

Université de Montréal

**Étude de la régulation de la nitrogénase chez
Rhodobacter capsulatus à la noirceur**

Par

Nesrine RIAHI

Département microbiologie/immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en microbiologie et immunologie

Septembre, 2010

© Nesrine RIAHI, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de la régulation de la nitrogénase chez *Rhodobacter capsulatus* à la noirceur

Présenté par :
Nesrine RIAHI

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr George Szatmari, président-rapporteur
Dr Patrick C. Hallenbeck, directeur de recherche
Dr France Daigle, membre du jury

Résumé

L'atmosphère terrestre est très riche en azote (N_2). Mais cet azote diatomique est sous une forme très stable, inutilisable par la majorité des êtres vivants malgré qu'il soit indispensable pour la synthèse de matériels organiques. Seuls les procaryotes diazotrophiques sont capables de vivre avec le N_2 comme source d'azote. La fixation d'azote est un processus qui permet de produire des substances aminées à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère (78%). Cependant, ce processus est très complexe et nécessite la biosynthèse d'une vingtaine de protéines et la consommation de beaucoup d'énergie (16 molécules d'ATP par mole de N_2 fixé). C'est la raison pour laquelle ce phénomène est rigoureusement régulé.

Les bactéries photosynthétiques pourpres non-sulfureuses sont connues pour leur capacité de faire la fixation de l'azote. Les études faites à la lumière, dans le mode de croissance préféré de ces bactéries (photosynthèse anaérobie), ont montré que la nitrogénase (enzyme responsable de la fixation du diazote) est sujet d'une régulation à trois niveaux: une régulation transcriptionnelle de NifA (protéine activatrice de la transcription des gènes *nif*), une régulation post-traductionnelle de l'activité de NifA envers l'activation de la transcription des autres gènes *nif*, et la régulation post-traductionnelle de l'activité de la nitrogénase quand les cellules sont soumises à un choc d'ammoniaque. Le système de régulation déjà décrit fait intervenir essentiellement une protéine membranaire, AmtB, et les deux protéines PII, GlnB et GlnK. Il est connu depuis long temps que la nitrogénase est aussi régulée quand une culture photosynthétique est exposée à la noirceur, mais jusqu'aujourd'hui, on ignore encore la nature des systèmes intervenants dans cette régulation. Ainsi, parmi les questions qui peuvent se poser: quelles sont les protéines qui interviennent dans l'inactivation de la nitrogénase lorsqu'une culture anaérobie est placée à la noirceur? Une analyse de plusieurs souches mutantes, *amtB⁻*, *glnK⁻*, *glnB⁻* et *amtY* poussées dans différentes conditions de limitation en azote, serait une façon pour répondre à ces interrogations. Alors, avec le suivi de l'activité de la nitrogénase et le Western Blot, on a montré que le choc de noirceur provoquerait un "Switch-off" de l'activité de la nitrogénase dû à une ADP-ribosylation de la protéine Fe. On a réussi aussi à montrer que

tout le système déjà impliqué dans la réponse à un choc d'ammoniaque, est également nécessaire pour une réponse à un manque de lumière ou d'énergie (les protéines AmtB, GlnK, GlnB, DraG, DraT et AmtY). Or, *Rhodobacter capsulatus* est capable de fixer l'azote et de croître aussi bien dans la micro-aérobie à la noirceur que dans des conditions de photosynthèse anaérobies, mais jusqu'à maintenant sa régulation dans l'obscurité est peu étudiée. L'étude de la fixation d'azote à la noirceur nous a permis de montrer que le complexe membranaire Rnf n'est pas nécessaire à la croissance de *R. capsulatus* dans de telles conditions. Dans le but de développer une façon d'étudier la régulation de la croissance dans ce mode, on a tout d'abord essayé d'identifier les conditions opératoires (O_2 , $[NH_4^+]$) permettant à *R. capsulatus* de fixer l'azote en microaérobie. L'optimisation de cette croissance a montré que la concentration optimale d'oxygène nécessaire est de 10% mélangé avec de l'azote.

Mots-clés : Métabolisme de l'azote, nitrogénase, régulation transcriptionnelle, noirceur, microaérobie.

Abstract

The atmosphere of the Earth is very rich in nitrogen (N_2). However, diatomic nitrogen is very stable and therefore unusable by the majority of life forms even though it is necessary for the synthesis of a variety of organic compounds. Only diazotrophic procaryotes are capable of using N_2 as nitrogen source. Their nitrogen fixation allows the production of aminated compounds from atmospheric nitrogen (78 %). However, this process is very complex and requires the biosynthesis of about twenty proteins and the consumption of a lot of energy (16 molecules of ATP per molecule of N_2 fixed), thus necessitating its tight regulation.

The purple non-sulfur photosynthetic bacteria are known for their ability to carry out nitrogen fixation. Studies conducted in the light, the preferred mode of growth of these bacteria (anaerobic photosynthetic), have shown that nitrogenase (the enzyme responsible for dinitrogen fixation) is subject to regulation at three levels: transcriptional regulation of NifA (activator protein for the transcription of *nif* genes), posttranslational regulation of the activity of NifA to activate *nif* gene transcription, and posttranslational regulation of nitrogenase activity when cells are subjected to an ammonium shock. The control system already described involves essentially a membrane protein, AmtB and both PII proteins, GlnK and GlnB. It has long been known that nitrogenase is regulated when light is suddenly removed from a culture, but until now it is unclear whether these systems are also involved in the regulation of nitrogen fixation in dark. Thus, one outstanding question is what are the proteins involved in the inactivation of nitrogenase when a light-grown culture is placed in the dark? An analysis of several mutant strains; *amtB*⁻, *glnK*⁻, *glnB*⁻, and *amtY* under different conditions of nitrogen deficiency was used to address this question. Using measurements of nitrogenase activity and Fe protein modification by Western blotting, we were able to show that darkness causes a "switch-off" of nitrogenase due to ADP-ribosylation of Fe protein. Thus, the system that has already been described as involved in

the response to a lack of ammonia, is also required for a response to a lack of light or energy (AmtB, GlnK, GlnB, DraG, and DraT, and AmtY).

However, *Rhodobacter capsulatus* is also able to fix nitrogen and grow micro-aerobically in the dark as well as photosynthetically under anaerobic conditions, but so far its regulation in the dark has been little studied. The study of nitrogen fixation in the dark allowed us to show that the Rnf membrane complex is not required for growth of *R. capsulatus* in such conditions. In order to develop a way to study its regulation during this growth mode, we have attempted to identify the operating conditions (O_2 , $[NH_4^+]$), allowing *R. capsulatus* to fix nitrogen micro-aerobically. The optimization of this conditions has shown that the optimal concentration of oxygen required is 10% mixed with nitrogen.

Keywords : Nitrogen metabolism, nitrogenase, transcriptional regulation, darkness, micro-aerobic.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des signes et des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
Chapitre 1 : Revue bibliographique	13
1. Intérêt de l'étude de la fixation d'azote.....	13
2. <i>Rhodobacter capsulatus</i>	15
3. Fixation d'azote chez <i>Rhodobacter capsulatus</i>	17
3.1. La nitrogénase	17
3.2. Régulation de la fixation d'azote	22
4. Fixation d'azote en microaérobie.....	28
4.1. Bactéries diazotrophiques photosynthétiques	28
4.2. Bactéries diazotrophiques non photosynthétiques	33
5. Description du sujet de recherche	39
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	41
1. Matériels biologiques.....	41
1.1. Souches bactériennes utilisées	41
1.2. Milieux de culture	41
2. Méthodes.....	42
2.1. Croissance des cellules.....	42
2.2. Étude de l'inactivation de la nitrogénase dans la noirceur.....	42
2.3. Étude de la fixation d'azote en microaérobie et à la noirceur.....	49
Chapitre 3 : Résultats	52
1. Étude de l'inactivation de la nitrogénase en anaérobie à la noirceur	52

1.1.	Suivi de l'activité de la nitrogénase suite à un choc de noirceur	52
1.2.	Étude de l'état de modification de la protéine Fe	54
1.3.	Détermination du rapport NAD/NADH.....	55
2.	Étude de la fixation d'azote en microaérobie et à la noirceur.....	57
2.1.	Culture en "Shake agar"	57
2.2.	Culture dans les "erlenmeyer"	59
2.3.	Culture dans le "Bioflow C30"	64
Chapitre 4 : Discussion		70
Conclusion		75
Bibliographie.....		i

Liste des tableaux

<i>Tableau I</i> : Les souches bactériennes utilisées.....	41
<i>Tableau II</i> : Préparation des solutions standards.....	48
<i>Tableau III</i> : Conditions de préparation des cultures.....	49
<i>Tableau IV</i> : Conditions des cultures munies dans le "Bioflow C30"	51
<i>Tableau V</i> : Dosage de NAD chez la souche sauvage de <i>R. capsulatus</i> en utilisant 3 solutions d'extraction différentes	57
<i>Tableau VI</i> : Activité de la nitrogénase quand la croissance cellulaire est maximale en microaérobie (10% d'O ₂) et à la noirceur	67

Liste des figures

Figure 1 : Observation microscopique d'une culture photosynthétique de <i>Rhodobacter capsulatus</i> (B10:à gauche; LB2: à droite) (Weaver et al. 1975).....	17
Figure 2 : Mécanisme d'action de la nitrogénase (Dixon et al. 2004).....	18
Figure 3 : Structure du complexe de la nitrogénase (Dixon et al. 2004).....	19
Figure 4 : Cascade de détermination du taux d'azote fixé dans la cellule (Dixon et al. 2004)	23
Figure 5 : Cascade de la régulation transcriptionnelle des gènes <i>nif</i> (Dixon et al. 2004)....	24
Figure 6 : Structure du facteur NifA (Dixon et al. 2004).....	25
Figure 7 : Adaptations physiologiques et morphologiques permettant la fixation d'azote à différentes Cyanobactéries (Berman-Frank et al. 2003)	32
Figure 8 : Modèle proposé de la régulation de la synthèse et de l'activité de la nitrogénase chez <i>A. brasilense</i> (Steenhoudt et al. 2000)	39
Figure 9 : Chromatographie en phase gazeuse.....	43
Figure 10 : Protocole du dosage de l'activité de la nitrogénase.....	43
Figure 11 : L'appareil "Mini protean II electrophoresis cell" de Biorad.....	44
Figure 12 : L'appareil "Mini Trans-Blot cell" de Biorad	45
Figure 13 : Réduction des sels de tétrazolium par ADH.....	47
Figure 14 : "Bioflow C30"	50
Figure 15 : suivi de l'activité de la nitrogénase chez différentes souches de <i>R. capsulatus</i> (A: souche sauvage; B: <i>glnB</i> ⁻ ; C: <i>glnK</i> ⁻ ; D: <i>amtY</i> ⁻ ; E: <i>amtB</i> ⁻ et F: <i>draG/draT</i> ⁻).....	54
Figure 16 : Visualisation de l'état de la protéine Fe par Western Blot en utilisant un anti-Fe (A: souche sauvage; B: <i>glnB</i> ⁻ ; C: <i>glnK</i> ⁻ ; D: <i>amtY</i> ⁻ ; E: <i>amtB</i> ⁻ et F: <i>draG/draT</i> ⁻) (N : incubation à la noirceur; L : reprise de la lumière; Fe : la protéine Fe comme contrôle)	55
Figure 17 : Courbe standard de NAD (A) et de NADH (B)	56
Figure 18 : Suivi des cultures en " shake-agar " (A: J ₀ ; B: J ₂ ; C: J ₆ ; D: J ₁₀).....	58

Figure 19 : Suivi de la culture en aérobie sur milieu liquide de la souche sauvage de <i>Rhodobacter capsulatus</i> (A), du mutant <i>rnf</i> ⁻ (B) et du mutant <i>fdxN</i> (C) dans différentes conditions.....	60
Figure 20 : Suivi de la culture en aérobie sur milieu liquide de la souche sauvage de <i>Rhodobacter capsulatus</i> (A), du mutant <i>rnf</i> ⁻ (B) et du mutant <i>fdxN</i> (C) à faibles concentrations d'ammonium.....	63
Figure 21 : Suivi de la culture du mutant <i>amtB</i> ⁻ (A) et du mutant <i>amtY</i> (B) à faibles concentrations d'ammonium	63
Figure 22 : Mise en culture de <i>Rhodobacter capsulatus</i> en microaérobie à la noirceur dans le "Bioflow C30"	64
Figure 23 : Suivi de la croissance de la souche sauvage de <i>R. capsulatus</i> à 20 mM d'ammonium dans le "Bioflow C30" (débit du gaz = 10 ml/min).....	65
Figure 24 : Suivi de la culture de la souche sauvage de <i>R. capsulatus</i> à 4 mM d'ammonium en microaérobie à la noirceur à différentes concentrations d'O ₂ (de 4 à 10%)	66
Figure 25 : Visualisation par Western Blot de l'état de modification de la protéine Fe....	68
Figure 26 : Culture en microaérobie (10% O ₂) à la noirceur de la souche sauvage de <i>R.capsulatus</i> sans ammonium.....	68
Figure 27 : Visualisation par Western Blot de la protéine Fe	69

Liste des signes et des abréviations

Å: ångström

A. brasilense : *Azospirillum brasilense*

ADH : alcool déshydrogénase

ADP : adénosine diphosphate

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

bp : paires de bases

°C : degré Celsius

CO₂ : dioxyde de carbone

DO : densité optique

DOC : concentration d'oxygène dissout

DRAG : "dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase"

DRAT : "dinitrogenase reductase activating glycohydrolase"

é : électron

EBP : "enhancer-binding-protein"

Fe : fer

G_m : gentamicine

GAF : "cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA"

Gln : glutamine

GOGAT : glutamate synthétase

Gs : glutamine synthétase

h : heure

H₂ : molécule d'hydrogène

H⁺ : cation hydrogène

HCl : chlorure d'hydrogène

K : kelvin

K_m : kanamycine

Kb : kilobases

KDa : kilodaltons

Kg : kilogrammes

M : molaire

Mg : magnésium

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

mM : millimolaire

Mo : molybdène

MTT : 3-(4,5-diméthyl-thiazoyl-2)-2,5-diphényltétrazolium bromide

N : azote

N : normal

N₂ : diazote

NaCl : chlorure de sodium

NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide réduit
Na-lactate : lactate de sodium
NaOH : hydroxyde de sodium
NH₃ : ammonium
NH₄Cl : chlorure d'ammonium
nM : nanomolaire
nm : nanomètre
nmol : nanomole
NO₃ : nitrate
ntr : "nitrogen regulation"
O₂ : oxygène
2-OG : 2-oxoglutarate
P_i : phosphate inorganique
Pa : pascal
PES : phénazine éthosulfate
pH : potentiel hydrogène
PSI : photosystème I
PSII : photosystème II
r.p.m : rotation par minute
R. capsulatus : *Rhodobacter capsulatus*
R. rubrum : *Rhodospirillum rubrum*
rif : rifampicine
S : soufre
s : seconde
SDS : sodium dodécyl sulfate
Tc : tétracycline
tg : téragramme
U : unités
U/ml : unités par millilitre
UAS : "Upstream Activation Sequence"
µl : microlitre
µM : micromolaire
V : volt
W : watt
WT : "wild type"
3X : 3 fois

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tout d'abord, **Professeur Patrick C. Hallenbeck** de m'avoir permis d'effectuer ce projet dans son laboratoire ainsi que pour sa disponibilité, sa sympathie et les précieux conseils qu'il m'a prodigués tout le long de cette période. Je lui exprime aussi ma gratitude pour avoir accepté de m'encadrer durant cette période et pour la patience qu'il a su exercer à mon égard.

Qu'il me soit permis d'exprimer mes sentiments de respect, d'amitié, de profonde reconnaissance et de gratitude à tous les membres du laboratoire: **Mlle. Imen Abdelmajid, Mr. Dipankar Ghosh, Mme. Rim Marzouk** et **Mme. Mona Talaat**, qui m'ont permis de m'intégrer rapidement et d'effectuer mon projet dans d'excellentes conditions grâce aux nombreuses discussions fructueuses que nous avons eu ensemble ainsi qu'à tous les membres du département pour leur disponibilité et leur aide.

À cette occasion, Je remercie également **Mme. France Daigle** pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer mon travail par ses précieuses remarques et conseils et **Mr. George Szatmari** d'avoir accepté de présider le comité d'évaluation de mon mémoire.

Et pour finir, un remerciement spécial pour ma famille, particulièrement pour mon père **Ferjani**, ma mère **Mongia**, mon mari **Mohamed**, ma sœur **Rim** et mon petit frère **Omar**; qui n'ont pas cessé de me soutenir et de m'encourager pour atteindre mes objectifs durant toute ma scolarité et plus particulièrement lors de la réalisation de ce projet.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1. Intérêt de l'étude de la fixation d'azote

La fixation d'azote est un thème de recherche relativement « ancien » en terme scientifique puisqu'il y a plus d'un siècle que les chercheurs ont expérimentalement prouvé que certaines espèces de plantes avec l'aide de microbes, sont capables d'utiliser l'azote atmosphérique. En effet, le nitrogène a été découvert par Daniel Rutherford en 1772. Il a été démontré qu'il est très inerte par Antoine Lavoisier, qui lui a donné le nom « azote » ce qui voulait dire « sans vie ». Le N_2 possède une triple liaison entre les deux atomes de N, ce qui le rend incapable ni de donner ni d'accepter des électrons. Considéré comme un gaz ou comme un liquide, il est incolore et inodore. Il existe sous deux formes solides allotropiques qui apparaissent suite à une transition de la forme α à la forme β à une température de -237°C (Cheng 2008).

Certains micro-organismes sont capables d'utiliser une source d'énergie renouvelable pour fixer l'azote atmosphérique ($\approx 78\%$ de l'air atmosphérique) dans des conditions tempérées (telles que : température normale et pression normale) (Cheng 2008). L'azote est un élément essentiel à la croissance de tout être vivant. Même qu'il est très abondant à la surface de la planète (≈ 5 billions de tonnes se trouvant dans l'atmosphère, l'océan et la terre) et seulement une quantité infime (inférieure à 2%) est disponible pour les organismes. Le reste est soit ficelé à des roches sédimentaires ($\approx 20\%$), ce qui nécessiterait une étape d'extraction, soit sous forme de N_2 dans l'atmosphère ($\approx 78\%$), qui requiert suffisamment d'énergie pour permettre sa conversion en azote réactif et utilisable par les organismes.

Dans la nature, le N réactif est produit par un processus de fixation d'azote réalisé par certains micro-organismes seuls ou en symbiose avec des plantes (Galloway 1998). La

fixation d'azote n'est pas trouvée chez les eucaryotes par contre elle est largement distribuée chez les bactéries et les Archaea. Ceci révèle une biodiversité considérable à travers les organismes diazotrophiques, les organismes chimiolithotrophes et les actinorhizols (Dixon et al. 2004). La fixation d'azote est un processus clé permettant la réduction du nitrogène moléculaire en ammonium, qui représente la forme utilisable dans la synthèse de composés bio-organiques par tout système vivant sur terre (Cheng 2008). La fixation biologique d'azote est d'une grande importance aussi bien à l'environnement qu'à l'agriculture. Elle représente une partie très importante du cycle de l'azote puisqu'elle permet de réapprovisionner le contenu total de la biosphère en nitrogène et par conséquent compenser les pertes survenues suite au phénomène de dénitrification (Dixon et al. 2004). Le nitrogène biologiquement fixé peut être directement absorbé par les plantes ce qui permet de garder un environnement presque intact. En 1886, Hellriegel et Wilfarth ont définitivement prouvé que la fixation de N_2 est réalisée par des microbes chez les légumes.

