhibition de l'activité de la nitrogénase suite à l'ajout de NH_4Cl dans le milieu.

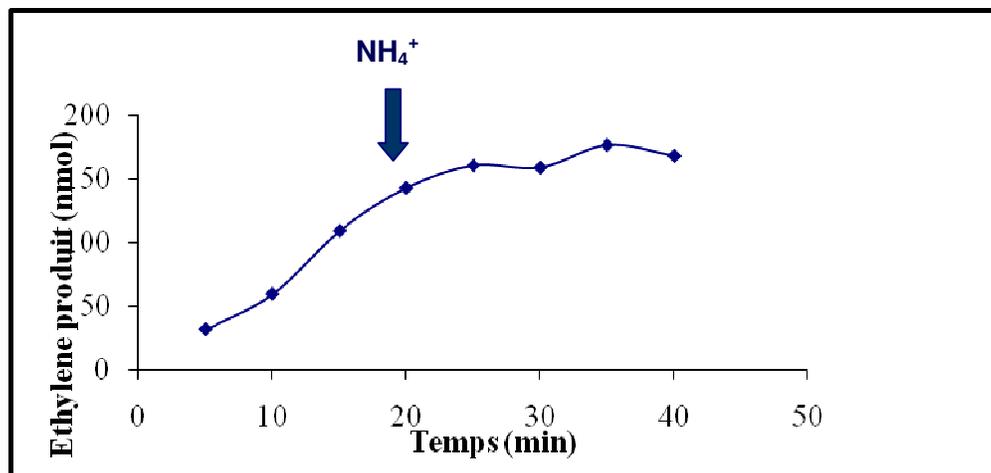


Figure 15. Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA1.

Par contre pour les souches RCIA2 (G367C), RCIA3 (H193E) et RCIA4 (W237A) qui sont représentées respectivement par les figures 16, 17 et 18, on remarque une pente linéaire continue, ce qui explique que la quantité d'éthylène produit augmente avec le temps et l'ajout de NH_4Cl ne perturbe pas cette production, ce qui nous mène à supposer l'absence de la régulation de la nitrogénase chez ces souches mutantes.

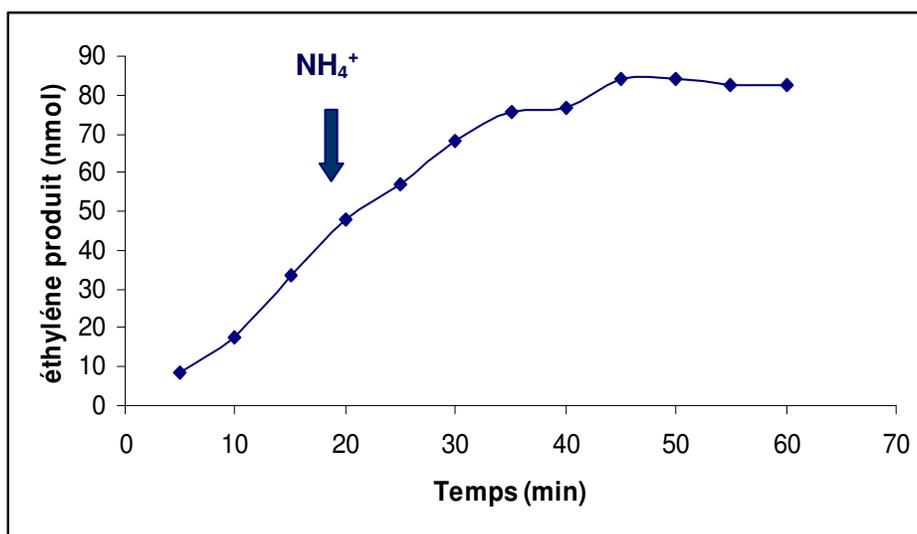


Figure 16. Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA2.

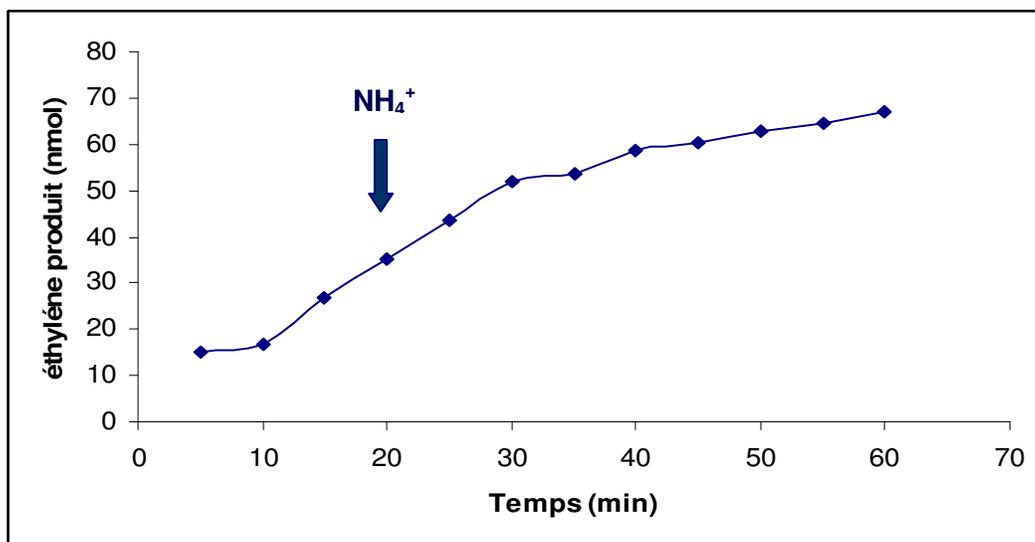


Figure 17. Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA3.

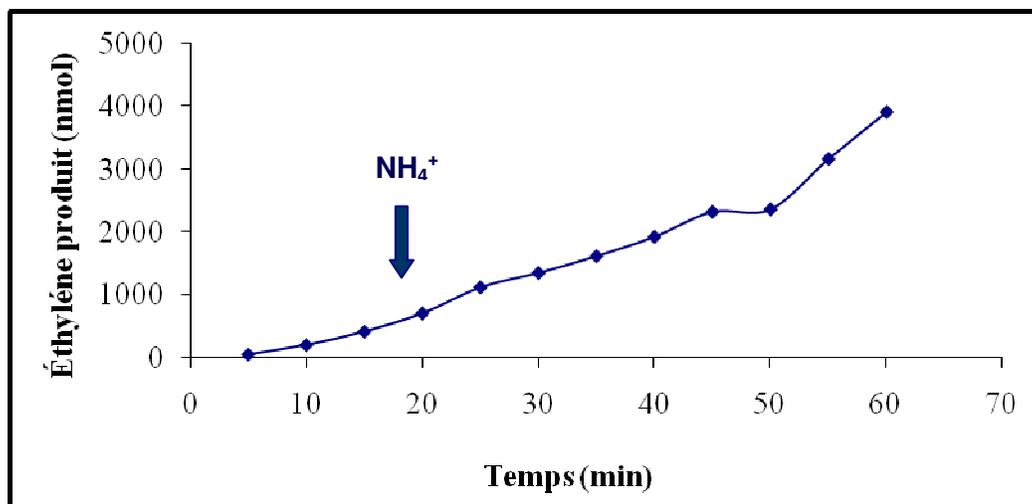
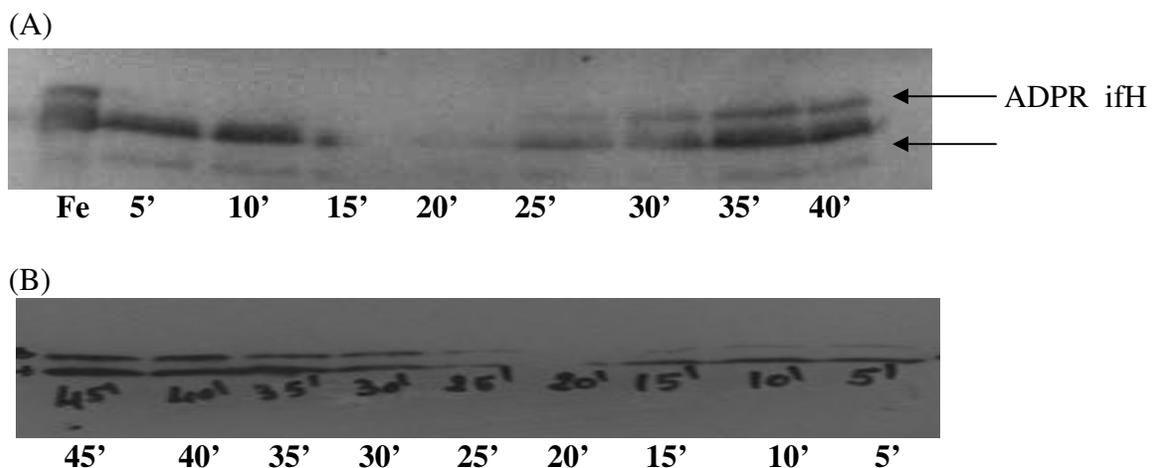


Figure 18. Régulation de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA4.

3. Modification de la protéine-Fe par ADP-ribosylation

Afin de vérifier la modification de la protéine-Fe de la nitrogénase, la phase liquide des différentes souches SB1003, RCIA1, RCIA2, RCIA3 et RCIA4 qui a servi à faire le dosage de l'activité de la nitrogénase, a été prélevée chaque 5 minutes et mis directement dans du tampon SDS. Ces échantillons ont été par la suite migrés sur gel SDS-PAGE puis transférés sur membrane PVDF pendant toute la nuit. La révélation a été faite par Western-blot en utilisant des anticorps spécifiques anti-Fe, et on a utilisé comme contrôle la protéine-Fe selon le protocole décrit dans les sections 15-16 du matériel et méthode.

Pour la souche sauvage et RCIA1, une nette modification de la protéine-Fe a été apparue après 20 minutes, c'est-à-dire après l'ajout de NH_4Cl dans le milieu. Cette différence observée est due à l'ajout d'un groupement ADP-ribose sur un des sous unités. Une modification de la protéine-Fe a été observée avant et après l'ajout de l'ammonium, malgré l'absence du «Switch-off», chez les souches mutantes RCIA2 et RCIA3. Par contre pour la souche RCIA4, aucune modification n'a été observée au niveau de la protéine-Fe, ni avant ni après l'ajout de NH_4Cl .