Le premier processus chimique industriel, produisant l'azote comme fertilisant, a été développé par HaberBosch en 1906. Ce système utilise un agent catalytique (le fer avec un peu d'aluminium ajouté) à haute pression (plus que $5,06 \times 10^7$ Pa) et à une température élevée (600 - 800K) et utilise habituellement du combustible fossile. Ce système permet de produire 8×10^{10} Kg de NH_3 alors que la fixation biologique d'azote permet annuellement de produire $2,5 \times 10^{11}$ Kg de NH_3 à partir de l'atmosphère. Aujourd'hui, la demande en azote fixé comme fertilisant industriel est de l'ordre 2 tonnes en comparaison avec une production biologique d'azote fixé de 1 tonne par les légumineuses. Le cycle global du nitrogène est dépendant de la fixation d'azote mais cette situation devrait changer un jour (Cheng 2008). De plus, la population occupant la terre augmente de plus en plus et repose sur le nitrogène fertilisant afin d'améliorer la production agricole et arriver à subvenir à la grosse demande en aliments (Dixon et al. 2004; Cheng 2008).

La fixation biologique d'azote présente l'avantage d'être une source idéale pour une agriculture durable (Dixon et al. 2004; Cheng 2008). C'est pour cette raison que la recherche dans ce domaine est très importante et peut être très bénéfique (Cheng 2008). Toute fois, l'azote fixé biologiquement fait l'objet du lessivage et de la volatilisation

puisqu'il est utilisé "in-situ". Il intervient aussi dans le cycle d'azote marin et peut influencer la capacité du "biota" de l'océan à séquestrer le CO₂ atmosphérique. Par ailleurs, la fixation chimique d'azote a des impacts graves sur l'environnement comme l'émission d'oxyde de nitrogène, l'acidification du sol et l'eutrophisation de l'eau (Dixon et al. 2004). D'énormes progrès dans l'étude de la fixation biologique d'azote, ont été accomplis pendant le dernier siècle et plus précisément dans les deux dernières décennies. Les progrès ont été accomplis en génétique, en biochimie et en physiologie malgré que la recherche dans ce domaine est très limitée (Cheng 2008). La complexité de la nature du processus de fixation biologique d'azote ainsi que la difficulté de cultiver les organismes à partir de l'environnement et l'incertitude que les organismes cultivés représentent les organismes les plus réponsus "in-situ", sont des facteurs limitant de la recherche dans ce domaine (Zehr et al. 1996; Cheng 2008).

2. Rhodobacter capsulatus

C'est une α -protéobactérie photosynthétique, pourpre et non-sulfureuse (Weaver et al. 1975; Masepohl et al. 2002). Elle a été utilisée durant ces dernières décennies pour l'étude de plusieurs aspects des bactéries photosynthétiques ainsi que les problèmes métaboliques reliés à ces dernières. Elle présente la majorité des propriétés caractéristiques des bactéries pourpres non-sulfureuses et photosynthétiques. De plus, elle présente plusieurs avantages de point de vue analyse expérimentale: c'est un organisme qui croit rapidement dans un milieu synthétique simple dans des conditions d'anaérobie à la lumière et dans l'aérobie à la noirceur. Son temps de génération est de l'ordre de 2h. Cette bactérie est très résistante et peut être conservée pour une assez longue période. De plus, les mutations sont facilement obtenues avec cette souche en ayant recours seulement aux procédures classiques permettant d'avoir plus d'opportunités pour l'exploitation des approches génétiques et biochimiques. D'ailleurs le premier système de recombinaison génétique chez les bactéries photosynthétiques, a été observé chez *Rhodobacter capsulatus* en 1974.

En culture elle a une tendance de s'arranger en une chaîne formant des « zigzags » (Figure 1). Le mécanisme de la division cellulaire ainsi que la structure de la membrane peuvent être affectés par les facteurs nutritionnels. La majorité des souches de *R. capsulatus* requièrent la thiamine comme vitamine dans le milieu de culture mais il y a des exceptions. Cependant aucune souche ne peut croître à une température au-dessus de 30°C. Afin de supporter sa croissance photohétérotrophique, elle aurait besoin d'un certain nombre de substrats organiques tels que: les sucres, le lactate, le pyruvate, les acides gras et l'acide dicarboxylique provenant du cycle d'acide citrique. L'observation de son spectre d'absorption en présence d'oxygène montre qu'elle produit des caroténoïdes lui permettant d'absorber l'énergie lumineuse, de la convertir pendant la photosynthèse et de protéger la chlorophylle de l'endommagement (Weaver et al. 1975). La chlorophylle est essentielle pour la vie dans la biosphère, jouant un rôle très important dans l'absorption d'énergie. La chlorophylle catalyse la conversion de l'énergie solaire en énergie chimique via le processus de photosynthèse. Le pigment le plus important dans la photosynthèse est la chlorophylle "a" qui absorbe la lumière à certaines longueurs d'onde seulement. Le processus de photosynthèse peut absorber plus d'énergie s'il utilise d'autres molécules, comme des pigments accessoires, afin d'absorber l'énergie à partir d'autres longueurs d'onde et de la passer par la suite à la chlorophylle "a" (Cheng 2008).

Cependant des études ultérieures ont montré que cette bactérie remarquable présente réellement cinq modes de croissance dépendant de la source d'énergie et de la présence d'oxygène: (i) croissance anaérobie comme autophototrophe en utilisant le H₂ et le CO₂ en présence de la lumière comme source d'énergie, (ii) croissance anaérobie comme hétérophototrophe en présence de sources organiques variables de carbone à la lumière, (iii) fermentation anaérobie à la noirceur en présence de sucres comme seule source de carbone et d'énergie, (iv) croissance aérobie comme chimiohétérotrophe à la noirceur et (v) croissance aérobie comme chimioautotrophe à la noirceur avec le H₂ comme source d'électrons (Madigan et al. 1984).

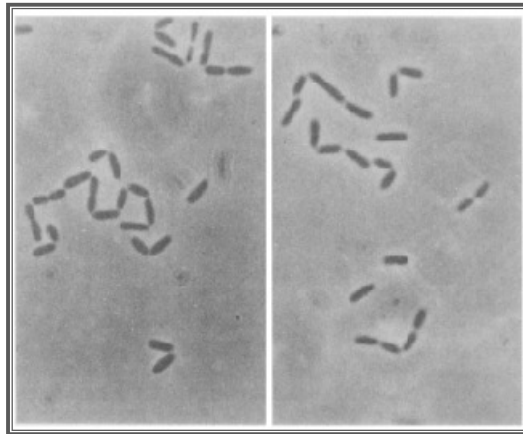


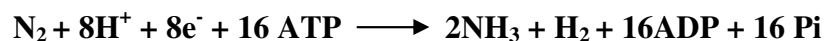
Figure 1 : Observation microscopique d'une culture photosynthétique de *Rhodobacter capsulatus* (B10: à gauche; LB2: à droite) (Weaver et al. 1975)

Chez *Rhodobacter capsulatus*, la synthèse ainsi que l'activité de la nitrogénase sont sous 3 niveaux de contrôle par les facteurs environnementaux tels que la variation de la concentration d'ammonium, molybdène, lumière et l'oxygène (Masepohl et al. 2002).

3. Fixation d'azote chez *Rhodobacter capsulatus*

3.1. La nitrogénase

La fixation de l'azote catalysée par la nitrogénase se fait selon la réaction suivante :



La nitrogénase la plus étudiée est le système contenant le molybdène et consiste en deux métalloprotéines, à savoir la dinitrogénase réductase (protéine Fe), un homo-dimère possédant un cluster "fer-soufre" (4Fe4S) et considérée comme un transmetteur d'électrons ATP- dépendant, à partir d'un donneur tel que la flavodoxine ou ferrédoxine, à la deuxième protéine dite la dinitrogénase (protéine MoFe) qui contient le site de fixation et de réduction du nitrogène (Ferguson 1998; Rees et al. 2000; Dixon et al. 2004; Cheng 2008). La protéine MoFe possède deux types de cluster: le P-cluster et le cofacteur MoFe (MoFeco) (Ferguson 1998; Rees et al. 2000). La réaction requiert un donneur d'électrons en plus de l'adénosine

triphosphate (ATP). Les électrons sont générés de différentes manières dépendamment du métabolisme de l'organisme (Cheng 2008). Ces électrons sont transférés directement à la flavodoxine ou à la ferrédoxine, transporteurs qui assurent le transfert des électrons de la protéine Fe de la nitrogénase et un cycle de réactions d'oxydo- réduction démarrera en conséquence (figure 2) (Dixon et al. 2004; Cheng 2008). En effet, la compréhension du mécanisme d'action de la nitrogénase s'est amélioré après la détermination de la structure cristallographique des protéines Fe et MoFe (Ferguson 1998; Rees et al. 2000; Dixon et al. 2004) ainsi que celle du complexe formé entre les deux protéines sous forme stabilisée (Dixon et al. 2004). Alors, deux molécules de MgATP vont se lier à la protéine Fe réduite puis elles vont être hydrolysées pour qu'il y ait un transfert d'un électron de la protéine Fe à la protéine MoFe (figure 2).

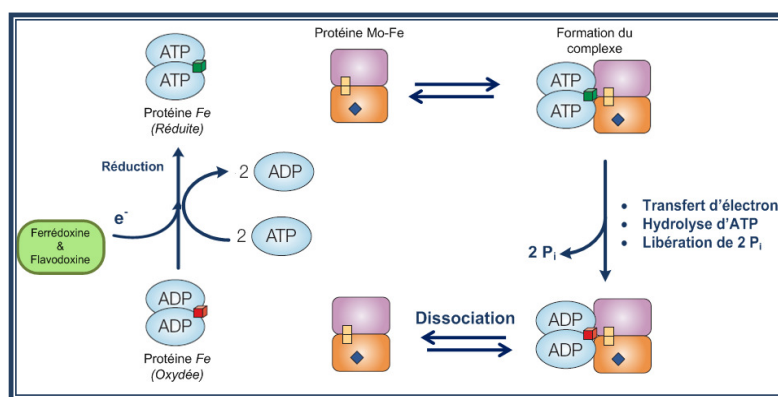


Figure 2: Mécanisme d'action de la nitrogénase (Dixon et al. 2004)

La réduction de N₂, qui se fait en plusieurs étapes, se déroule réellement au niveau de la protéine MoFe. Chaque atome d'azote fixé nécessite le transfert de six électrons ce qui fait un total de 12 molécules d'ATP pour une seule molécule de N₂. Cependant, la nitrogénase réduit aussi les protons en H₂ donc elle a besoin ainsi de deux électrons supplémentaires. Le bilan total s'élève alors à 8 électrons transférés et 16 molécules de MgATP hydrolysées (Cheng 2008). Chaque étape de transfert d'un électron, requiert obligatoirement un cycle d'association/dissociation de la protéine Fe et la protéine MoFe. La nitrogénase est une enzyme relativement lente ($\mu_{\max} \sim 5s^{-1}$). C'est le cycle association/dissociation du complexe qui est à l'origine de cette vitesse de la réaction. Mais ce complexe a un rôle

crucial dans le mécanisme d'action de l'enzyme comme il est nécessaire pour l'accouplement de l'hydrolyse d'ATP et le transfert d'électrons. En outre la vitesse de réaction faible de la nitrogénase oblige les organismes fixateurs d'azote de synthétiser une large quantité (plus que 20% du total des protéines cellulaires) de cette dernière afin de pouvoir utiliser le diazote comme seule source de nitrogène (Dixon et al. 2004).

Les progrès réalisés dans la caractérisation structurale des composants de la nitrogénase durant ce dernier siècle, ont contribué à l'élaboration de ce mécanisme d'action enzymatique. L'emplacement du cluster métallique dans les composants de la nitrogénase a permis de suggérer un modèle de scénario traduisant le transfert d'électrons: l'électron passe du cluster (4Fe4S) au P-cluster (8Fe8/7S) et puis au cofacteur FeMo pour arriver enfin au substrat. Le P-cluster (8Fe8/7S) représente la "pool" d'électrons et se trouve à une distance presque égale ($\approx 14 \text{ \AA}$) soit du cofacteur de protéine Fe (4Fe4S) ou du cofacteur de la protéine MoFe (FeMoco) (Cheng 2008). La protéine MoFe est un $\alpha_2\beta_2$ hétérotétramère (Figure 3) qui fournit les sites de fixation et de réduction du substrat (Rees et al. 2000; Zehr et al. 2003; Cheng 2008).

En effet, le tétramère contient 30 atomes Fe et 2 atomes de Mo (Cheng 2008). Ces atomes sont distribués entre deux types de cluster: P-cluster, qui participe au transfert d'électrons de la protéine Fe au cofacteur MoFe, qui représente le site de réduction du substrat (Rees et al. 2000; Cheng 2008)

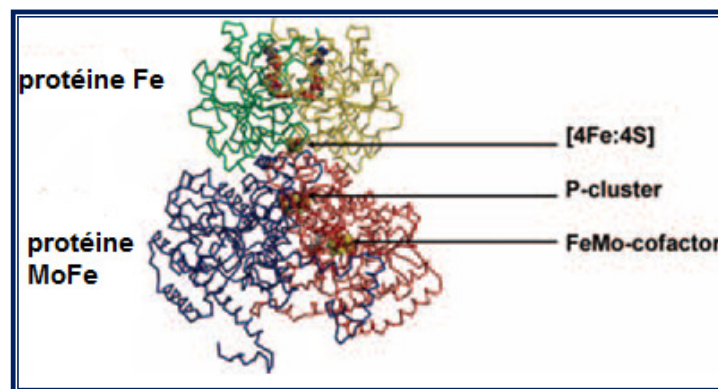


Figure 3: Structure du complexe de la nitrogénase (Dixon et al. 2004)

Les sous-unités α et β sont composées de 491 et 522 acides aminés respectivement avec un poids moléculaire total de 240KDa (Cheng 2008). L'interface du tétramère est dominée par des interactions entre les hélices des deux sous-unités β le long du site de liaison des cations, qui est occupé par les ions calcium. Le P-cluster, qui intervient dans le transfert d'électrons entre le cluster (4Fe-4S) et le cofacteur MoFe, est localisé à une distance approximative de 10°A au-dessous de la surface de la protéine et plus précisément au niveau de l'axe qui relie les deux sous-unités α et β . le cofacteur MoFe, qui intervient dans la liaison du substrat au site de réduction, se trouve aussi à une distance de 10°A de la surface de la protéine mais dans un environnement fournit par la sous-unité α . Cet environnement d'acides aminés présente plusieurs avantages: non seulement il est responsable de la stabilité de la structure de la protéine mais aussi il influence les propriétés de la réaction de réduction du substrat, ainsi que le taux de réduction, la spécificité du substrat et des produits.

Dans le cycle de la nitrogénase (figure 2), l'hydrolyse de l'ATP permet le contrôle du circuit de transfert d'électrons entre les différents composants de la protéine. Les détails sur ce mécanisme de contrôle sont encore non élaborés. De plus, il est évident que le cofacteur MoFe agit comme un site de liaison et de réduction mais exactement où et comment le substrat arrive à se lier et s'activer sont encore des sujets en cours d'étude. Le transfert d'électrons de la protéine Fe à la protéine MoFe est couplé à l'hydrolyse de molécules de MgATP qui sera suivie d'une dissociation du complexe protéine-protéine. L'étape de transfert d'électrons est une fonction essentielle de la protéine Fe, puisque la protéine MoFe seule est incapable de réduire le N₂, malgré que le cofacteur MoFe peut être réduit par d'autres donneurs d'électrons (Cheng 2008).

Chez les bactéries fixatrices d'azote, la nitrogénase est codée par un ensemble d'opérons incluant des gènes de régulation (tels que: les gènes *nifLA*), des gènes structuraux (tels que: *nifHDK*) et d'autres gènes supplémentaires (Cheng 2008). Les gènes codant pour la nitrogénase se trouvent chez diverses bactéries et Archaea. Le degré de similarité élevé de la séquence protéique de la nitrogénase entre les diazotrophes, suggère l'existence d'une origine précoce ou d'un transfert de gènes latéral entre les différentes lignées de

procaryotes. Les deux hétérodimères de la protéine MoFe sont codés par les gènes *nifD* et *nifK*. Quant à la protéine Fe, qui couple l'hydrolyse de l'ATP au transfert d'électrons interprotéiques, elle est formée de deux sous-unités identiques codées par le gène *nifH*. En plus des gènes structuraux, un certain nombre de gènes supplémentaires est requis pour la régulation et l'assemblage de la nitrogénase. Ainsi, la fixation d'azote est métaboliquement coûteuse. Elle nécessite 20 Kb ou plus d'ADN afin d'encoder toutes les protéines requises pour assurer son assemblage et sa fonction. On pourrait supposer que la synthèse des gènes *nif* ("nitrogen fixation genes") dépendrait de la capacité à fixer l'azote. En effet, les multiples gènes nécessaires à la régulation et l'assemblage de la nitrogénase occupent un domaine assez large, les gènes *nif* ne seraient présents que chez les micro-organismes aptes à se trouver dans des conditions fixatrices d'azote. L'expression des gènes codant pour la nitrogénase est hautement régulée à plusieurs niveaux: allant de la transcription jusqu'aux modifications post-traductionnelles des protéines (Zehr et al. 2003; Dixon et al. 2004). La transcription de l'opéron *nifHDK* est un bon marqueur pour la détermination des conditions de fixation d'azote, comme il n'est pas constitutivement exprimé et il est régulé en réponse à des facteurs qui contrôlent la fixation du nitrogène (Zehr et al. 2003).

Des nitrogénases alternatives utilisant le vanadium ou le fer au lieu du molybdène, ont été découvertes chez *R. capsulatus* dans un environnement limitant en molybdène (Rees et al. 2000; Masepohl et al. 2002; Cheng 2008). La nitrogénase conventionnelle contient le métal Mo (molybdène) dans son centre Fe-S reliant ses deux sous-unités. Alors que la nitrogénase alternative est celle dont le métal Mo est remplacé par d'autres métaux (Zehr et al. 2003). La nitrogénase conventionnelle (codée par les gènes *nif*) et alternative (codée par les gènes *anf*) sont toutes les deux sous forme d'un complexe à deux composantes et sont aussi sensibles à l'oxygène (Rees et al. 2000; Drepper et al. 2003; Zehr et al. 2003; Dixon et al. 2004; Cheng 2008) ce qui impose des contraintes physiologiques considérables aux organismes (Dixon et al. 2004). Les seules différences notées entre les deux enzymes sont au niveau de la cinétique et la spécificité de la réaction (Zehr et al. 2003).