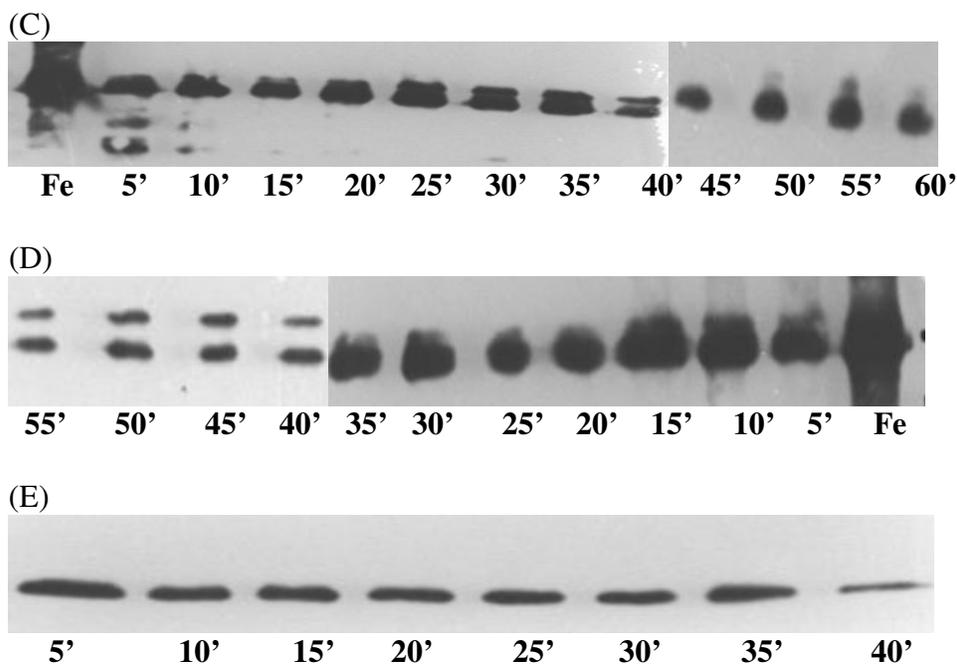


Figure 19. ADP-ribosylation de la protéine-Fe chez les souches de *R. capsulatus* (A) SB1003 (B) RCIA1 (C) RCIA2 (D) RCIA3 et (E) RCIA4.

4. Étude de la formation du complexe GlnK-AmtB

Pour déterminer la présence de la protéine PII (GlnK) au niveau de la membrane, on a réalisé une séparation des compartiments cellulaires des différentes souches de *R. capsulatus* suivant la méthode décrite dans la section 17 du matériel et méthode. Les échantillons ont subi une électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 15% avec SDS suivi d'un transfert sur membrane PVDF, et détection par des anticorps spécifiques anti-GlnK. Pour la souche sauvage, on a pu détecter la présence de la protéine GlnK au niveau membranaire après l'ajout de NH_4Cl comparativement à celle sans ammonium où GlnK se trouve localisée seulement au niveau cytoplasmique. Par contre en ce qui concerne les autres souches mutantes, aucune bande n'a été détectée dans aucun compartiment. Suite à plusieurs essais avec différents aliquotes d'anticorps et en changeant même certains paramètres, aucun résultat n'a été obtenu. Ce qui nous mène à conclure qu'il y a un problème au niveau de l'anticorps lui-même.



M: Membrane
C: Cytoplasme

Figure 20. Détection de la protéine GlnK au niveau de la membrane suite à l'ajout de NH₄⁺ chez la souche sauvage SB1003 de *R. capsulatus*

CHAPITRE IV
DISCUSSION

De nos jours, il y a un grand intérêt pour l'obtention d'une production agricole saine et abondante. La fixation de l'azote diatomique peut jouer un rôle important dans ce processus étant donné que l'azote fixé est souvent limitant pour la production des aliments. Donc, une bonne compréhension de la régulation de ce phénomène permettra d'améliorer d'avantage la condition humaine, avec une augmentation des ressources alimentaires, tout en respectant l'aspect environnemental.

Sur ce fait, on est intéressé à mieux comprendre le rôle et l'importance de certaines protéines, dont la protéine AmtB, dans la régulation de la fixation d'azote, et cela par la création des mutants au niveau des acides aminés supposés nécessaires et impliqués dans ce processus. Il a été montré que l'ajout de NH_4^+ à une culture de *R. capsulatus* conduit à la formation du complexe GlnK-AmtB. L'augmentation de la concentration intracellulaire en glutamine provoque la déuridylylation de GlnK, qui sera capturée par AmtB (36). Yakunin et Hallenbeck ont montré en 2002 que la protéine AmtB est nécessaire pour induire le « Switch-off », et l'ADP-ribosylation de la nitrogénase chez *R. capsulatus* en présence de NH_4^+ .

Des études de mutagenèse dirigées sur différents résidus conservés, nous a permis de construire une série de variants d'AmtB de *R. capsulatus*, afin de vérifier les effets de ces mutants sur la régulation de l'activité de la nitrogénase, la formation du complexe GlnK-AmtB, et l'ADP-ribosylation de NifH (protéine-Fe). Vue les études précédentes qui ont montré, une modification nette de la protéine-Fe avec un Switch-off de l'activité de la nitrogénase chez le double mutant D334/D335. On a donc muté l'acide aminé voisin hautement conservé, le D338 (figure 15). Les résultats démontrent une régulation similaire à celle du type sauvage (figure 14), avec un « Switch-off » observé suite à l'ajout de NH_4^+ , ce qui signifie que le résidu D338 n'est pas impliqué dans la régulation de l'activité de la nitrogénase.

Des études précédentes sur le mutant AmtB H193E, ont montrées qu'il est incapable de transporter le NH_4^+ (92), ce qui suggère son importance et son implication

dans le transport d'ammonium. Donc a soupçonné que cette mutation au niveau de l'AmtB de *R. capsulatus*, affectera la régulation de l'activité de la nitrogénase.

Chez notre mutant RCIA3 (AmtB H193E), aucun « Switch-off » n'a été observé suite à l'ajout de NH_4^+ , ce qui suggère que ce dernier est important et requis dans le transport comme il a été montré auparavant, ainsi que dans la formation du complexe GlnK-AmtB, et par conséquent dans la régulation de la nitrogénase. Des expériences sur le transport d'ammonium avec ce mutant, par dosage du transport de méthylammonium marqué, ont été faites et répétées plusieurs fois, mais malheureusement aucun résultat concret n'a été obtenu.