3.2. Régulation de la fixation d'azote

La fixation d'azote chez *Rhodobacter capsulatus* a été étudiée pour plus de deux décennies, et il s'est avéré que les principales protéines intervenant dans la régulation sont hautement conservées entre *R. capsulatus* et les autres bactéries photosynthétiques pourpres. Pour cette raison, *R. capsulatus* a été considérée comme un modèle phototrophe pour l'étude de la régulation de la fixation d'azote (Masepohl et al. 2009).

La nécessité de répondre à des variations de la concentration de l'azote fixé ou à l'oxygène externe, et de fournir l'énergie nécessaire à la fixation d'azote, impose plusieurs principes de régulation chez les diazotrophes (Dixon et al. 2004). Chez *R. capsulatus*, la fixation d'azote est contrôlée par le système de régulation centrale ntr (**n**itrogen **r**égulation) et ce à trois niveaux: tout d'abord, le système ntr (**n**itrogen **r**égulation) va sentir le taux d'azote fixé. En effet, le système ntr est composé du: système régulateur à deux composantes NtrB-NtrC, des protéines PII (GlnK et GlnB) et le GlnD (Masepohl et al. 2002; Drepper et al. 2003; Pawlowski et al. 2003; Masepohl et al. 2009).

Dans des conditions de limitation en azote, NtrC est phosphorylée par NtrB ce qui augmente ses capacités à activer les gènes *nifA*, codant pour l'activateur central de tous les gènes *nif*. Le deuxième niveau de la régulation concerne l'activité de NifA lui-même alors que le troisième niveau affecte l'activité enzymatique de la nitrogénase par un mécanisme de "switch-off" réversible en réponse à des variations brusques des conditions environnantes (Masepohl et al. 2002; Drepper et al. 2003; Dixon et al. 2004; Masepohl et al. 2009).

3.2.1. Régulation pré et post-transcriptionnelle

L'ammonium constitue la source préférée d'azote fixé pour la majorité des bactéries y compris les espèces diazotrophiques (Masepohl et al. 2002; Yakunin et al. 2002; Pawlowski et al. 2003; Masepohl et al. 2009). L'ammonium est assimilé par la synthèse de glutamate, soit par la glutamate déshydrogénase, soit par la voie de la glutamate synthase GOGAT (Yakunin et al. 2002). Le taux de glutamine (Gln) et du 2-oxoglutarate (2-OG),

qui sont les métabolites clés de la voie glutamine synthétase (GS)/ glutamate synthase (GOGAT), traduit le taux intracellulaire d'azote fixé (Masepohl et al. 2009) et contrôle par conséquent le processus de fixation d'azote hautement énergétique (Masepohl et al. 2002).

Les protéines PII (GlnK et GlnB) sont des petites protéines cytoplasmiques, trimériques et ubiquitaires (Dixon et al. 2004). Elles sont capables d'intégrer des signaux métaboliques, comme par exemple le taux cellulaire d'azote fixé. Alors elles vont se lier d'une manière synergique au 2-OG et à l'ATP et en conséquent réguler le métabolisme central par des interactions protéine-protéine (Tremblay et al. 2008). De plus, les protéines PII peuvent être réversiblement uridyliées. Cette modification est catalysée par GlnD, une enzyme bifonctionnelle ("uridylylTransferase/uridylylRemoving") codée par *glnD* et qui est le senseur de Gln dans ce système. À des faibles concentrations de Gln (limitation en azote), GlnD agit comme uridylylTranférase et induit l'uridylation des deux protéines PII au niveau du résidu tyrosine 51 (Figure 4). Elles deviennent alors incapables d'interagir avec la composante NtrB. Dans ces conditions, NtrB s'autophosphorylle et par conséquent provoque la phosphorylation de NtrC. Alors NtrC phosphorylé devient actif et peut agir alors comme un activateur de la transcription de ses gènes cibles (Figure 4) (Masepohl et al. 2002; Dixon et al. 2004; Masepohl et al. 2009).

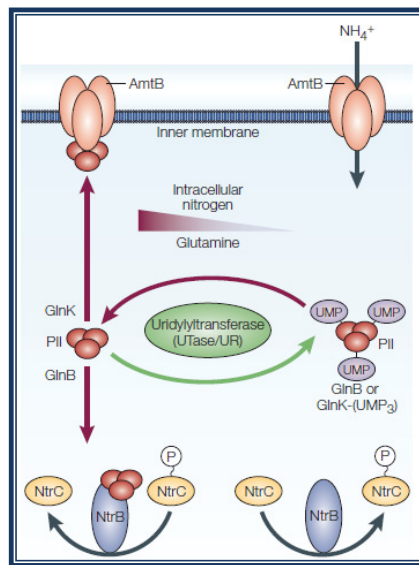


Figure 4: Cascade de détermination du taux d'azote fixé dans la cellule (Dixon et al. 2004)

Chez *R. capsulatus*, NtrC est essentielle à la transcription des gènes *nifA* et *anfA* dont les produits sont indispensables à la transcription de tous les autres gènes *nif* ou *anf*. Les membres de la famille NtrC possèdent une structure modulaire se composant de trois domaines fonctionnels: un domaine N-terminal qui contient un résidu aspartate conservé représentant le site de phosphorylation de NtrC, un domaine central responsable de l'attachement, de l'hydrolyse de l'ATP et de l'interaction avec l'ARN polymérase chez certaines bactéries et enfin un domaine C-terminal qui contient un motif "helix-turn-helix" qui reconnaît et se lie spécifiquement à la séquence se trouvant en amont du promoteur des gènes cibles. Dans des conditions de limitation en nitrogène, NtrC active alors la transcription des gènes impliqués dans la fixation d'azote tels que: *nifA1*, *nifA2* (codant pour l'activateur de la transcription des gènes *nif*, NifA) et *anfA* (codant pour l'activateur de la transcription des gènes *anf*), *glnB-glnA* (codant pour GlnB et la glutamine synthétase), *glnK-amtB* (codant pour GlnK et le transporteur d'ammonium AmtB), *amtY* (codant pour un second transporteur d'ammonium AmtY (Masepohl et al. 2002; Masepohl et al. 2009).

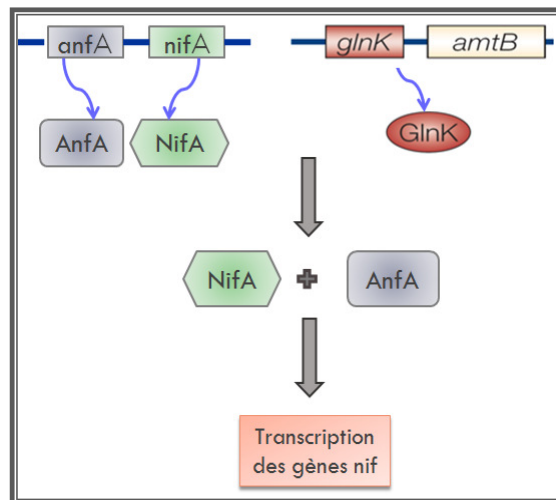


Figure 5: Cascade de la régulation transcriptionnelle des gènes *nif* (Dixon et al. 2004)

Suite à l'addition de NH_4^+ à une culture fixatrice d'azote, le taux de Gln intracellulaire augmente et par conséquent, les deux protéines PII sont déuridylées sous l'action "UridylRemoving" de GlnD. La forme non modifiée de la protéine GlnB se lie à NtrB et l'empêche de phosphoryler NtrC (Figure 4). Ainsi l'expression des promoteurs NtrC-

dépendant n'aura pas lieu. Récemment il a été démontré la protéine AmtB est capable de détecter la présence d'ammonium intracellulaire et la séquestration membranaire des protéines PII; GlnB et GlnK (Tremblay et al. 2008). On peut en déduire alors que suite à un choc d'ammonium, les protéines PII (GlnK et GlnB) sont à l'origine de l'inhibition de l'expression des gènes *nifA* via la déphosphorylation de NtrC et de l'inhibition de l'activité de NifA selon un mécanisme inconnu jusqu'à maintenant (Rudnick et al. 1997; Masepohl et al. 2002; Pawlowski et al. 2003; Masepohl et al. 2009). Chez les protéobactéries comme *R. capsulatus*, les gènes *nif* et *anf* sont sous un contrôle transcriptionnel par NifA, et AnfA respectivement (Figure 5) (Dixon et al. 2004; Masepohl et al. 2009). Le facteur NifA est un activateur transcriptionnel central de tous les gènes *nif* (Masepohl et al. 2009) et fait partie de la famille des EBP "Enhancer-binding protein". Il a une structure similaire à celle de tout membre de cette famille: un domaine central conservé AAA+ (ATP-dépendant) juste à côté d'un domaine régulateur avec une extrémité amino-terminale et un domaine "DNA-binding" avec une extrémité carboxy-terminale (figure 6). La région N-terminale contient un domaine GAF, un module de signalisation ubiquitaire se trouvant chez tous les règnes de la vie et il a été démontré dans certains cas qu'il peut se lier à des petites molécules telles que: les nucléotides cycliques et le formiate. Par ailleurs, il intervient aussi dans la régulation de l'activité de NifA mais le mécanisme est encore inconnu (Dixon et al. 2004). En effet, l'activation de la transcription des gènes *nif* implique la liaison de NifA à une séquence UAS, qui se trouve à une distance de 100 à 200 bp en amont du codon d'initiation de la transcription du gène cible. Ainsi la liaison de NifA à la séquence UAS et son interaction avec le facteur σ^{54} de l'ARN-polymérase provoque la formation d'un complexe au niveau du promoteur et par conséquent initiation de la transcription des gènes *nif*.

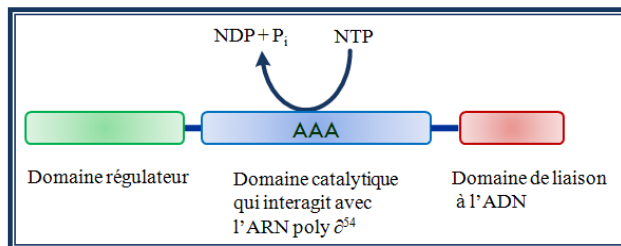


Figure 6: Structure du facteur NifA (Dixon et al. 2004)

Donc, la formation du complexe et l'initiation de la transcription au niveau du promoteur des gènes *nif* dépendent à la fois du facteur NifA et du facteur σ^{54} de l'ARN-polymérase. Cette co-dépendance prouve que la transcription des gènes *nif* est rigoureusement régulée. NifA est le maître régulateur de la fixation d'azote, néanmoins la cascade de régulation diffère d'un organisme à un autre mais il en résulte toujours soit une régulation de son expression soit une modulation de son activité en réponse à une variation de la concentration intracellulaire de l'azote (Dixon et al. 2004). En effet contrairement aux autres bactéries diazotrophiques, *R. capsulatus* possède deux copies du gène *nifA*, *nifA1* et *nifA2*. Les deux protéines NifA1 et NifA2 sont pratiquement semblables (à 560 résidus) et différent seulement dans la région N-terminale. La présence de l'un des deux est suffisante pour permettre une croissance dans des conditions fixatrices d'azote puisque l'une est un substitut pour l'autre. Leur activité est inhibée par l'ammonium mais il semble que NifA2 est plus tolérante à une augmentation de la concentration de NH_4^+ dans le milieu (Masepohl et al. 2002; Masepohl et al. 2009). Chez les protéobactéries diazotrophiques, le système à deux composantes NtrB-NtrC, qui fournit une régulation globale en réponse à la source d'azote, contrôle aussi l'expression de NifA. Comme NifA, NtrC est un "EBP" σ^{54} -dépendant (Dixon et al. 2004).

3.2.2. Régulation post-traductionnelle

Bien que la majorité des protéobactéries diazotrophiques régule le processus de fixation d'azote en contrôlant la transcription et l'activité des gènes *nifA*, quelques unes seulement, comme *R. capsulatus*, ont un système régulateur supplémentaire. Ce système contrôle rapidement et réversiblement l'activité de la nitrogénase en réponse à des variations brusques des conditions environnementales. Un ajout d'ammonium à une culture fixatrice d'azote, une diminution de la pression partielle d' O_2 ou même l'élimination de la lumière dans le cas d'une culture photosynthétique, induiraient une diminution rapide voir une inhibition de l'activité de la nitrogénase après 2 à 3 min. Dès que le stimulus négatif est éliminé, la nitrogénase est rapidement réactivée (dans le cas d'un choc d'ammonium, la période après laquelle il y aura réactivation dépendrait de la quantité d'ammonium ajoutée).

Ce type de régulation est dit: «switch-off/switch-on». En effet, le «switch-off/switch-on» de l'activité de la nitrogénase a comme origine une ADP-ribosylation de la dinitrogénase réductase assurée par le système DraT-DraG (Yakunin et al. 2002; Masepohl et al. 2009). Après addition de NH_4^+ à une culture fixatrice d'azote, DraT ("dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase") devient transitoirement active et catalyse l'ADP-ribosylation du résidu arginine 101 de l'une des sous-unités de la dinitrogénase réductase. Cette modification stérique la rend incapable de fournir les électrons nécessaires à la dinitrogénase et par conséquent l'activité de la nitrogénase est inhibée. Mais dès que la concentration intracellulaire de NH_4^+ diminue, DraG ("dinitrogenase reductase activating glycohydrolase") devient active et enlève le groupement ADP-ribose de la dinitrogénase réductase ce qui permet de restaurer l'activité de la protéine Fe et par conséquent du complexe enzymatique de la nitrogénase. L'activité de DraT et de DraG est modulée par les protéines PII, GlnK et GlnB (Masepohl et al. 2009). Néanmoins, le NH_4^+ exogène provoque trois types de réponses différentes chez *R. capsulatus*: un «switch-off» dû à une ADP-ribosylation de la protéine Fe, un «switch-off» indépendant de l'ADP-ribosylation et une réponse magnitude où la quantité de NH_4^+ ajouté affecte l'effet magnitude de l'inhibition (Yakunin et al. 2002).

Le produit du gène *amtB* faisant partie de l'opéron *glnK-amtB*, intervient aussi dans l'ADP-ribosylation de la dinitrogénase réductase ce qui suggère qu'AmtB intervient dans la modulation de l'activité de DraT (Masepohl et al. 2002; Masepohl et al. 2009). En effet, en présence d'une limitation en azote, AmtB assure le transport de NH_4^+ à travers la membrane plasmique. Les ions NH_4^+ se lient aux résidus se trouvant à l'intérieur du vestibule périplasmique d'AmtB. Puis ils sont déprotonés ensuite reprotonés quant ils passent dans le cytoplasme. Toute fois, les détails concernant le processus de transport sont encore à l'étude. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'ammonium induit la séquestration de la protéine GlnK déuridylée par AmtB ce qui bloquerait d'avantage l'entrée de NH_4^+ . Cette séquestration de GlnK-DraG jouerait un rôle crucial dans la régulation de l'activité de la nitrogénase. La formation du complexe GlnK-DraG-AmtB, provoque le déplacement de la protéine régulatrice DraG du cytoplasme et permettrait à

DraT d'ajouter le groupement ADP-ribose à la protéine Fe de la nitrogénase donc une séparation spatiale entre DraG et son substrat cytoplasmique préviendrait la réactivation de la nitrogénase (Tremblay et al. 2008).

R. capsulatus contient un autre gène semblable au gène *amtB*, *amtY*, qui n'est pas lié aux gènes codant pour les protéines PII. Sa fonction n'a pas été encore déterminée mais il semble que le produit d'expression de ce gène n'est pas un substitut d'AmtB (Masepohl et al. 2002; Masepohl et al. 2009).

4. Fixation d'azote en microaérobie

4.1. Bactéries diazotrophiques photosynthétiques

4.1.1. *Rhodobacter capsulatus*

Les chercheurs ont cru pour une longue période de temps que les bactéries phototrophiques comme *R. capsulatus* ne sont capables de fixer l'azote que dans des conditions entièrement anaérobies et en présence de la lumière. Ce n'est qu'en 1980 que Siefert et Pfenning ont montré pour la première fois que *R. capsulatus* peut croître d'une manière diazotrophique en microaérobie que ce soit à la noirceur ou à la lumière. Mais depuis, le terme microaérobie n'a pas été bien cerné et il n'a pas eu détermination de la concentration optimale de l'O₂ permettant l'expression et l'activité de la nitrogénase (Klein et al. 1993). La croissance chimiotrophique (microaérobie à la noirceur) a été montrée en utilisant la technique auxanographique "shake agar" (Siefert et al. 1980; Madigan et al. 1984). *R. capsulatus* est la souche la plus tolérante de la présence d'O₂ en fixant le N₂ (Madigan et al. 1984). Cependant, plusieurs études ont montré que l'activité de la nitrogénase est extrêmement dépendante de la présence de l'oxygène: à haute concentration, il est un très fort inhibiteur de la nitrogénase. La même étude avait montré que l'activité de la nitrogénase atteint 50% de la valeur mesurée dans des conditions de photosynthèse, en présence d'une concentration d'oxygène optimale de 10% de l'air atmosphérique. De plus ce groupe de recherche ont montré que les cellules incubées à la

noirceur tolèrent plus la présence d'oxygène dans leur environnement que les cellules cultivées en présence de la lumière (Siefert et al. 1980).

La ferrédoxine et la flavodoxine qui sont les principaux donneurs d'électrons à la nitrogénase sont également peu stables en présence d'oxygène. Les bactéries diazotrophiques ont développé des mécanismes qui leur permettent soit de protéger la nitrogénase, soit de réprimer son expression quand elles sont exposées à l'oxygène. Cette réponse générale demeure vraie pour tous les organismes diazotrophiques sans tenir compte du fait qu'il s'agit d'un organisme adapté à un environnement aérobie ou anaérobie (Klein et al. 1993).

4.1.2. Cyanobactéries

Les Cyanobactéries sont des procaryotes photoautotrophes qui peuvent se trouver dans tout environnement illuminé de la terre (Peter Wolk 2003; Compaoré et al. 2010). Plusieurs espèces de Cyanobactéries sont capables de fixer l'azote (Compaoré et al. 2010). Elles sont les seuls diazotrophes qui produisent actuellement l'oxygène comme sous-produit durant le processus de photosynthèse et qui doivent faire face à la présence des molécules d'O₂ avec une enzyme obligatoirement anaérobie (Berman-Frank et al. 2003). Leur activité photosynthétique génère suffisamment d'oxygène permettant l'inactivation de la nitrogénase. Pour éviter ce phénomène durant la phase de photosynthèse oxygénique, certaines de ces bactéries filamenteuses ont recours à la séquestration du processus de fixation d'azote dans des cellules spécialisées et différenciées et dont leur intérieur est microaérobie. Ces cellules sont dites: Hétérocystes (Peter Wolk 2003). Ces cellules se différencient complètement et irréversiblement 12 à 20h après que la source de nitrogène combiné soit éliminée du milieu (Berman-Frank et al. 2003).

La morphologie cellulaire des hétérocystes peut être prédite en tenant compte du fait que les hétérocystes représentent le site principal de fixation d'azote en aérobie. Sachant que la taille moléculaire de l'O₂ est très proche à celle de l'N₂, certaines molécules d'O₂ peuvent diffuser à l'intérieur des hétérocystes. La réduction du flux d'entrée de l'O₂ requiert la présence d'une barrière hydrophobique qui ne laisse passer ni les protéines ni les

carbohydrates. Les caractéristiques de cette barrière sont fournies par la couche de glycolipides qui la forme. Bien que les hétérocystes possèdent un photosystème de type I qu'ils utilisent pour générer de l'ATP, ils manquent de photosystème de type II producteur d'O₂. Néanmoins, pour maintenir la pression partielle pO₂ interne faible, ils doivent alors respirer rapidement. La fixation d'azote et la respiration ont toutes les deux besoin de réductants dont l'origine, chez les Cyanobactéries, est la photosynthèse oxygénique. C'est la raison pour laquelle les réductants utilisés par les hétérocystes doivent provenir des cellules végétatives voisines. Approximativement, la moitié des réductants générés par photosynthèse à travers un filament, supporte aussi bien les phénomènes de différenciation des hétérocystes, de fixation d'azote et de respiration réalisés par ces derniers. L'entrée du réductant et l'export de l'azote fixé nécessitent que les hétérocystes se joignent aux cellules végétatives pour former un canal ou un pore. Cependant, ce pore peut laisser passer l'O₂ à l'intérieure des hétérocystes. C'est la raison pour laquelle, il doit être très étroit.

La nitrogénase est distribuée partout au niveau du centre des hétérocystes. La couche glycolipidique de l'enveloppe des hétérocystes est alternativement entourée de couches de polysaccharides assurant sa protection des dommages physiques (Berman-Frank et al. 2003).

La formation des hétérocystes chez les Cyanobactéries, apparaît comme une réponse à une limitation en azote en une série d'étapes jusqu'à ce que la différenciation soit terminée (par exemple chez *Anabaena* PCC 7120 ceci peut prendre plus de 20h). Certaines réponses qui ont lieu durant les quatre premières heures, peuvent présenter des similarités chez les Cyanobactéries diazotrophiques et non diazotrophiques (Peter Wolk 2003). Néanmoins, certaines Cyanobactéries présentant des hétérocystes telles que *Anabaena variabilis* peuvent synthétiser une nitrogénase Mo-dépendante (*nif2*) dans leurs cellules végétatives en anaérobie. *Nif2* est très peu exprimé après épuisement de l'azote mais pas avant la formation des hétérocystes. Ce qui permet à cette bactérie de subvenir aux besoins de la fixation d'azote. *Nif2* a été également trouvé chez les cellules végétatives des espèces ne possédant pas d'hétérocystes. *fdxH2* est un gène faisant partie du cluster *nif2* chez *Anabaena variabilis* ATCC29413. Il code pour la ferredoxine [2Fe-2S] connu comme étant

le donneur direct d'électrons à la nitrogénase à l'intérieur des hétérocystes (Berman-Frank et al. 2003).

En effet, durant l'évolution planétaire, les Cyanobactéries ont évolué avec le changement de l'état d'oxydation de l'océan et de l'atmosphère afin de permettre la photosynthèse oxygénique et la fixation d'azote, sensible à l'oxygène, dans la même cellule ou dans une même colonie. Les stratégies adoptées par les Cyanobactéries sans hétérocystes ont été simplifiées afin de distinguer entre deux types d'adaptation: une séparation spatiale et/ou temporelle de la fixation d'azote et de la photosynthèse oxygénique. *Plectonema boryanum* est un exemple de Cyanobactérie filamenteuse sans hétérocystes, très bien étudié, et dont toutes ses cellules contiennent la même quantité de nitrogénase (figure 7) malgré qu'elle n'ait capable de fixer l'azote que dans des conditions de microaérobie (0.5% d'O₂ à la lumière et 1.5% d'O₂ dans la noirceur). Cependant *Plectonema* est incapable de fixer l'azote dans des conditions d'anaérobie, ce qui se traduit par un besoin d'oxygène nécessaire à la respiration représentant une source critique d'ATP et de réductants. Donc en microaérobie, *Plectonema* sépare temporellement la fixation d'azote de la photosynthèse oxygénique. De plus, la transcription des gènes de la fixation d'azote et de la photosynthèse est temporellement séparée dans la photopériode. Il y a d'autres espèces qui fixent l'azote seulement en microaérobie ou anaérobie, telles que: *Phormidium* et quelques espèces de *Pseudoanabaena* (Berman-Frank et al. 2003).

Toute fois, la fixation d'azote aérobie peut aussi avoir lieu chez les Cyanobactéries ne développant pas les hétérocystes, tels que : *Oscillatoria spp* (Spiller et al. 1987) et *Gloeothecae. Spp* (Berman-Frank et al. 2003). Ce groupe de Cyanobactérie est généralement trouvé sous forme d'un lot de filaments; ce qui peut limiter la diffusion d'O₂ à l'intérieur de la cellule (Spiller et al. 1987). Ces microorganismes fixent l'azote pendant la nuit et présentent une nitrogénase active dans pratiquement toutes leurs cellules (figure 7) (Berman-Frank et al. 2003). Des chercheurs, ont reporté que certaines espèces de *Synechococcus*, unicellulaires et qui croient en solitaire, ne produisent une activité nitrogénase que dans des conditions anaérobies (figure 7).

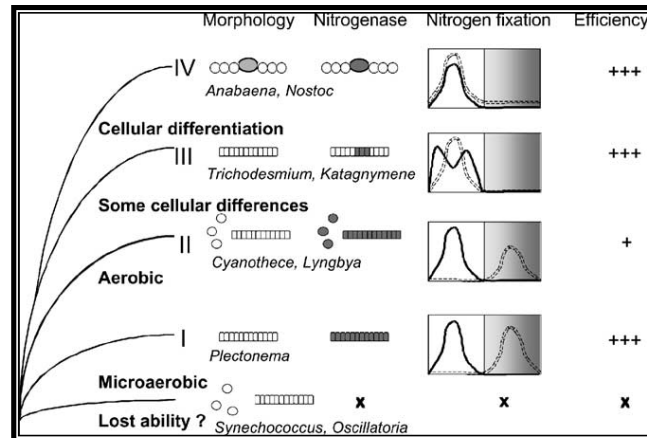


Figure 7 : Adaptations physiologiques et morphologiques permettant la fixation d'azote à différentes Cyanobactéries (Berman-Frank et al. 2003)

Bien qu'un autre groupe de recherche ait montré que certaines espèces de *Synechococcus* peuvent aussi produire une nitrogénase active en aérobie. Dans le cas de l'aérobie, l'activité de la nitrogénase aurait été maintenue par la respiration et par le faible niveau de lumière, et toute l'énergie requise pour ce processus proviendrait probablement de l'ATP (Spiller et al. 1987). Un autre exemple de ce type d'organisme est *Cyanothece* (ATCC51142) chez laquelle la fixation d'azote est faite durant la scotopériode. Ceci a lieu quand il s'agit de cellules cultivées pendant un cycle de transition entre lumière et noirceur ou durant la phase de noirceur subjective si les cellules sont cultivées en présence de lumière en continue. Une activité nitrogénase élevée coïncide avec un niveau de respiration assez élevé et un décalage de phase de 12 h entre la fixation d'azote et la photosynthèse. Ce modèle est également appliqué au niveau de la régulation transcriptionnelle ce qui impliquerait probablement un contrôle circadien (Berman-Frank et al. 2003).

Les cyanobactéries marines ne possédant pas d'hétérocystes, ont développé une autre forme de protection de leur nitrogénase. Contrairement aux autres espèces de Cyanobactéries, celle-ci fixe l'azote durant le jour et les mécanismes aux quels elles ont recours pour se protéger de l'O₂ élaboré par la photosynthèse, ont intrigué les chercheurs durant plusieurs années. *Trichodesmium* est un exemple très connu de cette espèce (figure 7). Chez cette dernière, la nitrogénase est compartimentée dans une fraction de cellules (entre 10 et 20%).

Toutefois, les composés photosynthétiques actifs (tels que: les complexes PSI, PSII) se trouvent dans toutes les cellules même ceux contenant la nitrogénase. D'où, dans certains cas la séparation spatiale n'est pas suffisante pour protéger la nitrogénase de l'évolution de l'oxygène, c'est la raison pour laquelle qu'une bonne fraction de nitrogénase peut être inhibée à n'importe quel moment du cycle. La protection contre les molécules d'O₂ chez *Trichodesmium* a été récemment expliquée comme étant une interaction complexe entre la ségrégation spatiale et temporelle entre les trois processus suivant: la respiration, la photosynthèse et la fixation d'azote. La transcription des gènes codants pour la nitrogénase ainsi que l'expression des gènes essentiels pour l'activation des photosystèmes de type I et II, sont sous le contrôle de l'horloge circadien. Les gènes *psaA* (PSI) et *psbA* (PSII) subissent un décalage de phase temporel de 6 h par rapport à l'expression des gènes *nifHDK* (codant pour la nitrogénase) chez *Trichodesmium* (Berman-Frank et al. 2003).

4.2. Bactéries diazotrophiques non photosynthétiques

Chez les micro-organismes fixateurs d'azote, l'activité de la nitrogénase est sensible à l'oxygène même chez les bactéries aérobies. C'est la raison pour laquelle les bactéries aérobies qui ont un métabolisme respiratoire stricte et n'ont pas un mécanisme de protection de leur nitrogénase efficace, fixent l'azote seulement dans des conditions de microaérobie: la concentration de l'oxygène dissout (DOC) est un facteur très important permettant simultanément la génération de l'énergie respiratoire et la fixation d'azote. Chez plusieurs bactéries vivant en symbiose dans la racine des herbes tels que: *Azospirillum spp.* et *Azoarcus spp.*, la DOC leur permettant la fixation de l'azote est de l'ordre des micromoles (Karg et al. 1996). Ces bactéries doivent échapper à la compétition avec les autres micro-organismes, vivants aussi en association avec la plante, afin d'atteindre un contact direct avec son hôte. Ce contact facilitera par conséquent l'échange mutuel de nutriments et permettra de fournir un environnement convenable à leur prolifération comme par exemple un environnement protecteur contre l'endommagement de la nitrogénase par l'O₂ (Steenhoudt et al. 2000).

4.2.1. Azoarcus

Les animaux ainsi que les plantes peuvent bénéficier de l'azote biologiquement fixé directement quand ils sont en association ou en symbiose avec des procaryotes fixateurs d'azote et indirectement après minéralisation de ces bactéries. Une des interactions les plus étudiées est la symbiose de *Rhizobium* en formant des nodules sur la racine des légumineuses. Cependant, des études ultérieures des diazotrophes associées aux herbes se sont focalisées sur les bactéries endophytiques. En effet, les micro-organismes endophytiques se multiplient et se propagent à l'intérieur des plantes sans lui causer de dommages. Malgré qu'ils envahissent les plantes, ils ne peuvent pas être considérés comme agents pathogènes ce qui leur rend très intéressant surtout quand ils contribuent à la fixation d'azote. *Azoarcus spp.* appartient à ce groupe de bactéries. *Azoarcus spp.* est une bactérie qui peut infecter le cortex de la racine d'une culture gnotobiotique.

Chez *Azoarcus sp.*BH72, les gènes structuraux de la nitrogénase *nifHDK* se trouvent sur le même opéron comme chez la majorité des diazotrophes, de plus le gène codant pour la ferrédoxine, donneur principal d'électrons à la nitrogénase, se trouve aussi sur le même transcrit. La capacité d'*Azoarcus sp.*BH72 à fixer l'azote atmosphérique a été démontré en utilisant le $^{15}\text{N}_2$. Les principaux agents intervenant dans la cascade de régulation qui ont été clonés, caractérisés et leurs rôles partiellement déterminés sont les trois protéines PII (codées par *glnB*, *glnK* et *glnY*), les transporteurs d'ammonium (codés par *amtB* et *amtY*) et les protéines régulatrices NifA et NifL (Hurek et al. 2003).

Chez *Azoarcus sp.*BH72, les cellules fixatrices d'azote sont caractérisées par la formation d'empilements intra-cytoplasmiques au niveau de leur membrane appelés: «diazosome». En présence de 2 μM d'oxygène dissous, les cellules fixatrices d'azote ne possèdent pas ce type de structure. Ils apparaissent quand l'organisme est transféré dans des conditions d'hyperinduction (en présence d'une concentration extrêmement faible d'oxygène), une phase durant laquelle le micro-organisme subit des changements physiologiques et morphologiques. Il y a aussi une augmentation de l'activité et de l'efficacité de la fixation d'azote dans le cas d'une culture "batch" optimisée en présence de proline (Karg et al.

1996; Steenhoudt et al. 2000; Hurek et al. 2003). Toutefois des études ont montré que la formation de ces empilements dépend non seulement de la DOC et de la proline mais aussi d'autres facteurs qui demeurent jusqu'à maintenant inconnus. À une DOC inférieure à 35 nM, l'activité de la nitrogénase ainsi que le taux maximum de respiration et l'affinité apparente à la consommation d'oxygène sont tous en croissance. En effet, les cellules d'hyperinduction développent les empilements intra-cytoplasmiques au même endroit où la protéine Fe a été détectée. Ce sont des structures fortement organisées (Karg et al. 1996). La formation reproductible de ces empilements intra-cytoplasmiques peut avoir lieu en faisant une co-culture de la souche BH72 avec une souche d'ascomycètes 2003 qui a été isolée de la racine de l'herbe «Kallar» plus qu'en une culture pure. Dans ces conditions, l'expression des protéines et l'état d'uridylation des protéines régulatrices centrales, les protéines PII, suggèrent que ce statut physiologique est en effet très différent de la fixation d'azote dans les conditions standard (Hurek et al. 2003). L'analyse génétique de la fonction de la membrane chez cet organisme est ardue vue les difficultés rencontrés dans le développement de mutants ne formant pas de «diazomes» (Karg et al. 1996). L'analyse du génome facilitera l'élucidation de cet état physiologique et la détermination du rôle des protéines membranaires moyennant la protéomique et l'analyse du transcriptome (Hurek et al. 2003). Des études d'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques à la protéine Fe (*nifH*) du complexe enzymatique de la nitrogénase, ont montré que cette dernière est principalement associée aux nouvelles membranes formées dans ces conditions tandis qu'elle se trouve dans le cytoplasme dans des conditions standard de fixation d'azote chez cet organisme (Steenhoudt et al. 2000).

Karg et al ont démontré la présence de beaucoup de changements au niveau du protéome quand la bactérie présente des «diazomes». En effet, la concentration de 7.3% des protéines formées dans les conditions standard de fixation d'azote, diminue. Il paraît alors que les cellules développant les «diazomes» présentent seulement 73% des protéines présentes dans les conditions standard (Karg et al. 1996).

4.2.2. *Azospirillum*

La physiologie des bactéries fixatrices d'azote appartenant au genre *Azospirillum* a fait l'objet de beaucoup d'études depuis plusieurs années (Tsagou et al. 2003). Ce genre a été connu depuis longtemps comme un PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) (Steenhoudt et al. 2000). *Azospirillum* est une bactérie Gram négative, hétérotrophique, diazotrophique, et qui vit en symbiose avec certaines plantes. Elle est très abondante aussi bien dans les rhizosphères de certains herbacés bien spécifiques que dans la racine de certains céréales tels que le maïs, le blé et le riz (Westby et al. 1987; Marchal et al. 1998; Steenhoudt et al. 2000). Donc la bactérie reçoit le carbone photosynthétique de la plante et en contre partie elle lui transmet son azote fixé (Westby et al. 1987). Le genre *Azospirillum* comprend 5 espèces principales qui ont été bien étudiées: *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopraeferens* et *Azospirillum irakense* (Zhang et al. 1997).

Azospirillum est capable de convertir le nitrogène atmosphérique moléculaire en ammonium en microaérobie et en présence d'une limitation en azote sous l'action du complexe protéique de la nitrogénase. Cependant, il s'est avéré que les métabolites tels que l'ammonium, la glutamine, le nitrate ainsi que le nitrite répriment le processus de fixation d'azote (Steenhoudt et al. 2000; Tsagou et al. 2003). Un groupe de recherche avait rapporté que la répression de l'expression du gène *nifA* chez *Azospirillum* résulte d'une synergie entre l'ammonium et l'oxygène. Alors il faudrait donner beaucoup d'importance à l'effet de l'ammonium sur la croissance et les activités métaboliques d'*Azospirillum spp*, puisque ce métabolite se trouve dans la majorité des terrains cultivés (Tsagou et al. 2003).

Une autre espèce d'*Azospirillum* qui a été très bien étudiée, est *Azospirillum brasilense*. C'est l'espèce la plus caractérisée génétiquement et physiologiquement (Zhang et al. 1997; Marchal et al. 1998). Cette souche a été utilisée dans la majorité des études génétiques réalisées dans la fixation d'azote chez l'espèce *Azospirillum* (Steenhoudt et al. 2000). En présence du nitrogène combiné, cette bactérie est capable de croître en anaérobie, en aérobie et en microaérobie: en anaérobie et en présence de NO₃, la dénitrification fournit

l'énergie nécessaire à la croissance. En microaérobie, *Azospirillum brasilense* peut réduire le N₂ moléculaire en absence de nitrogène combiné. Alors qu'en aérobie et aussi en microaérobie, l'oxygène est utilisé comme accepteur final d'électrons. Il semble alors que le cytochrome *cbb3* oxydase, codé par l'opéron *fixNOQP*, est responsable de la respiration microaérobie chez cette bactérie. Le cytochrome *cbb3* est de type cytochrome c terminal oxydase appartenant à la superfamille des oxydases «hème-cuivre». Chez la majorité des espèces rhizobiales, cette oxydase est essentielle à la fixation d'azote et elle est caractérisée par une affinité extrêmement élevée à l'oxygène. Cependant, chez *R. capsulatus*, cette oxydase intervient dans la respiration aérobie et ne fonctionne pas comme oxydase principale durant la fixation d'azote en microaérobie.

L'analyse de certaines cultures bactériennes d'*A. brasilense* a été réalisée par un groupe de recherche (Marchal et al. 1998). Ils ont montré qu'en microaérobie, un taux de respiration élevé supportant une production efficace d'énergie, permet d'avoir un taux de croissance similaire à celui obtenue avec une culture munie en aérobie malgré la faible concentration d'oxygène dissous présent dans le milieu. Alors comme le mutant en cytochrome *cbb3* était incapable de donner une telle croissance, ils ont pu conclure que le cytochrome *cbb3* oxydase pourrait être responsable du niveau de respiration élevé en présence d'une faible concentration d'oxygène dissous. Durant la fixation d'azote, le taux de croissance spécifique de la souche sauvage était beaucoup moins important que celui noté en présence d'ammonium, et comme la fixation d'azote est un processus fortement énergétique, un déficit en ATP peut être probablement la cause qui limite la croissance cellulaire. Ceci semble être le cas de tous les micro-organismes symbiotiques tels que les espèces *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, chez qui la fixation d'azote a lieu dans les nodules. Alors ces nodules créent un environnement où la concentration de l'O₂ est la plus faible que possible afin de protéger la nitrogénase et fonctionne simultanément comme un système de livraison de l'O₂ à l'oxydase du cytochrome *cbb3* terminal à haute affinité. Cette oxydase permet d'avoir un niveau de respiration élevé et la génération d'une force motrice de protons à des concentrations d'O₂ très faibles (de l'ordre de nanomoles) (Marchal et al. 1998).