La création de d'autres mutants au niveau de la protéine AmtB, permettra d'éclaircir d'avantage le processus de régulation de la nitrogénase, et l'intervention de certains résidus dans ce dernier. Pour cela, on a introduit des mutations au niveau de certains résidus conservés, dont le G367 de *R. capsulatus*, ou la glycine à la position 367 a été remplacé par une cystéine donnant la souche RCIA2, des études précédentes ont montré l'implication de ce résidu dans le transport d'ammonium (10). Une substitution au niveau de la glycine à la position 349 de Mep2 de *Saccharomyces cerevisiae*, a donné un variant hyperactif en terme de transport de NH_4^+ , qui induit une filamentation améliorée par rapport à la protéine Mep2 sauvage. Comme ce résidu est fortement conservé chez les membres de la famille AmtB/Mep, il était intéressant d'introduire cette substitution au niveau de la protéine AmtB de *R. capsulatus* et voir si cela entraîne une altération du « Switch-off » de la nitrogénase. Le dosage de l'activité de la nitrogénase chez la souche mutante RCIA2, a donné des résultats différents à ceux de la souche sauvage, c'est-à-dire aucun « Switch-off » n'a été observé, ce qui confirme nos suppositions. En affirmant ainsi l'importance de ce résidu dans la régulation de l'activité de la nitrogénase en plus de son implication dans le transport d'ammonium. En ce qui concerne le mutant RCIA4 (W237A), lui aussi a montré des résultats différents, la réduction de l'acétylène reste constante même après l'ajout de NH_4Cl . Des expériences supplémentaires doivent être faites pour montrer le rôle et l'implication de ce résidu, dans la régulation de la nitrogénase.

En deuxième lieu, et dans le but d'analyser l'activité et la modification de la protéine-Fe, nous avons travaillé avec des cultures hautement limitées en azote, dans tel conditions les cellules doivent se comporter comme si elles étaient en absence d'azote, puisque elles ne peuvent pas le fixer. La récupération des protéines est faite grâce à une méthode d'extraction rapide et efficace avec du SDS.

Une ADP-ribosylation de la protéine-Fe après l'ajout de NH_4^+ dans le milieu a été observée chez la souche sauvage (figure 19A), ainsi que chez le mutant RCIA1 (figure 19B). Plusieurs électrophorèses et immunobuvardages ont été effectuées, mais on n'a pas pu obtenir une résolution parfaite pour les mutants RCIA2, RCIA3. On a joué sur différents facteurs, dont l'augmentation de la concentration d'ammonium ajoutée à la culture. À chaque fois, soit une seule grosse bande au lieu de deux distincte, ou une ADP-ribosylation de la protéine-Fe avant et après l'ajout de NH_4Cl était observée. Il se peut que cette mutation ait généré un genre de stress qui peut expliquer la présence de l'ADP-ribose avant l'ajout d'ammonium. Pour la souche mutante RCIA4, on a obtenu des résultats conformes à nos attentes, aucune ADP-ribosylation n'a été observée même après l'ajout d'ammonium, suggérant son rôle clé dans la régulation, ce qui reste à prouver d'avantage.

Chez les bactéries, la séquestration membranaire est un mécanisme très important dans le contrôle de l'activité des facteurs de transcription. Récemment, elle a été identifiée comme mécanisme de régulation de l'activité de la nitrogénase. La formation du complexe GlnK-AmtB est la seule voie de transduction du signal externe connu jusqu'à nos jours, ainsi que dans la gestion du métabolisme d'azote. Dans le présent travail, on s'est concentré sur le rôle du complexe GlnK-AmtB de *R. capsulatus*, dans l'assimilation et la fixation d'azote, ainsi que dans la régulation de l'activité de la nitrogénase. On a essayé de démontrer la séquestration de la protéine GlnK au niveau de la membrane, suite à l'ajout d'ammonium. Des résultats concrets ont été obtenus pour la souche sauvage, où on a observé une séquestration de la protéine GlnK au niveau de la membrane après l'ajout de l'ammonium à la culture, ce qui indique l'importance et la nécessité de ce complexe dans le processus de régulation (figure 20).

Malheureusement, après plusieurs tentatives, en changeant à chaque fois les conditions expérimentales, on n'a pas pu détecter la protéine GlnK au niveau des différents compartiments cellulaires pour tous les autres mutants. La méthode de fractionnement cellulaire, semble fonctionner, puisque on a obtenu un culot brun qui correspond à la fraction membranaire, sachant que la membrane contient des pigments de cette couleur, la fraction cytoplasmique était incolore. En plus, cette méthode a déjà bien marché la première fois avec le type sauvage. On peut supposer que le problème peut être au niveau de la quantité des protéines extraites, ou au niveau des anticorps qui ont perdu leur viabilité, ou bien à cause qu'ils ne sont pas assez forts ou spécifiques pour la détection de faibles quantités de protéines. Pour cela il faut utiliser de bons anticorps, plus spécifiques à la protéine d'intérêt.

Les études antérieures réalisées chez *R. capsulatus* avec une double mutation au niveau des deux résidus D334 et D335, ont obtenu des résultats différents de ceux de la souche sauvage. Aucun « Switch-off » n'a été observé, ni formation du complexe GlnK-AmtB, ainsi qu'une abolition du transport du méthylammonium. Ici, on a construit le mutant D338A, résidu voisin de D334 et D335 qui a donné des résultats similaires à la souche sauvage. Il sera donc intéressant dans l'avenir de muter individuellement le D334 et D335 pour mieux comprendre les rôles et l'implication de ces acides aminés, qui se trouvent sur la même région, dans la régulation de l'activité de la nitrogénase. L'obtention de « Switch-off », d'ADP-ribosylation et formation du complexe GlnK-AmtB, ouvrira la porte vers d'autres hypothèses sur le rôle de ces résidus, et si la formation du complexe est vraiment importante dans la régulation du métabolisme d'azote.