A. brasilense possède un système de régulation de la fixation d'azote unique et assez compliqué. La régulation de la transcription des gènes *nif* requiert différents systèmes en plus du système *ntr* (Zhang et al. 1997). Sachant que la réduction du diazote atmosphérique en ammonium est une réaction fortement endothermique et que la nitrogénase est un complexe enzymatique fortement sensible à l'O₂, la fixation biologique de l'azote est un processus hautement régulé: à un niveau transcriptionnel et posttraductionnel. Contrairement à ce qui est commun aux bactéries entériques, les gènes *ntrBC* ne semblent pas être localisés près du gène *glnA*; de plus il s'est avéré qu'ils ne sont pas essentiels à la fixation d'azote puisqu'une étude du mutant *ntrC*⁻ a montré qu'il ne présente pas un phénotype *nif*⁻. L'expression des gènes structuraux requiert NtrA et l'activateur transcriptionnel NifA. Après l'attachement de NifA à la séquence qui se trouve en amont de l'activateur, ce dernier interagit avec l'ARN polymérase qui se fait simultanément avec l'hydrolyse de l'ATP. Par conséquent il y aura formation d'un complexe promoteur ouvert et une initiation de la transcription. Chez *A. brasilense*, *nifA* est constitutivement exprimé indépendamment de la présence ou de l'absence d'azote et de la concentration d'O₂. Toutefois, son taux transcriptionnel est moins important dans un environnement incompatible avec la fixation d'azote. De plus, en présence d'ammonium ou d'O₂ à forte concentration, l'activité de NifA est modulée. Il a été démontré que quatre résidus cystéine espacés, similaires et conservés sont responsables de la sensibilité de l'activité de NifA à l'O₂.

La régulation de la fixation d'azote chez *A. brasilense* se fait aussi à un niveau posttraductionnel. L'inactivation de la nitrogénase, suite à un "shift" de la microaérobie à l'anaérobie ou à un choc d'ammonium, est médiée par le système DRAT/DRAG (Figure 8). Mais il a été démontré que la seule différence est le fait que les modifications posttraductionnelles survenues suite à une forte concentration d'O₂, sont indépendantes de la protéine Fe sachant que DRAT et DRAG font elles même l'objet de la régulation posttraductionnelle. Donc, plusieurs stimuli environnementaux (NH₄⁺, anaérobie) utilisent indépendamment des voies de transduction du signal afin d'affecter le système d'ADP-ribosylation réversible (Steenhoudt et al. 2000).

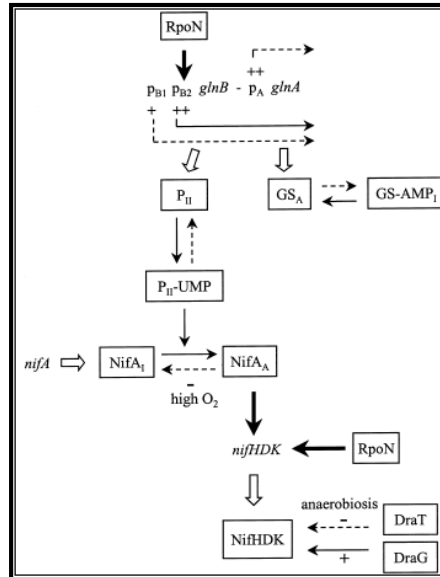


Figure 8 : Modèle proposé de la régulation de la synthèse et de l'activité de la nitrogénase chez *A. brasilense* (Steenhoudt et al. 2000)

5. Description du sujet de recherche

Les études faites à la lumière et avec le mode de croissance préféré de *R. capsulatus* (photosynthèse anaérobie), ont montré que la nitrogénase (enzyme responsable de la fixation du diazote) est sujet d'une régulation à trois niveaux: une régulation transcriptionnelle de NifA (protéine activatrice de la transcription des gènes *nif*), une régulation post-traductionnelle de l'activité de NifA envers l'activation de la transcription des autres gènes *nif*, et la régulation post-traductionnelle de l'activité de la nitrogénase quand les cellules sont soumises à un choc d'ammoniaque. Le système de régulation développé fait intervenir essentiellement une protéine membranaire, AmtB, et les deux protéines PII, GlnB et GlnK. Or, *R. capsulatus* présente une caractéristique très importante. Elle est capable de fixer l'azote et de croître aussi bien dans des conditions de photosynthèse anaérobie que dans des conditions de microaérobie à la noirceur. Mais jusqu'aujourd'hui, on ignore si ces mêmes systèmes interviennent également dans la régulation de la fixation de l'azote à la noirceur. Ainsi, on a pensé à identifier les protéines qui peuvent intervenir dans l'inactivation de la nitrogénase lorsqu'une culture

photosynthétique est placée à la noirceur. Pour trouver la réponse à ceci, une analyse de plusieurs souches mutantes, *amtB*⁻, *glnK*⁻, *glnB*⁻ et *amtY*⁻ poussées dans conditions limitantes en azote, serait une alternative afin de déterminer si les protéines impliquées dans la réponse à un manque d'ammoniaque, le sont aussi en réponse à un manque de lumière ou d'énergie. De plus, *R. capsulatus* est capable de faire la fixation de l'azote dans l'obscurité mais jusqu'à maintenant sa régulation dans ces conditions est peu étudiée. Dans ce cadre, on va essayer de déterminer les conditions optimales permettant à la bactérie de fixer l'azote en microaérobie à la noirceur. On va aussi étudier les rôles d'AmtB, de GlnK, d'AmtY et de GlnB dans la régulation de la synthèse et de l'activité de la nitrogénase dans les conditions de microaérobie à la noirceur. Ce mémoire serait donc un premier pas dans la compréhension des systèmes de régulation de la fixation d'azote chez les bactéries photosynthétiques à l'obscurité.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Matériels biologiques

1.1. Souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes de *Rhodobacter capsulatus* utilisées pour la réalisation de ce projet de maîtrise sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau I: Les souches bactériennes utilisées

Souches	caractéristiques	références
SB 1003	<i>rif^r</i> ; souche sauvage	(Yen et al. 1976)
RCAY22	<i>amtY::Gm^r</i>	(Tremblay et al. 2007)
RCAY63	<i>amtB :: Km^r</i>	(Yakunin et al. 2002)
PHU332	<i>glnB::Km^r</i>	(Tremblay et al. 2007)
BSRUB13	$\Delta glnK$	(Tremblay et al. 2007)
RC34	<i>adgA^r</i>	(Willison et al. 1994)
W107I	<i>draTG::Gm^r</i>	(Masepohl et al. 1993)
R346AI	<i>fdxN:: Gm^r</i>	(Schmehl et al. 1993)
R363II	$\Delta rnfA::Tcr$	(Schmehl et al. 1993)

1.2. Milieux de culture

On utilise essentiellement deux types de milieux de culture: YPS (Yeast extract, peptone, sels) et RCV (Na-lactate, sels, tampon K-phosphate pH 6.8).

2. Méthodes

2.1. Croissance des cellules

2.1.1. Décongélation et propagation des cellules

Les cellules bactériennes sont conservées à -80°C dans des tubes spécialisés contenant 1 ml de glycérol 100%. La décongélation se fait en mettant tout le contenu du tube dans le milieu riche YPS. Après 24h d'incubation à la lumière à 30°C , 1 ml de la culture est transféré dans le milieu RCV contenant le Na-lactate (10%) comme source de carbone et le NH_4Cl à 20 mM comme source d'azote. Ensuite, un volume de 1 ml est placé dans du RCV seul si une culture sans aucune source d'ammonium est nécessaire. Toutes les cultures sont faites dans des conditions d'anaérobie. L'incubation à la lumière se fait dans un incubateur "Biotronette mark III environmental chamber" (Labline Instruments) muni de 3 lampes de 150W.

2.2. Étude de l'inactivation de la nitrogénase dans la noirceur

2.2.1. Dosage de l'activité de la nitrogénase

Un volume de 5 ml est prélevé à partir d'une culture photosynthétique (à la lumière et en anaérobie) poussée 24h sur le milieu de culture RCV à 30°C . Le transfert se fait d'une manière anaérobique dans un flacon de 25 ml fermé avec un bouchon étanche et après avoir ajouté de l'argon pendant 10 min. Ensuite les flacons sont incubés 15 min dans un bain marie à 30°C . Puis 2 ml d'acétylène sont ajoutés à la culture. Après 5 min d'incubation, 50 μl de la phase gazeuse sont utilisés pour la détermination de la quantité d'éthylène produit par CPG (chromatographie en phase gazeuse) (figure 9) et 100 μl de la phase liquide sont utilisés pour la visualisation de l'état de modification de la protéine Fe par western blot.



Figure 9 : Chromatographie en phase gazeuse

Le suivi de l'activité de la nitrogénase se fait pendant 20 min avec des injections chaque 5 min. La culture est ensuite incubée pendant 20 min dans la noirceur et ce en couvrant le flacon avec du papier aluminium (figure 10). Pendant ce temps là, les injections sont poursuivies. Et enfin, la culture est remise à la lumière en continuant à prendre chaque 5 min des échantillons de la phase gazeuse et de la phase liquide.

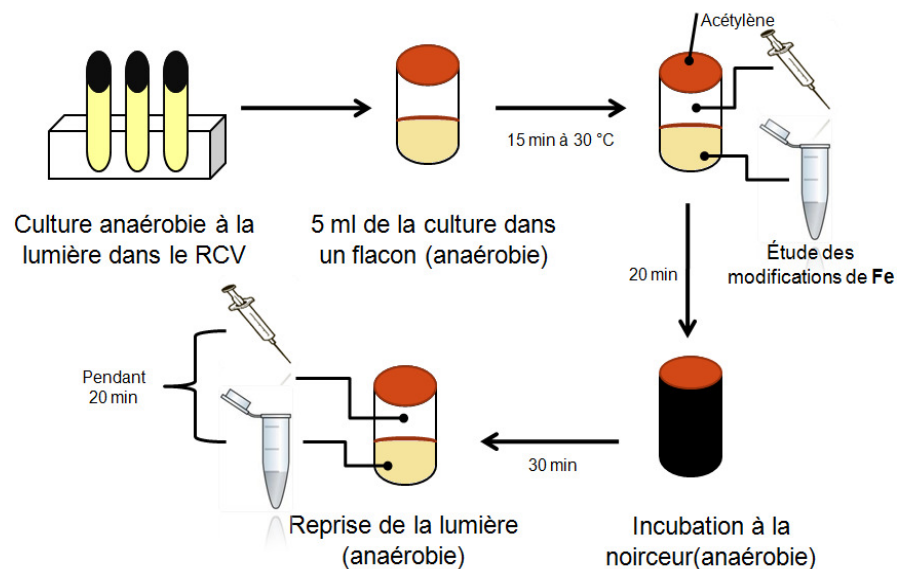


Figure 10 : Protocole du dosage de l'activité de la nitrogénase

Les pics, enregistrés par la chromatographie en phase gazeuse, servent pour calculer la quantité d'éthylène produit. La quantité d'éthylène produit est déterminée selon l'équation suivante:

$$\text{Éthylène produit (nmol)} = \text{hauteur du pic (mm)} \times \text{atténuation} \times \text{facteur de conversion}$$

2.2.2. Étude de la modification de la protéine Fe

Cette étude se fait en ayant recours à une technique d'immuno-détection: «Western Blot». C'est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques. Les prélèvements réalisés à partir de la phase liquide durant le test d'activité de la nitrogénase, sont utilisés pour cette étude. Un volume de 100 µl est prélevé de la phase liquide et conservé à -20°C dans 50 µl du tampon d'échantillon (3X) dont la composition est la suivante: 3 ml Tris 0,63M pH6.8, 3 ml SDS 20%, 3 ml Glycérol 100%, 30 µl du Bleu de bromophénol 1% et 1,5 ml de β-mercapto-éthanol.

2.2.2.1. Migration sur gel SDS

Tout d'abord, les échantillons dénaturés à 100°C sont migrés sur un gel SDS pour permettre aux protéines de migrer selon leurs poids moléculaire. Nous avons utilisé pour ceci un appareil de type "Mini Protean II Electrophoresis cell" de Biorad (figure 11).



Figure 11 : L'appareil "Mini protean II electrophoresis cell" de Biorad

Donc 15 µl de chaque échantillon ont été migrés sur un gel de polyacrylamide de 15% (acrylamide/bis-acrylamide = 30%/0.2%) à 200V pendant une heure. Le tampon d'électrophorèse qui a été utilisé, est composé de: Tris, Glycine et SDS (10%) et le marqueur protéique est le "Prestained Protein Marker Broad Range" de NEB.

2.2.2.2. *Transfert sur membrane*

Les protéines qui ont migré sur le gel SDS, ont été transférées sur une membrane de PVDF "Polyvinylidene Difluoride" traitée au préalable avec le méthanol 100% pendant 1 minute. Le tampon de transfert utilisé est composé de méthanol (20%), de 25 mM de Tris et de 0,19 M de Glycine. Après migration, le gel SDS est incubé pendant 10 min dans le tampon de transfert sous agitation. Avant de faire le montage de transfert, le papier Whatman ainsi que les plaques en mousse sont placés en premier dans un bain d'eau puis dans un bain du tampon de transfert. Le transfert est réalisé sous un voltage de 16V "overnight" en utilisant l'appareil "Mini Trans-Blot cell" de Biorad (figure 12).



Figure 12 : L'appareil "Mini Trans-Blot cell" de Biorad

2.2.2.3. *Visualisation*

La visualisation se fait en utilisant une technique d'immuno-détection. On utilise alors un anticorps de lapin, développé et purifié au laboratoire, dirigé contre la protéine Fe. Après transfert, la membrane de PVDF est lavée deux fois avec le tampon TBST « Tris-

Buffered Saline avec Tween » pendant 5 min chaque fois. Le TBST est préparé à partir du TBS (25 mM de Tris pH 7,4 et de 0,15 M de NaCl) additionné de 500 µl de Tween 20 (0.1%). Puis, elle est incubée dans la solution de blocage (TBST contenant 5% de lait en poudre) pendant 30 min. Ensuite, la membrane est encore lavée deux fois avec le tampon TBST. Cette étape vise à diminuer le nombre de sites non spécifiques. Après les deux lavages, la membrane est incubée pendant 2h dans la solution de blocage contenant l'anticorps anti-Fe dilué à 1/5000. La membrane est encore lavée deux fois avec le tampon TBST, et enfin incubée dans la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire anti-anti-Fe dilué à 1/25000 (anticorps dirigé contre les IgG de lapin couplé à une peroxydase). Cette dernière incubation est suivie de 3 lavages au TBST et un dernier lavage au TBS «Tris-Buffered Saline sans Tween». Une solution composée de Glycine (100 mM), d'iodophénol (50Mm), de luminol (10 mM), d'eau et de H₂O₂ (30%) est utilisée pour la révélation. La lumière émise sous l'action de la peroxydase sert à impressionner un film photographique à rayon X.

2.2.3. Détermination du ratio NAD/NADH

2.2.3.1. Principe

Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la réduction des sels de tétrazolium. Cette méthode est rapide, simple, sensible et rentable surtout sur le plan industriel. L'éthanol est convertit en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase et le NADH formé, va transférer son hydrogène via le système phénazine méthosulfate-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (PMS-MTT) pour produire à la fin le formazan MTT pourpre moyennant son activité redox. Ainsi, l'alcool déshydrogénase, convertit le NAD en NADH eu utilisant l'éthanol puis elle convertit les sels de MTT de couleur jaune en cristaux insolubles et pourpres de formazan en utilisant le NADH ou le NADPH comme co-enzyme (Figure 13). Puis la solution de formazan obtenue est utilisée pour une lecture spectrophotométrique après que les solvants organiques aient dissout les cristaux. Les déshydrogénases ont été largement utilisées dans des essais enzymatiques de plusieurs composés d'intérêt industriels. L'alcool déshydrogénase (alcool: NAD⁺

oxidoréductase) de la levure de boulangerie a été purifiée et ses propriétés ont été déterminées. Sa fonction physiologique est de catalyser l'oxydation réversible de l'alcool en composés carbonyles; elle a un poids moléculaire assez élevé (150 kDa) et elle interagit de la même manière avec les autres alcools aliphatiques malgré sa faible affinité avec ces derniers (qui est proportionnelle au nombre de carbones) (Zanon et al. 2007).

Des études précédentes, ont montré que le cofacteur NAD/NADH est solidement relié au site actif de l'enzyme sous sa forme cristalline et ne peut pas être éliminé de cet endroit. Cependant, le cofacteur va se dissocier dans les cristaux de l'apoenzyme ce qui nous permettra d'étudier l'oxydation de NADH en étant attaché à l'enzyme (Pacaud-Mercier et al. 2007).

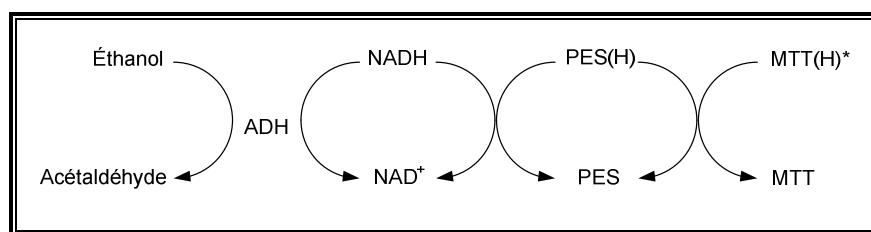


Figure 13 : Réduction des sels de tétrazolium par ADH

2.2.3.2. Protocole

Ce protocole a été mis au point et a été essayé pour la première fois avec *R. capsulatus*. Un volume de 5 ml de la culture bactérienne est prélevé et placé dans un tube eppendorf après 20 min d'incubation dans la noirceur ou après l'ajout de 100 μ l d'une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$ à 2.5 M. Les échantillons prélevés sont centrifugés pendant 1 min à 15 000 r.p.m pour récupérer seulement les cellules bactériennes dans le culot. On procède alors à l'extraction des coenzymes NAD et NADH. L'extraction de NAD se fait en traitant de culot par 300 μ l d'une solution de HCl (0.2N) alors que l'extraction de NADH est réalisée en traitant le culot par 300 μ l d'une solution de NaOH (0.2M). Cette étape est très importante et très délicate, raison pour laquelle on ajoute l'acide ou la base goutte à goutte et en vortexant de temps en temps. Les échantillons sont ensuite chauffés ($T= 50^\circ\text{C}$) pendant 10 min puis directement placés dans de la glace ($T= 0^\circ\text{C}$). Un volume de 300 μ l

d'une solution de NaOH (0.1N) est utilisé pour neutraliser les extraits de NAD tandis qu'un volume de 300 μl d'une solution de HCl (0.1N) est utilisé pour neutraliser les extraits de NADH. Une deuxième centrifugation pendant 5 min à 15 000 r.p.m nous permet d'éliminer les débris cellulaires et de récupérer les extraits contenant le NAD et le NADH dans le surnageant. Dans un tube eppendorf, 200 μl de l'extrait neutralisé sont ajoutés à 250 μl du mélange réactionnel composé d'un même volume du tampon tricine (pH=8), de MTT (3(-4,5-diméthyl-thiazoyl-2)-2,5-diphényltétrazolium bromide 4.2 mM), d'éthanol absolu, d'EDTA (40mM) et un volume de PES (phénazine éthosulfate 1.66 mM) préincubé à 30°C. À ce mélange, on a ajouté 50 μl de l'alcool déshydrogénase préparée dans le tampon tricine à 1M (200U/ml). Et enfin, la quantité de MTT réduit est déterminée par un dosage spectroscopique à 570 nm à t_0 (avant l'ajout de l'ADH) et t_{15} (t=15 min après ajout de l'ADH).

La réaction est arrêtée après 15 min en ajoutant 250 μl d'une solution de NaCl (5M) suivie d'une centrifugation pendant 5 min à 15 000 r.p.m. Enfin, le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol 95%.

Tableau II : Préparation des solutions standards

Concentration de la solution standard	Volume prélevé de la solution S_0 de 10 μM (μl)	Volume d'eau ajouté (μl)
$S_1 = 0 \mu\text{M}$	0	100
$S_2 = 2 \mu\text{M}$	20	80
$S_3 = 4 \mu\text{M}$	40	60
$S_4 = 8 \mu\text{M}$	80	20
$S_5 = 10 \mu\text{M}$	100	0

Les courbes étalons sont réalisées en utilisant des solutions standard de NAD et de NADH: 0 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM et 10 μM . La préparation des solutions standards a été réalisée comme l'indique le tableau II. Ce test est réalisé pour deux souches: SB1003 et RC34.

2.3. Étude de la fixation d'azote en microaérobie et à la noirceur

2.3.1. Culture en "Shake agar"

Cet essai permet de tester la sensibilité de *R. capsulatus* à l'O₂. Il s'agit de faire des cultures sur un milieu solide dans des tubes de 17 ml en présence d'oxygène atmosphérique. Le milieu utilisé est le RCV à 1,5% d'agar et en absence de source d'ammonium dans le milieu. On place alors 10 ml du milieu dans chaque tube et on les stérilise. À la sortie de l'autoclave, on les met dans un bain-marie à 42°C. Chaque tube est inoculé avec 1 ml d'une culture photosynthétique (anaérobie) de *R. capsulatus*. Ensuite, la culture est homogénéisée en faisant renverser le tube. Puis on fait refroidir les tubes jusqu'à ce que l'agar se solidifie. Les tubes sont enfin incubés à 30°C à la noirceur. Ce test est réalisé pour différentes souches: SB1003, BSRUB13, RCAY22, RCAY63 et PHU331.

2.3.2. Culture dans les "erlenmeyer"

Ce test permet de vérifier la capacité de *R. capsulatus* à croître dans les mêmes conditions que le test "shake-agar" (en présence de l'air atmosphérique et à la noirceur) mais cette fois-ci sur un milieu liquide. La culture se fait dans des "Erlenmeyers" de 125 ml contenant 90 ml de RCV liquide. Les conditions de culture sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau III). Ce même test est réalisé pour toutes les souches suivantes: SB1003, R363II, R346AI, RCAY22 et RVAY63.

Après la mise en culture, les "erlens" sont incubées à 30°C sous une agitation de 70 r.p.m. Le suivi journalier de la croissance cellulaire se fait par un dosage spectrophotométrique à 600 nm.

Tableau III : Conditions de préparation des cultures

Culture	Tampon phosphate (0.64 M)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (10%)	Glutamate (10%)	Innoculum
1 - 0 mM NH ₄	3 ml	0	0	5 ml
2 - 1 mM NH ₄	3 ml	0.065 ml	0	5 ml
3 - 2 mM NH ₄	3 ml	0.13 ml	0	5 ml

4 - 5 mM NH ₄	3 ml	0.33 ml	0	5 ml
5 - 10 mM NH ₄	3 ml	0.65 ml	0	5 ml
6 - 30 mM NH ₄	3 ml	2 ml	0	5 ml
7 - 7 mM Glu	3 ml	0	1.3 ml	5 ml

2.3.3. Culture dans le "Bioflow C30"

Dans cette étude, on a déterminé la concentration optimale d'O₂ permettant à *R. capsulatus* de croître dans des conditions fixatrices d'azote (sans inhiber sa nitrogénase). Alors il a fallu utiliser un système plus ou moins stable tel qu'un biofermenteur: "Bioflow C30" (figure 14). Le biofermenteur utilisé est de la marque "NEW BRUNSWICK". Il est équipé d'un système d'agitation lié magnétiquement à un moteur et d'un tube avec un petit bout perforé permettant l'injection de gaz. Il est constitué d'une cuve en verre et il est muni d'un système de contrôle de la température de telle manière qu'il permet de la maintenir à 30°C.



Figure 14: "Bioflow C30"

Il s'agit d'une culture munie en mode "fed-batch" puisque seul l'oxygène est introduit en continu au système (l'unique entrée et sortie correspond à l'O₂). En effet, c'est un

mélangeur de gaz au quel on introduit deux gaz purs, qui nous permet d'obtenir un mélange gazeux à des proportions connues de nitrogène et d'oxygène. Ce mélange est renouvelé en continu au cours de la culture. On a fixé le débit du nitrogène à 6 ml/min puis on a commencé à varier la concentration d'oxygène jusqu'à ce qu'on arrive à avoir une bonne croissance puisqu'on n'a aucune idée sur la concentration d'O₂ permettant à *R. capsulatus* de fixer l'azote dans des conditions de microaérobie.

Le volume réactionnel utilisé est de 350 ml. La cuve du "Bioflow C30" est enveloppée de papier aluminium afin d'éliminer la lumière. Le plan des expériences est résumé dans le tableau IV.

Tableau IV: Conditions des cultures munies dans le "Bioflow C30"

Culture	Tampon phosphate (0.64 M)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (10%)	Innoculum
20 mM de NH ₄	10.5 ml	4,5 ml	10 ml
4 mM de NH ₄	10.5 ml	900 µl	10 ml
0 mM de NH ₄	10.5 ml	0	10 ml

Le suivi journalier de la croissance cellulaire se fait par un dosage spectrophotométrique à 600 nm. Au moment où la densité optique dépasse le 1 on commence le dosage de l'activité de la nitrogénase et la visualisation de la protéine Fe par Western blot.

1. Étude de l'inactivation de la nitrogénase en anaérobie à la noirceur

Les systèmes de régulation de la nitrogénase suite à un choc d'ammonium dans le cas des cultures menées dans des conditions de photosynthèse, sont très bien expliqués. On a voulu alors vérifier si ces mêmes systèmes interviennent aussi suite à un choc de noirceur. C'est pour cette raison qu'on a étudié l'effet de l'élimination de la source d'énergie à une culture photosynthétique de la souche sauvage de *R. capsulatus* et des souches mutantes en les principales protéines du système de régulation: GlnK, GlnB, AmtB, AmtY, DraG et DraT.

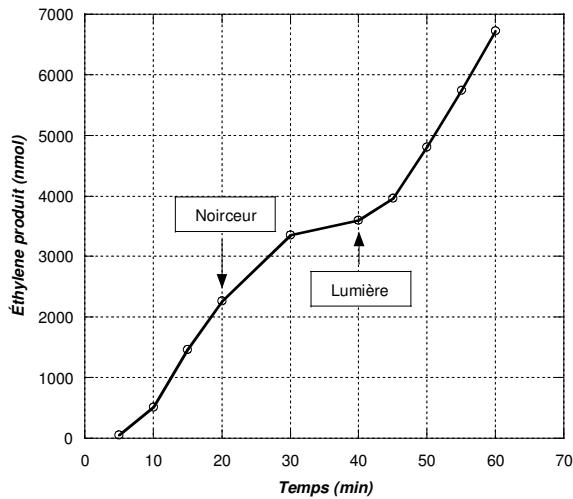
1.1. Suivi de l'activité de la nitrogénase suite à un choc de noirceur

Au moment où la densité optique de la culture dans le RCV sans source d'azote ajouté, est autour de 1, un échantillon de 5 ml est prélevé et utilisé pour voir l'effet d'un choc de noirceur de 20 min sur l'activité de la nitrogénase. Les courbes représentatives de la variation de l'activité de la nitrogénase chez toutes les souches analysées sont présentées dans la figure 16. On remarque que chez la souche sauvage de *R. capsulatus* et le mutant *glnK* (BSRUB13) (figure 15A & C), l'incubation dans la noirceur induit un "switch-off" de l'activité de la nitrogénase. Cette activité reprend lentement juste après reprise de la lumière. Ce qui n'est pas le cas chez les souches PHU332 (*glnB*⁻) et RCAY22 (*amtY*⁻). Chez ces dernières, l'incubation à la noirceur provoque un "switch-off" retardé de l'activité de la nitrogénase (à la 45^{ème} minute du test) et qui reprend très rapidement (Figure 15B & D).

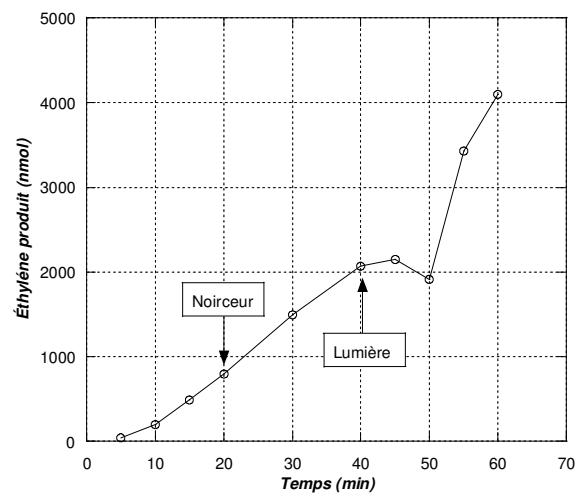
Chez la souche RCAY63 (*amtB*⁻), la courbe représentée à la figure 15E est totalement linéaire, ce qui nous permet de déduire que l'incubation à la noirceur pendant 20 min n'a aucun effet sur l'activité de la nitrogénase chez cette dernière.

Quant à la souche D107II (*draG/draT*), la courbe représentative de la variation de l'activité de la nitrogénase (Figure 15F) présente une pente presque linéaire même durant l'incubation à la noirceur. On observe un léger ralentissement mais pas un arrêt. On peut conclure alors que la noirceur affecte légèrement l'activité de la nitrogénase mais sans provoquer un "switch-off" complet.

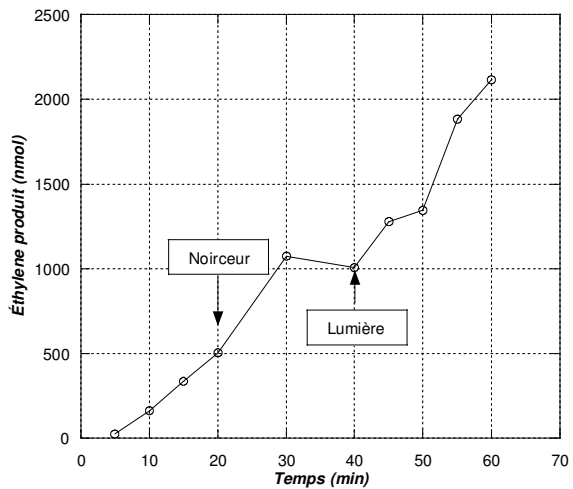
A)



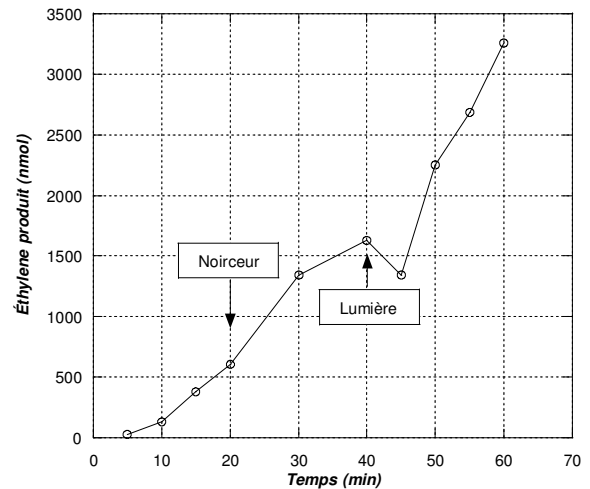
B)



C)



D)



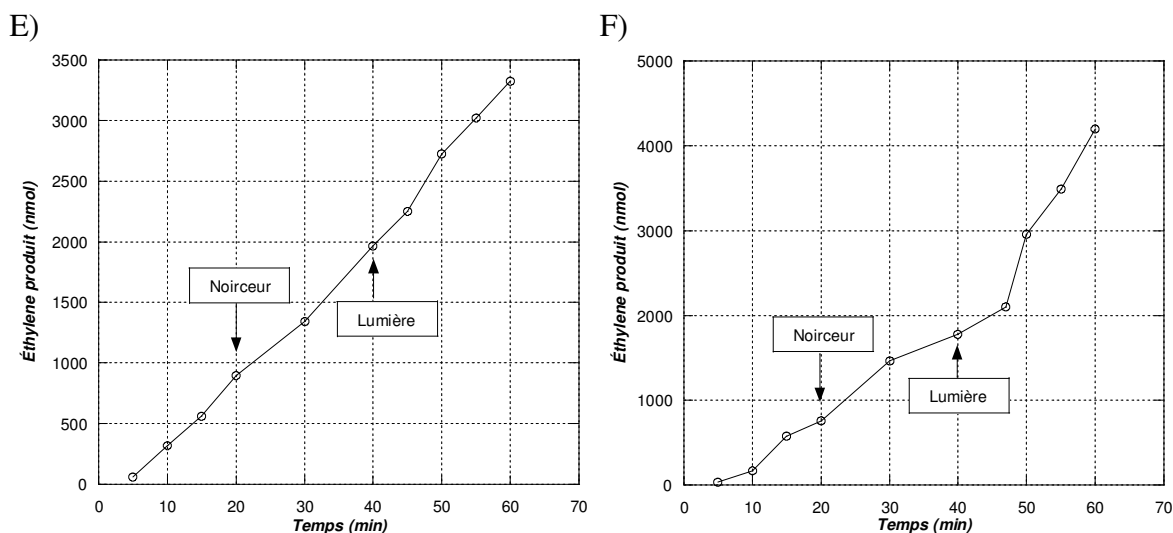


Figure 15 : suivi de l'activité de la nitrogénase chez différentes souches de *R. capsulatus* (A: souche sauvage; B: *glnB*⁻; C: *glnK*⁻; D: *amtY*⁻; E: *amtB*⁻ et F: *draG*⁻/*draT*⁻)

1.2. Étude de l'état de modification de la protéine Fe

La visualisation de l'état de modification de la protéine Fe par Western Blot nous permettra de déterminer si une ADP-ribosylation est à l'origine du "switch-off" de l'activité de la nitrogénase. D'après la figure 16A, pendant l'incubation à la noirceur la protéine Fe est ADP-ribosylée mais au moment où on reprend la lumière, on remarque que l'intensité de la bande correspondant à l'ADP-ribose commence à diminuer jusqu'à ce qu'elle disparaît complètement. On peut alors en conclure que le "switch-off" de l'activité de la nitrogénase chez la souche sauvage de *R. capsulatus* est dû à une ADP-ribosylation de la protéine Fe. Chez le reste des souches, la protéine Fe présente le même état avant et après incubation à la noirceur. Ainsi le "switch-off" de l'activité de la nitrogénase chez les mutants *GlnB*⁻, *GlnK*⁻ et *AmtY*⁻ (Figure 15B, C & D) est ADP-ribose indépendant (figure 16B, C & D). Et enfin, l'absence du "switch-off" de l'activité de la nitrogénase chez les mutant *AmtB*⁻ et *DraG*⁻/*DraT*⁻ est confirmée par l'état non modifiée de leur protéine Fe (Figure 16E & F).

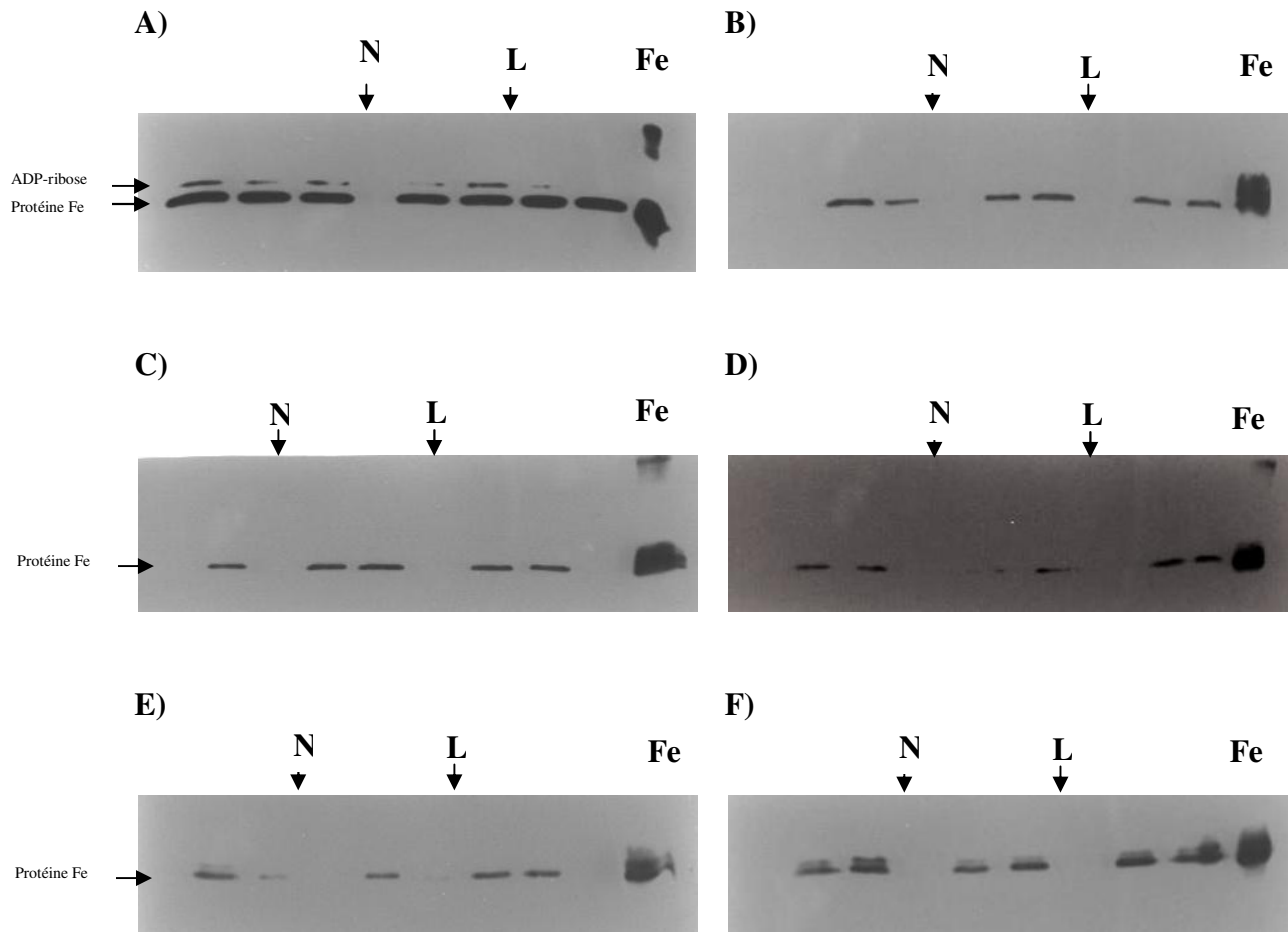


Figure 16: Visualisation de l'état de la protéine Fe par Western Blot en utilisant un anti-Fe (A: souche sauvage; B: *glnB*⁻; C: *glnK*⁻; D: *amtY*⁻; E: *amtB*⁻ et F: *draG/draT*) (N: incubation à la noirceur; L: reprise de la lumière; Fe : la protéine Fe comme contrôle)

1.3. Détermination du rapport NAD/NADH

Comme discuté ailleurs, le rapport NAD/NADH peut représenter un signal de l'état énergétique cellulaire et peut intervenir dans la régulation de la nitrogénase quand les cellules sont placées à l'obscurité. Donc, une façon de tester cette hypothèse serait de mesurer les concentrations cellulaires de NAD et de NADH avant et après l'élimination de la lumière et essayer de faire les corrélations avec les changements de l'activité de la nitrogénase. Pour la détermination du rapport NAD/NADH chez les deux souches étudiées,

il a fallu tout d'abord mettre au point une courbe standard en utilisant des solutions de NAD et de NADH à des concentrations connues (Figure 18).