Il sera préférable aussi de recommencer les tests de dosage de l'activité de la nitrogénase, pour les mutants, et l'état de modification de la NifH (protéine-Fe), ce qui va permettre de vérifier si les résultats que nous avons obtenus, provenant d'une erreur de manipulation. Un dosage du transport de méthylammonium pour les mutants RCIA2, RCIA3 et RCIA4, sera souhaitable afin de confirmer leur implication et leur importance dans le transport d'ammonium. De nouveaux anticorps anti-GlnK pourront être

bénéfiques, pour refaire l'expérience sur la séquestration de la protéine GlnK au niveau de la membrane, afin de ressortir avec des conclusions et des confirmations valables sur la nécessité du complexe GlnK-AmtB dans la régulation de l'activité de la nitrogénase, et par conséquent dans la fixation d'azote.

Conclusion

Dans le but de caractériser le rôle de la protéine AmtB dans la régulation de l'activité de la nitrogénase chez la bactérie pourpre *R. capsulatus*, des travaux de mutagenèse dirigée ont été effectués sur des résidus hautement conservés impliqués de façon directe ou indirecte dans ce phénomène de régulation. Notre objectif était d'investiguer l'implication de ces résidus dans la formation du complexe GlnK-AmtB, le « Switch-off » de l'activité de la nitrogénase, et dans la modification de la protéine-Fe par ADP-ribosylation. Les résidus H193, G367 et W237 semblent être essentiels et nécessaires dans la régulation de la nitrogénase, puisque aucun « Switch-off » n'a été observé suite au dosage de l'activité de la nitrogénase. Contrairement, à la souche mutante au niveau du résidu D338 on a obtenu des résultats similaires à ceux observés chez la souche sauvage, un « Switch-off » de l'activité de la nitrogénase a été observé suite à l'ajout d'ammonium, une ADP-ribosylation de la protéine NifH a été aussi détectée.

Quoique les résultats présentés ici sont très prometteurs et suggèrent que, certains des acides aminés de l'AmtB changés dans la présente étude peuvent être essentiels dans le bon fonctionnement de l'AmtB comme senseur et transporteur d'ammonium. Il sera nécessaire d'y apporter les améliorations et de refaire certaines expériences (l'état de modification de la protéine-Fe, la séquestration de la protéine GlnK), afin de déterminer de façon concluante le rôle précis de ces résidus conservés dans le métabolisme de l'azote. Les allèles mutants créés et partiellement caractérisés dans la présente étude forment une base solide pour les études futures et seront essentiels pour une connaissance moléculaire des mécanismes de signalisation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adler, S. P., D. Purich, et E. R. Stadtman.** 1975. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase : properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylylremoving enzyme. *J. Biol. Chem.* **250**: 6264-6272.
2. **Andrade, S. L., A. Dickmanns, R. Ficner, et O. Einsle.** 2005. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102(42)**: 14994-14999.
3. **Andrade, S. L., et O. Einsle.** 2007. The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Mol. Membr. Biol.* **24(5-6)**: 357-365.
4. **Arcondéguy, T., R. Jack, et M. Merrick.** 2001. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65(1)**: 80-105.
5. **Arsene, F., P. A. Kaminski, et C. Elmerich.** 1996. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J. Bacteriol.* **178(16)**: 4830-4838.
6. **Atkinson, M., E. S. Kamberov, R. L. Weiss, et A. J. Ninfa.** 1994. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcriptional factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). *J. Biol. Chem.* **269**: 28288-28293.
7. **Atkinson, M., et A. J. Ninfa.** 1998. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **29(2)**: 431-447.
8. **Atkinson, M., et A. J. Ninfa.** 1999. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32(2)**: 301-313.
9. **Bishop, P. E., J. K. Gordon, V. K. Shah, et W. J. Brill.** 1977. Transformation of nitrogen fixation genes in *Azotobacter*. *Basic. Life. Sci.* **9**: 67-80.
10. **Boeckstaens, M., B. André, et A. M. Marini.** 2007. The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. *Mol. Microbiol.* **64(2)**: 534-546.

11. **Bostick, D. L., et C. L. 3rd. Brooks.** 2007. On the equivalence point for ammonium (de)protonation during its transport through the AmtB channel. *J. Biophys.* **92(12)**: L103-105.
12. **Burgess, B.K. et D.J. Lowe.** 1996. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chem. Rev.* **96(7)**: 2983-3012.
13. **Cheah, E., P. D. Carr, P. M. Suffolk, S. G. Vasudevan, N. E. Dixon, et D. L. Ollis.** 1994. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. *Structure.* **2(10)**: 981-990.
14. **Conroy, M. J., A. Durand, D. Lupo, X. D. Li, P. A. Bullough, F. K. Winkler, et M. Merrick.** 2007. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104(4)**: 1213-1218.
15. **Cullen, P. J., W. C. Bowman, et R. G. Kranz.** 1996. In vitro reconstitution and characterization of the *Rhodobacter capsulatus* NtrB and NtrC two-component system. *J. Biol. Chem.* **271**: 6530-6536.
16. **Dalton, H., et J. R. Postgate.** 1969. Growth and physiology of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **56**: 307-319.
17. **Dixon, R., et D. Kahn.** 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2(8)**: 621-631.
18. **Drepper, T., S. Gross, A. F. Yakunin, P. C. Hallenbeck, B. Masepohl, et W. Klipp.** 2003. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology.* **149(Pt 8)**: 2203-2212.
19. **Egener, T., A. Sarkar, D. E. Martin, et B. Reinhold-Hurek.** 2002. Identification of a NifL-like protein in a diazotroph of the betasubgroup of the Proteobacteria, *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Microbiology.* **148**: 3203-3212.
20. **Endeward, V., R. Musa-Aziz, G. J. Cooper, L. M. Chen, M. F. Pelletier, L. V. Virkki, C. T. Supuran, L. S. King, W. F. Boron, et G. Gros.** 2006. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. *J. FASEB.* **20(12)**: 1974-1981.

21. **Fitzmaurice, W. P., L. L. Saari, R. G. Lowery, P. W. Ludden, et G. P. Roberts.** 1989. Genes coding for the reversible ADP-ribosylation system of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Mol. Gen. Genet.* **218(2)**: 340-347.
22. **Foster, H. D., et R. G. Kranz.** 1994. The *Rhodobacter capsulatus glnB* gene is regulated by NtrC at tandem *rpoN*-independent promoters. *J. Bacteriol.* **176(16)**: 5171-5176.
23. **Georgiadis, M. M., H. Komiya, P. Chakrabarti, D. Woo, J. J. Kornuc, et D. C. Rees.** 1992. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science.* **257(5077)**: 1653–1659.
24. **Gruswitz, F., J. 3rd. O'Connell, et R.M. Stroud.** 2007. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104(1)**: 42-47.
25. **Halbleib, C. M., Y. Zhang, et P.W. Ludden.** 2000. Regulation of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 3493-3500.
26. **Hallenbeck, P. C., C. M. Meyer, et P. M. Vignais.** 1982. Nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulatus*: purification and molecular properties. *J. Bacteriol.* **149**: 708-717.
27. **Hausinger, R. P., et J. B. Howard.** 1983. Thiol reactivity of the nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **258**: 13486–13492.
28. **Hoover, T. R., E. Santero, S. Porter, et S. Kustu.** 1990. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with *NIFA*, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell.* **63**: 11-22.
29. **Howitt, S. M., et M. K. Udvardi.** 2000. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochem. Biophys. Acta.* **1465**: 152-170.
30. **Huang, C. H., et P. Z. Liu.** 2001. New insights into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues. *Blood Cells Mol. Dis.* **27**: 90-101.

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

32. **Huergo, L. F., E. M. Souza, M. S. Araujo, F. O. Pedrosa, L. S. Chubatsu, M. B. Steffens, et M. Merrick.** 2006A. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. *Mol. Microbiol.* **59**: 326-337.

33. **Huergo, L. F., L. S. Chubatsu, E. M. Souza, F. O. Pedrosa, M. B. Steffens, et M. Merrick.** 2006B. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. *FEBS. Lett.* **580(22)**:5232-5236.

34. **Ikeda, T. P., A. E. Shauger, et S. Kustu.** 1996. *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. *J. Mol. Biol.* **259**: 589-607.

35. **Jaggi, R., W. Ybarlucea, E. Cheah, P. D. Carr, K. J. Edwards, D. L. Ollis, et S. G. Vasudevan.** 1996. The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*. *FEBS. Lett.* **391(1-2)**: 223-228.

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

37. **Javelle, A., et M. Merrick.** 2005. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. *Biochem. Soc. Trans.* **33(pt1)**: 170-172.

38. **Jepson, B., T. Money, et S. Austin.** 2002. *In vitro* activity of the transcriptional activator AnfA from *Azotobacter vinelandii*. In T.M. Finan, M.R. O'Brien, D.B. Layzell, J.K. Vessey et W.E. Newton, éditeurs, *Nitrogen fixation: Global perspectives*, Wallingford, UK: CABI Publishing. pp. 398.

39. **Jiang, P., P. Zucker, M. R. Atkinson, E. S. Kamberov, W. Tirasophon, P. Chandran, B. R. Schefke, et A. J. Ninfa.** 1997. Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. *J. Bacteriol.* **179**: 4342-4353.

40. **Jiang, P., J. A. Peliska, et A. J. Ninfa.** 1998. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry*. **37**: 12782–12794.
41. **Jouanneau, Y., C. M. Meyer, et P. M. Vignais.** 1983. Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion into an active and inactive form in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta*. **749**: 318-328.
42. **Jouanneau, Y., C. Roby, C. M. Meyer, et P. M. Vignais.** 1989. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*. **28**: 6524-6530.
43. **Jouanneau, Y., C. Meyer, I. Naud, et W. Klipp.** 1995. Characterization of an fdxN mutant of *Rhodobacter capsulatus* indicates that ferredoxin I serves as electron donor to nitrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1232(1-2)**: 33-42.
44. **Kern, D., B. F. Volkman, P. Luginbuhl, M. J. Nohaile, S. Kustu, et D. E. Wemmer.** 1999. Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature*. **402**: 894-898.
45. **Khademi, S., J. 3rd. O'Connell, J. Remis, Y. Robles-Colmenares, L. J. Miercke, et R. M. Stroud.** 2004. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science*. **305(5690)**: 1587-1594.
46. **Klipp, W., B. Masepohl, et A. Pühler.** 1988. Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: Duplication of a *nifA-nifB* region. *J. Bacteriol.* **170**: 693-699.
47. **Kranz, R. G., et D. Foster-Hartnett.** 1990. Transcriptional regulatory cascade of nitrogen-fixation genes in anoxygenic photosynthetic bacteria: oxygen- and nitrogen-responsive factors. *Mol. Microbiol.* **4(11)**: 1793-1800.
48. **Leigh, J. A., et J. A. Dodsworth.** 2007. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 349-377.
49. **Little, R., F. Reyes-Ramirez, Y. Zhang, W. C. Van Heeswijk, et R. Dixon.** 2000. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. *J. EMBO.* **19**: 6041-6050.