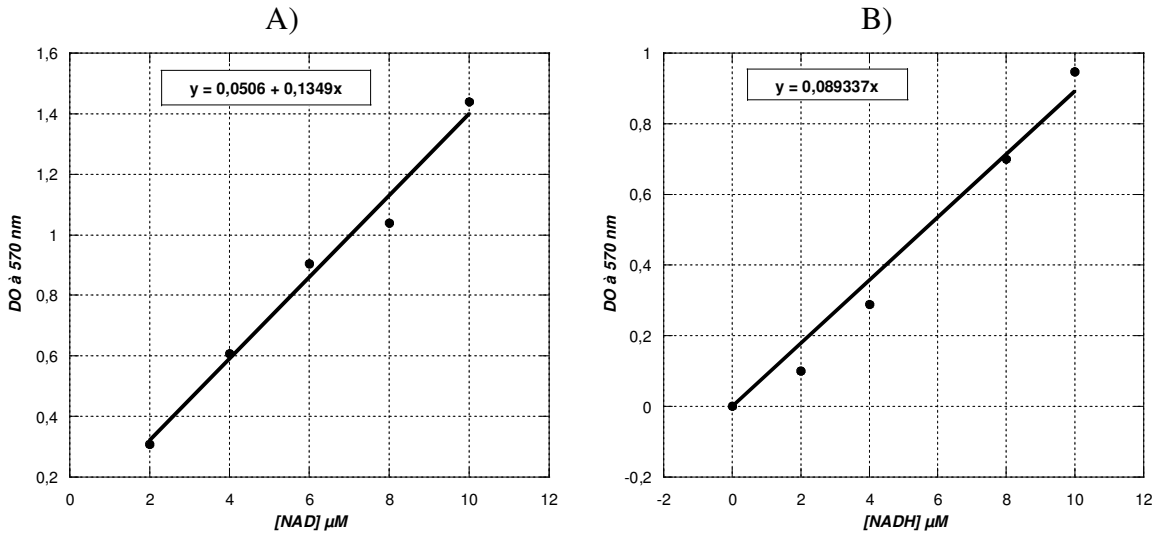


Figure 17 : Courbe standard de NAD (A) et de NADH (B)

En effet, le protocole de dosage de NAD et de NADH cité dans le chapitre matériels et méthodes a fait l'objet de plusieurs changements: le PES a été utilisé au départ à une concentration de 16.6 mM puis il a été remplacé par une solution à 1,66 mM; la solution de NaCl a été utilisée au début à 6 M puis elle a été remplacée par une solution de 5 M, le tampon bicine à pH 8 a été remplacé par la tricine pH 8 et enfin l'enzyme ADH a été utilisée à 500 U/ml mais il s'est avéré de 200 U/ml suffisent. Toutes ces modifications ont été réalisées au fur et à mesure en vue de mettre au point un protocole qui nous permettra d'obtenir des courbes standards raisonnables (Figure 17). Selon les équations des courbes standards obtenues, la détermination des concentrations de NAD et de NADH dans les extraits cellulaires a été faite en se basant sur les relations suivantes:

$$[\text{NAD}] = \frac{\text{DO} - 0,0506}{0,1349} (\mu\text{M}) \quad \Bigg| \quad [\text{NADH}] = \frac{\text{DO}}{0,08937} (\mu\text{M})$$

Le même protocole, a été utilisé pour le dosage de NAD et de NADH chez les cellules bactériennes de la souche sauvage de *R. capsulatus* et du mutant *adgA*⁻. Toutefois, on n'a pas eu de bons résultats. On s'est dit qu'on doit optimiser encore plus l'étape d'extraction

des nucléotides puisqu'elle représente l'étape la plus importante de tout le protocole. On a pensé alors à tester 3 solutions d'extraction de NAD différentes: des solutions de HCl à 0,1N, 0,2N et 0,4N et 2 solutions de NaOH (0,1N et 0,2N) pour la neutralisation (Tableau V).

Tableau V : Dosage de NAD chez la souche sauvage de *R. capsulatus* en utilisant 3 solutions d'extraction différentes

[HCl] (N)	DO ₀	DO _{15min}	ΔDO
0,1	0,074	0,132	0,058
0,2	0,129	0,310	0,181
0,4	0,064	0,388	0,324

D'après les résultats obtenus, la meilleure solution permettant d'extraire le maximum de NAD est la solution de HCl à 0,4N avec la solution de NaOH à 0,2N pour la neutralisation. Malgré qu'on ait effectué ces changements au protocole, on n'est pas arrivé à avoir des résultats reproductibles après plusieurs tentatives pour des raisons inconnues.

2. Étude de la fixation d'azote en microaérobie et à la noirceur

2.1. Culture en "Shake agar"

Un vieux test assez simple qui permet de mettre en évidence la capacité d'une bactérie de faire la fixation d'azote en microaérobie est le "Shake-agar". En effet, l'agar mou est inoculé avec la bactérie en question avant d'être gélifié en tube. Les tubes sont incubés dans une atmosphère gazeuse standard et les bactéries vont se développer en dessous de la surface dans une zone microaérobie propice à leur croissance. Ce type de test nous permettra alors d'avoir une idée sur le niveau de tolérance d'O₂ chez *R. capsulatus* dans des conditions fixatrices d'azote.

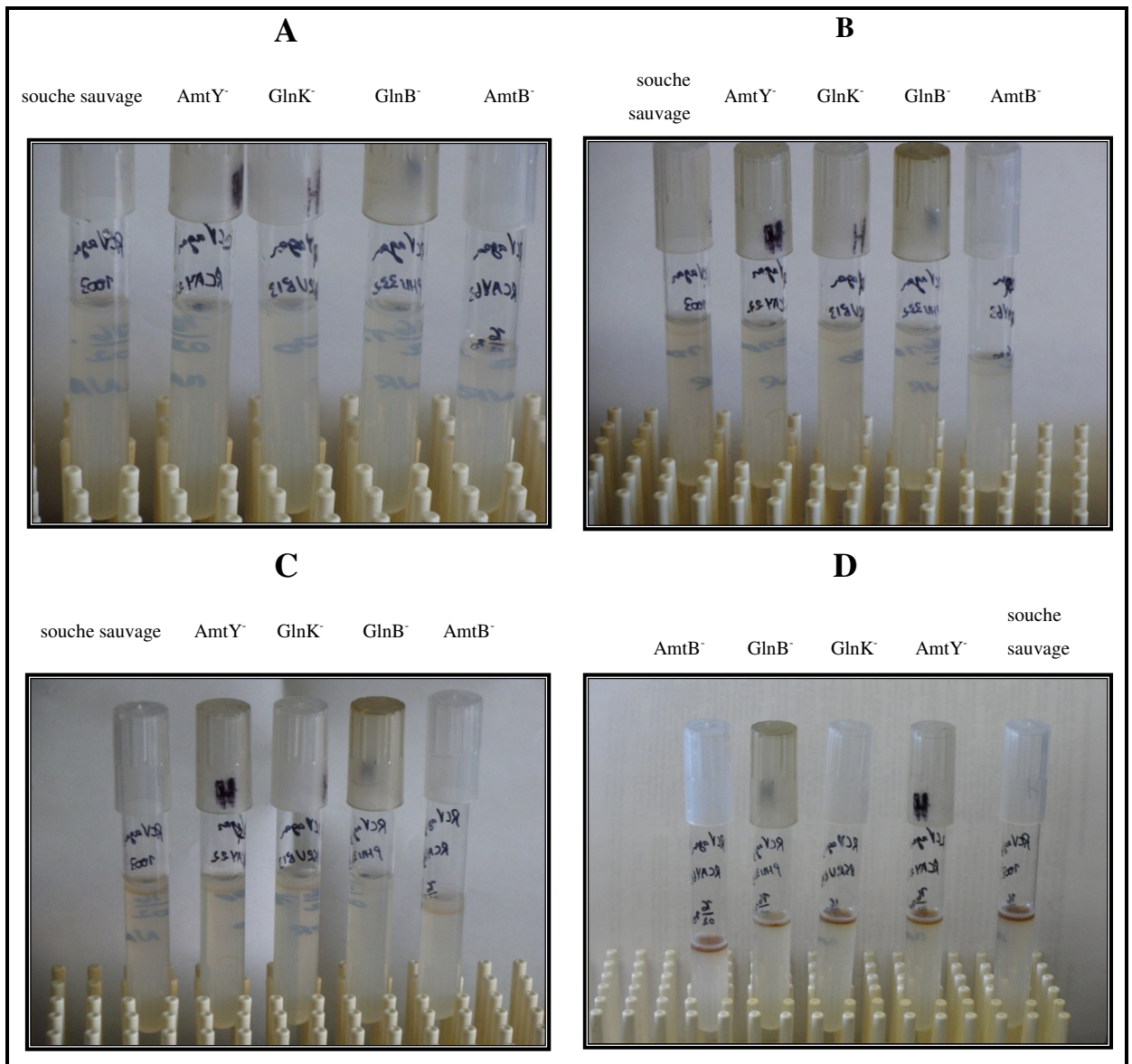


Figure 18: Suivi des cultures en " shake-agar " (A: J₀; B: J₂; C: J₆; D: J₁₀)

Le suivi des différentes cultures a montré qu'après 2 jours il y a apparition d'un trait rouge très clair (représentant la croissance de la bactérie pourpre *R. capsulatus*) à 3 mm de la surface de l'agar et ceci pour toutes les souches cultivées sauf le mutant *glnB⁻* (Figure 18B). Cependant, après 6 jours le trait rouge commence à apparaître chez *glnB⁻*, alors qu'il devient de plus en plus visible pour le reste des souches (Figure 18C & D).

D'après les résultats obtenus, on a pu vérifier que la souche de *R. capsulatus*, dont on dispose au laboratoire, est capable de croître sur N₂ comme seule source d'azote à la noirceur et en présence d'une faible concentration d'oxygène. On peut alors entamer une étude plus poussée sur la fixation d'azote en microaérobie.

2.2. Culture dans les "erlenmeyer"

Après avoir vérifié que *R. capsulatus* est capable de croître en faisant la fixation d'azote dans des conditions de microaérobie à la noirceur, on a débuté alors une étude où on est capable de faire varier plusieurs paramètres et de prendre des mesures plus précises (telles que: la densité optique). Tout d'abord on a déterminé les besoins de la bactérie dans des conditions fixatrices d'azote. On a vérifié l'influence des différentes sources d'azote, et à différentes concentrations, sur la croissance bactérienne. On a commencé au début par l'étude de la souche sauvage de *R. capsulatus* (SB1003) et des deux mutants: *fdxN*⁻ et *rnf*⁻ (Figure 19).

Chez la souche sauvage de *R. capsulatus*, toutes les courbes représentatives de la variation de la croissance cellulaire à différentes concentrations d'ammonium présentent la même allure (Figure 19A). Elles sont toutes composées de deux phases bien distinctes. Ces deux dernières correspondent l'une à la phase exponentielle et l'autre à la phase stationnaire. On note aussi l'absence de la phase de latence. La seule différence observée est l'amplitude de la courbe correspondant à la culture de la souche sauvage à 0 mM d'ammonium. Dans ces conditions, on note qu'il y a une croissance mais pas aussi importante qu'en présence de 5, 10 et 30 mM d'ammonium. Ceci peut être expliqué par le fait que sans source d'azote fixé, les bactéries doivent forcément faire la fixation de l'azote pour croître. On remarque dans la figure 19B que le mutant *rnf*⁻ présente une meilleure croissance en présence d'ammonium comme l'unique source d'azote à une concentration de 10 mM. Dans ces conditions, la courbe présente les principales phases de croissance bactérienne: une courte phase de latence (≈20h) après laquelle on observe la phase exponentielle suivie de la phase stationnaire. Tandis qu'en présence du glutamate à 7 mM comme principale source d'azote et l'ammonium à 5 et 30 mM, la courbe représentative de la croissance cellulaire de cette

souche présente seulement une phase exponentielle visible et bien distinguée alors que les autres phases montrent des fluctuations. Ce qui ne leur donne pas une allure de courbe de croissance standard.

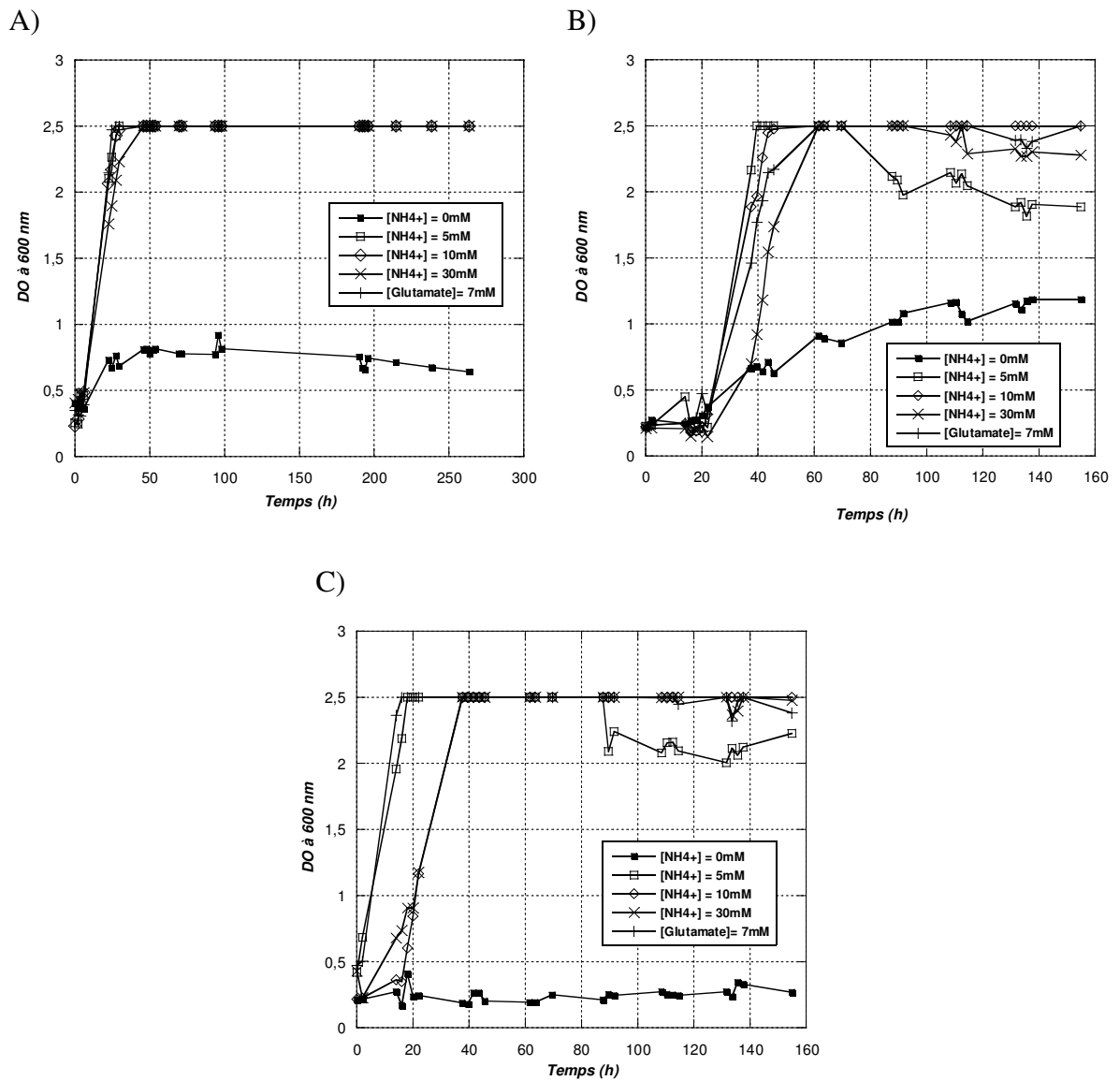


Figure 19 : Suivi de la culture en aérobie sur milieu liquide de la souche sauvage de *Rhodobacter capsulatus* (A), du mutant *rnf*⁻ (B) et du mutant *fdxN* (C) dans différentes conditions.

En fin, en absence totale de source d'azote dans le milieu de culture, on remarque que la croissance bactérienne du mutant *rnf*⁻ est faible et lente en comparaison avec les autres conditions de culture. Mais on ne peut pas négliger le fait que ce mutant est capable de fixer l'azote dans des conditions limitées en nitrogène.

D'après ces résultats (figure 19), on peut conclure que *R. capsulatus* est capable de fixer l'azote en microaérobie. Néanmoins, une meilleure croissance a été notée en présence de 10 mM d'ammonium, suggèrent encore que les demandes métaboliques supplémentaires pour la fixation de l'azote cause un ralentissement de la croissance. En fin l'étude réalisée avec ce mutant nous a permis de déduire que le complexe membranaire Rnf, décrit comme nécessaire pour la fixation de l'azote dans des conditions photohétérotrophiques, n'est pas nécessaire à la fixation d'azote dans les conditions de microaérobie chez *R. capsulatus*. De même pour la deuxième protéine transporteur d'électrons: la ferrédoxine. La figure 19C montre que chez le mutant *fdxN*, la meilleure croissance cellulaire a été observée en présence de 10 mM ou 30 mM d'ammonium, et, dans cette expérience il n'y avait pas vraiment de croissance en absence d'azote fixé (Figure 19C).