50. **Loqué, D., et N. von Wirén.** 2004. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J. Exp. Bot.* **55(401)**: 1293-1305.
51. **Lorenz, M. C., et J. Heitman.** 1998. The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. EMBO.* **17(5)**: 1236-1247.
52. **Lowery, R. G, et P. W. Ludden.** 1988. Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **263**: 16714-16719.
53. **Marini, A. M., S. Vissers, A. Urrestarazu, et B. André.** 1994. Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. EMBO.* **13(15)**: 3456-3463.
54. **Marini, A. M., S. Soussi-Boudekou, S. Vissers, et B. Andre.** 1997. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17(8)**: 4282-4293.
55. **Marini, A. M., et B, André.** 2000. In vivo N-glycosylation of the mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Mol. Microbiol.* **38(3)**: 552-564.
56. **Masepohl, B., R. Krey, et W. Klipp.** 1993. The *draTG* gene region of *Rhodobacter capsulatus* is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2667-2675.
57. **Masepohl, B., T. Drepper, A. Paschen, S. Gross, A. Pawlowski, K. Raabe, K. U. Riedel, et W. Klipp.** 2002. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4(3)**: 243-248.
58. **Masepohl, B., T. Drepper, et W. Klipp.** 2004. Nitrogen fixation in the photosynthetic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. In *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon et W.E. Newton, éditeurs, Kluwer Academic Publishers, pp. 141-165.
59. **Masepohl, B., et P. C. Hallenbeck.** 2010. Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. ed. Springer. NY. In press.
60. **Merrick, M. J.** 1992. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria, p. 835-876. In G. Stacey et al. (ed.), *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall. New York. NY.

61. **Merrick, M. J., et R. A. Edwards.** 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiological. Rev.* **59(4)**: 604-622.
62. **Michel-Reydellet, N., et P. A. Kaminski.** 1999. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. *J. Bacteriol.* **181**: 2655-2658.
63. **Missailidis, S., M. Jaseja, P. Ray, R. Chittock, C. W. Wharton, A. F. Drake, M. Buck, et E. I. Hyde.** 1999. Secondary structure of the C-terminal DNA-binding domain of the transcriptional activator NifA from *Klebsiella pneumoniae*: spectroscopic analyses. *Arch. Biochem. Biophys.* **361**: 173-182.
64. **Money, T., J. Barrett, R. Dixon, et S. Austin.** 2001. Protein-protein interactions in the complex between the enhancer binding protein NIFA and the sensor NIFL from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **183**: 1359-1368.
65. **Morett, E., et M. Buck.** 1989. In vivo studies on the interaction of RNA polymerase-sigma 54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters. *J. Mol. Biol.* **210**: 65-77.
66. **Morett, E., et L. Segovia.** 1993. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**: 6067-6074.
67. **Murrell, S. A., R.G. Lowery, et P.W. Ludden.** 1988. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase from *Clostridium pasteurianum* prevents its inhibition of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **251**: 609-612.
68. **Ninfa, E. G., M. R. Atkinson, E. S. Kamberov, et A. J. Ninfa.** 1993. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J. Bacteriol.* **175**: 7024-7032.
69. **Ninfa, A. J.** 1996. Regulation of gene transcription by extracellular stimuli, p. 1246-1262. In F. C. Neidhardt et al. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM. Press. Washington. D. C.
70. **Ninfa, A. J., et M. R. Atkinson.** 2000. PII signal transduction proteins. *Trends. Microbiol.* **8**: 172-179.
71. **Ninnemann, O., J. C. Jauniaux, et W. B. Frommer.** 1994. Identification of a high affinity NH₄⁺ transporter from plants. *J. EMBO.* **13(15)**: 3464-3471.
72. **Nolden, L., C. E. Nguoto-Nikili, A. K. Bendt, R. Krämer, et A. Burkovski.** 2001. Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: the role of glnK and glnD. *J. Mol. Microbiol.* **42(5)**: 1281-1295.

73. **Nordlund, S.** 2000. Regulation of nitrogenase activity in phototrophic bacteria by reversible covalent modification. In *Prokaryotic Nitrogen Fixation: a Model System for Analysis of a Biological Process*. Triplett, E. W. (ed.). Wymondham, UK: Horizon. Scientific. Press. pp. 149–167.
74. **Norén, A., et S. Nordlund.** 1994. Changes in the NAD(P)H concentration caused by addition of nitrogenase 'switch-off' effectors in *Rhodospirillum rubrum* G-9, as measured by fluorescence. *FEBS Lett.* **356**: 43-45.
75. **Nygaard, T. P., C. Rovira, G. H. Peters, et M. Ø. Jensen.** 2006. Ammonium recruitment and ammonia transport by *E. coli* ammonia channel AmtB. *J. Biophys.* **91(12)**: 4401-4412.
76. **Parkinson, J. S., et E. C. Kofoid.** 1992. Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
77. **Paschen, A., T. Drepper, B. Masepohl, et W. Klipp.** 2001. *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating *nif* gene expression in the presence of ammonium. *FEMS. Microbiology. Letters.* **200**: 207-213.
78. **Pawlowski, A., K. U. Riedel, W. Klipp, P. Dreiskemper, S. Gross, H. Bierhoff, T. Drepper, et B. Masepohl.** 2003. Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **185(17)**: 5240-5247.
79. **Peters, J. W., M. H. Stowell, S. M. Soltis, M. G. Finnegan, M. K. Johnson, et D. C. Rees.** 1997. Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry.* **36(6)**: 1181-1187.
80. **Pierrard, J., P. W. Ludden, et G. P. Roberts.** 1993. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: existence of two independent regulatory effects of ammonium. *J. Bacteriol.* **175**: 1358-1366.
81. **Pope, M. R., S. A. Murrell, et P. W. Ludden.** 1985. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphoribosylation of a specific arginine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82(10)**: 3173-3177.
82. **Pope, M. R., L. L. Saari, et P. W. Ludden.** 1986. N-glycohydrolysis of adenosine diphosphoribosyl arginine linkages by dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (activating enzyme) from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **261**: 10104-10111.
83. **Rees, D. C., et J. B. Howard.** 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4(5)**: 559-566.

84. **Reith, M. E., et J. Munholland.** 1995. Complete nucleotide sequence of the *porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **13**: 333-335.
85. **Saari, L. L., E. W. Triplett, et P. W. Ludden.** 1984. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **259**: 15502-15508.
86. **Salinas, P., et A. Contreras.** 2003. Identification and analysis of *Escherichia coli* proteins that interact with the histidine kinase NtrB in a yeast two-hybrid system. *Mol. Genet. Genomics.* **269**: 574-581.
87. **Schutt, H., et H. Holzer.** 1972. Biological function of the ammonia-induced inactivation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biol. Chem.* **26**: 68-72.
88. **Son, H. S., et S. G. Rhee.** 1987. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. *J. Biol. Chem.* **262(18)**: 8690-8695.
89. **Sweet, W. J., et R. H. Burris.** 1981. Inhibition of nitrogenase activity by NH_4^+ in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **145**: 824-831.
90. **Thomas, G. H., J. G. Mullins, et M. Merrick.** 2000. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol. Microbiol.* **37(2)**: 331-344.
91. **Tremblay, P. L., T. Drepper, B. Masepohl, et P. C. Hallenbeck.** 2007. Membrane sequestration of PII proteins and nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **189(16)**: 5850-5859.
92. **Tremblay, P. L., et P. C. Hallenbeck.** 2008. Ammonia-induced formation of an AmtB-GlnK complex is not sufficient for nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **190(5)**: 1588-1594.
93. **Tremblay, P. L., et P. C. Hallenbeck.** 2009. Of blood, brains and bacteria, the Amt/Rh transporter family: emerging role of Amt as a unique microbial sensor. *Mol. Microbiol.* **71(1)**: 12-22.
94. **Van Heeswijk, W. C., S. Hoving, D. Molenaar, B. Stegeman, D. Kahn, et H. V. Westerhoff.** 1996. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21(1)**: 133-146
95. **Van Niel, C. B.** 1944. The culture, general physiology, morphology, and classification of non-sulfur purple and brown bacteria. *Bact. Rev.* **8**: 1-118.

96. **Wang, H., C. C. Franke, S. Nordlund, et A. Norén.** 2005. Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. FEMS Microbiol. Lett. **253**: 273-279.
97. **Weaver, P. F., D. J. Wall, et H. Gest.** 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. Arch. Microbiol. **105**: 207-216.
98. **Xu, Y., E. Cheah, P. D. Carr, W. C. Van Heeswijk, H. V. Westerhoff, S. G. Vasudevan, et D. L. Ollis.** 1998. GlnK, a P_{II}-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loop may be involved in molecular recognition. J. Mol. Biol. **282**: 149-165.
99. **Yakunin, A. F., et P.C. Hallenbeck.** 1998. Short-term regulation of nitrogenase activity by NH₄⁺ in *Rhodobacter capsulatus*: multiple in vivo nitrogenase responses to NH₄⁺ addition. J. Bacteriol. **180**: 6392-6395.
100. **Yakunin, A. F., et P. C. Hallenbeck.** 2002. AmtB is necessary for NH₄⁺-induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. **184(15)**: 4081-4088.
101. **Yamamoto, H., J. Nomata, et Y. Fuita.** 2008. Functional expression of nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* in *Escherichia coli*. Photochem. Photobiol. Sci. **7(10)**: 1238-1242.
102. **Yates, M. G.** 1970. Effect of non-haem iron proteins and cytochrome C from *Azotobacter* upon the activity and oxygen sensitivity of Azobacter nitrogenase. FEBS. Lett. **8**: 281-285.
103. **Yildiz, Ö., C. Kalthoff, S. Raunser, et K. Kühlbrandt.** 2007. Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. EMBO J. **26**: 589-599.
104. **Zhang, Y., R. H. Bwris, P. W. Ludden, et G. P. Roberts.** 1997. Regultaion of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilens*. FEMS. Microbiol. Lett. **152**: 195-204.
105. **Zhang, Y., E. L. Pohlmann, P. W. Ludden, et G. P. Roberts.** 2001. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. J. Bacteriol. **183**: 6159-6168.

106. **Zheng, L., D. Kostrewa, S. Bernèche, F. K. Winkler, et X. D. Li.** 2004. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **101(49)**: 17090-17095.
107. **Zhu, Y., M. C. Conrad, Y. Zhang, et G. P. Roberts.** 2006. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signals. J. Bacteriol. **188**: 1866-1874.

ANNEXE A

Tableau I : Les différentes mutations au niveau des résidus de la famille Mep/AmtB/Rh

Rc	Ec	Mep2	Fonctions
F131A	F107		Formation du complexe Glnk-AmtB, pas de transport ni Switch-off pour Rc
D185E	D160		Formation du complexe, Switch-off et transport pour Rc
H193A	H168	H194A	Pour Mep2, pas de transport ni développement pseudohyphale. Pour Rc, on a formation du complexe GlnK-AmtB mais pas de Switch-off ni de transport. En ce qui concerne Ec, on a une augmentation du transport
W237A W237F *	W195L		E coli increased (10x) transport
H342 (in 5 described as H342K)	H318	H348A	Pour Mep2, pas de développement pseudohyphale. Pour Rc, on a formation du complexe mais pas de Switch-off ni de transport.
G344		G349	Mep2, hyperactivité pour le transport
D334A, D335A	D309, D313	D343	Rc ni transport ni Switch-off