Puisque notre but est de déterminer les conditions dans lesquels *R. capsulatus* est capable de fixer l'azote en présence d'oxygène, on s'est intéressé à optimiser la croissance bactérienne en présence d'une limitation en azote. L'étude précédente a représenté une étape préliminaire en vue d'avoir une idée sur les besoins de *R. capsulatus* en ammonium en présence d'O₂ et à la noirceur. Alors on a cultivé ces mêmes trois souches à des faibles concentrations d'ammonium: 0; 1 et 2 mM. A 0 mM d'ammonium, les cultures doivent commencer tout de suite à fixer l'azote tandis qu'à 1 et 2 Mm la petite quantité d'azote fixé leur permet de croître avant qu'elles soient obligées à fixer l'azote, processus qui s'avère plus difficile dans ces conditions (noirceur, présence d'oxygène).

Les résultats obtenus montrent qu'on a réussi encore une fois à cultiver *R. capsulatus* en microaérobie même en absence totale de source d'ammonium dans le milieu de culture avec un maximum de croissance noté à 2 mM d'ammonium pour de la souche sauvage (Figure 20A). Ce qui n'a jamais été réalisé au laboratoire avant cette étude. Cependant,

chez le mutant *rnf⁻* la croissance à 0 mM d'ammonium est un peu plus importante au niveau de la phase exponentielle que les autres conditions (Figure 20B). Alors que les courbes représentatives de la variation de la croissance cellulaire à 0; 1 et 2 mM d'ammonium sont presque confondues chez le mutant *fdxN⁻*.

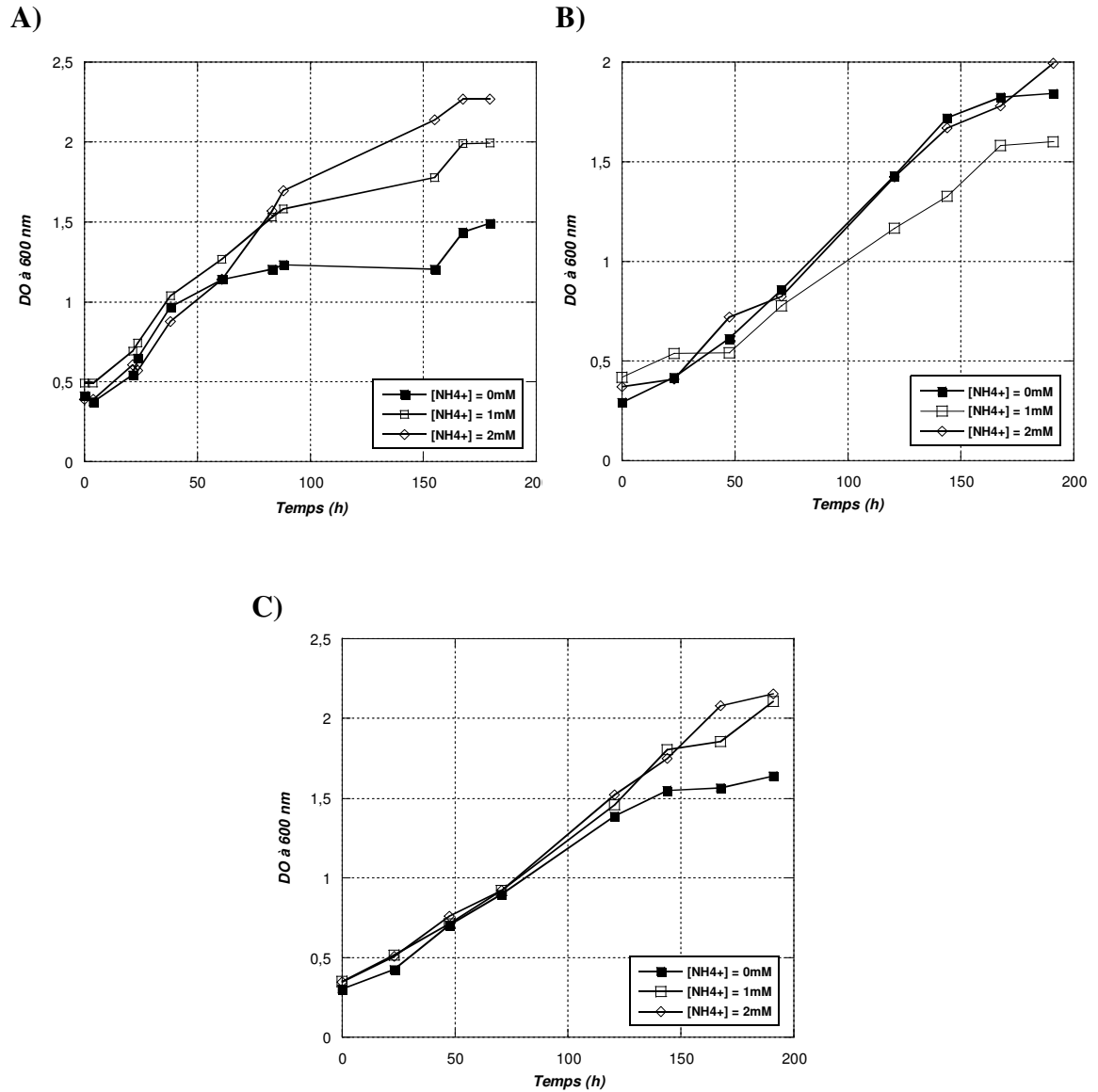


Figure 20: Suivi de la culture en aérobie sur milieu liquide de la souche sauvage de *Rhodobacter capsulatus* (A), du mutant *rnf*⁻ (B) et du mutant *fdxN* (C) à faibles concentrations d'ammonium

On peut alors confirmer que *R. capsulatus* est capable de croître en microaérobie et en présence d'une limitation en azote ($[\text{NH}_4^+] = 0$) sans avoir besoin ni du complexe membranaire Rnf ni de la ferrédoxine. Dans le but de voir si les protéines AmtB et AmtY interviennent dans la fixation d'azote en microaérobie, on a réalisé cette même dernière étude avec les mutants *amtB*⁻ et *amtY*⁻.

D'après la figure 21A, les courbes représentatives de la variation de la croissance cellulaire du mutant *amtB*⁻ dans les trois conditions sont presque similaires durant les 50 premières heures. Cependant c'est la courbe représentative de la croissance à 0 mM d'ammonium qui devient la plus importante alors que les deux autres restent très proches. Toutefois, chez *amtY*⁻, les trois courbes sont presque confondues sauf à la fin de la phase exponentielle on remarque que le maximum de densité cellulaire a été noté pour la culture en présence de 1 mM d'ammonium. Ce test nous a permis de conclure que ni AmtB ni AmtY ne sont indispensables à la fixation d'azote en microaérobie chez *R. capsulatus*.

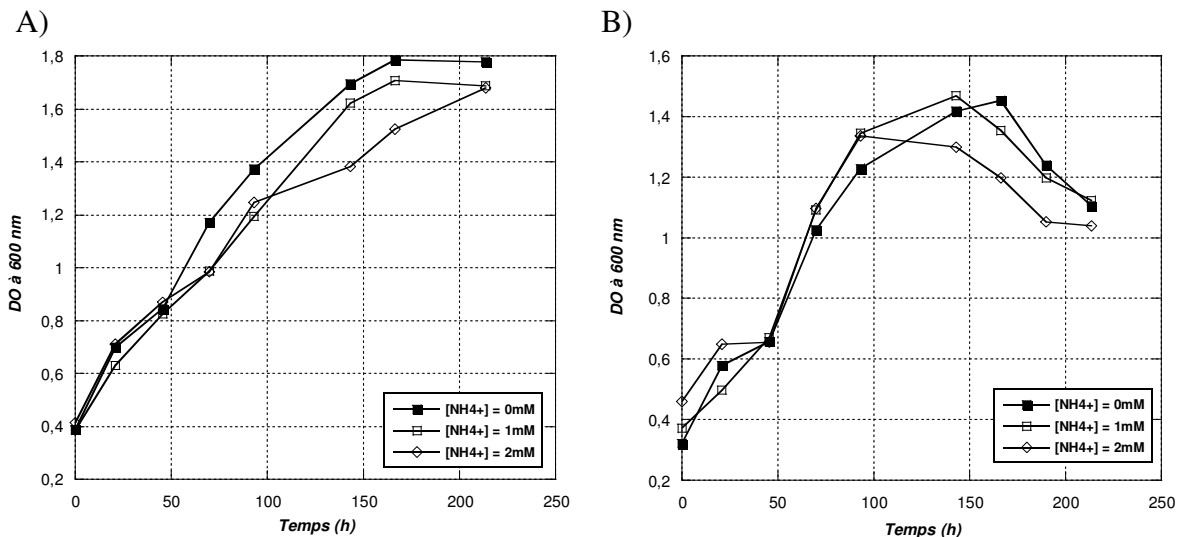


Figure 21 : Suivi de la culture du mutant *amtB*⁻ (A) et du mutant *amtY*⁻ (B) à faibles concentrations d'ammonium

L'étude de la fixation d'azote sur milieu liquide et en microaérobie nous a permis de vérifier si la souche dont on dispose au laboratoire est capable de fixer l'azote en présence d'oxygène. Cette étude a été comme une étape préliminaire avant de commencer l'étude de la fixation d'azote en microaérobie contrôlée, qui serait beaucoup plus intéressante puisque la nitrogénase est sensible à l'oxygène. Dans les expériences précédentes, les cultures étaient dans des conditions de microaérobie malgré que les flacons utilisés fussent exposés à l'air atmosphérique. Mais la pression partielle de l'oxygène dans la phase liquide est réduite par son utilisation et surtout par le transfert limité du gaz entre la phase liquide et la phase gazeuse. Ce transfert a été contrôlé d'une façon imprécise par la réduction de la vitesse d'agitation et du volume de la phase gazeuse.

2.3. Culture dans le "Bioflow C30"

La fixation d'azote en anaérobie et à lumière a été largement étudiée et le système de régulation de la nitrogénase est très bien développé dans ce mode de culture. Or il n'avait jamais été démontré que c'est ce même système de régulation qui s'applique à *R. capsulatus* quand elle fixe l'azote en microaérobie à la noirceur. Donc le but de nos expériences dans cette partie était d'essayer de développer ce deuxième mode de croissance de *R. capsulatus* afin de permettre des études futures du système de régulation de la nitrogénase à la noirceur. On doit tout d'abord déterminer les conditions opératoires dans lesquelles *R. capsulatus* fixe l'azote en microaérobie à la noirceur.

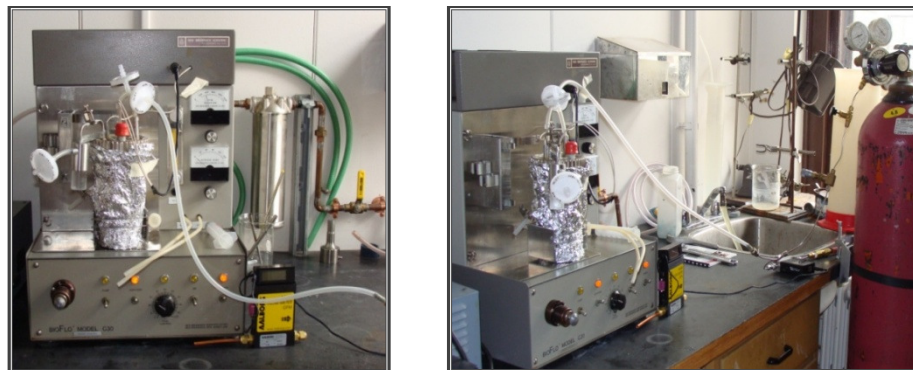


Figure 22 : Mise en culture de *Rhodobacter capsulatus* en microaérobie à la noirceur dans le "Bioflow C30"

Le principal paramètre à déterminer est la concentration d'oxygène sachant qu'on doit identifier la concentration maximale qui permet à *R. capsulatus* de croître sans pour autant inhiber sa nitrogénase. Pour réaliser cette étude, la culture a été faite dans un petit biofermenteur (Figure 22). Ce système nous garantit une régulation automatisée de la température et de l'agitation. Il présente aussi l'avantage de se connecter à des entrées et des sorties de gaz (Figure 22). On a choisit une concentration d'oxygène de départ et puis selon l'état de la culture on a décidé si on avait besoin de l'augmenter ou de la diminuer. On a alors commencé avec une culture à 20 mM d'ammonium et 1 % d'O₂ pour avoir un seul facteur varié par rapport à une culture aérobie dans "l'erlenmeyer" (Figure 23). La concentration d'oxygène dans le gaz barbotant (nitrogène) était assurée par un mélangeur de gaz composé de deux contrôleurs du flux des masses digitaux.

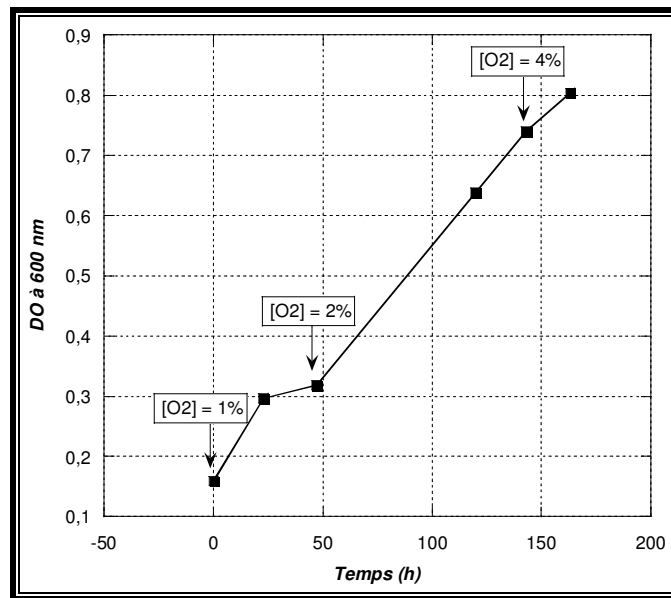


Figure 23 : Suivi de la croissance de la souche sauvage de *R. capsulatus* à 20 mM d'ammonium dans le "Bioflow C30" (débit du gaz = 10 ml/min)

On a remarqué que plus la concentration d'oxygène augmente, plus la croissance cellulaire croît chez la souche sauvage de *R. capsulatus* (Figure 23). La pente de la courbe entre 2 et 4% d'O₂ est presque droite. Ce qui nous montre que notre bactérie a encore besoin d'oxygène pour assurer la fixation d'azote à la noirceur. On peut prévoir ainsi que plus on

va lui donner de l'O₂, plus la croissance cellulaire sera importante. C'est la raison pour laquelle on a pensé à faire une deuxième culture qui démarrera avec 4% d'O₂ mais cette fois-ci à faible concentration d'ammonium [NH₄⁺]= 4 mM (Figure 24).

D'après la figure 24, on a remarqué que *R. capsulatus* est capable de fixer l'azote à la noirceur en présence de 10% d'O₂. La courbe représentative de la variation de la croissance cellulaire au cours du temps en présence de 10% d'O₂ et à la noirceur montre les principales phases de toute courbe de croissance: une phase exponentielle jusqu'à 200 h de culture, une petite phase stationnaire et en fin une phase de déclin. Et afin de vérifier que la bactérie est dans des conditions fixatrices d'azote, il faut tester l'activité de la nitrogénase et par la même occasion visualiser l'état de modification de la protéine Fe par Western blot. Cette étude doit se faire quand la culture cellulaire est à son maximum. Alors on a commencé à prélever des échantillons de la culture cellulaire au moment où la DO a dépassé le 1 (à t = 100 h dans la figure 24). Le suivi de l'activité cellulaire et la protéine Fe a pris fin quand on a senti que la croissance cellulaire s'approchait de la phase stationnaire (à t = 200 h dans la figure 24).

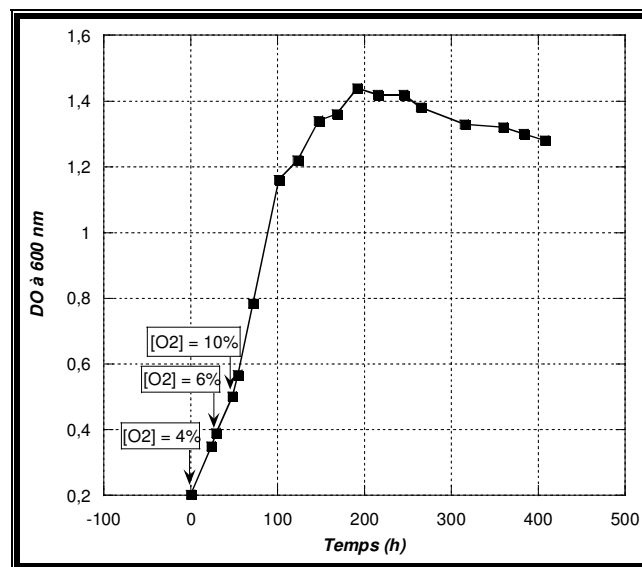


Figure 24: Suivi de la culture de la souche sauvage de *R. capsulatus* à 4 mM d'ammonium en microaérobie à la noirceur à différentes concentrations d'O₂ (de 4 à 10%)

D'après le tableau VI, on a remarqué que la variation de l'activité de la nitrogénase est proportionnelle à la variation de la croissance cellulaire jusqu'au J₁₀. Ce résultat confirme que le maximum de densité cellulaire correspondrait forcément à un maximum d'activité fixatrice d'azote. De plus, l'activité élevée de la nitrogénase prouve que la petite quantité d'ammonium ajouté au départ a été déjà épuisée parce que l'ammonium réprime la synthèse de la nitrogénase, ce qui nous confirme que la bactérie est entrain de croitre dans des conditions fixatrices d'azote. Étant donné que les valeurs présentées dans le tableau VI représentent la quantité d'éthylène produit par unité de densité optique, on a remarqué que la synthèse enzymatique dans chaque cellule bactérienne augmente de plus en plus. Cependant on note que l'activité de la nitrogénase par unité de densité optique au J6 est faible par rapport à celles notés au J7 et au J8. Cette différence est due à une surproduction de la nitrogénase (J7 et J8) sans pour autant qu'elle soit nécessaire à une croissance cellulaire. La diminution brusque de l'activité de la nitrogénase survenue au J₁₀ peut être expliquée par le fait qu'à ce moment on s'approchait de la phase de déclin de la croissance.

Tableau VI : Activité de la nitrogénase quand la croissance cellulaire est maximale en microaérobie (10% d'O₂) et à la noirceur

	J6	J7	J8	J10
Activité de la nitrogénase (nmol/min/DO)	17,78	44,69	53,99	8,053

La visualisation par Western Blot des prélèvements effectués au même moment que les tests d'activité de la nitrogénase, montre qu'à ce moment la protéine Fe est sous une forme native (non modifiée par attachement d'un groupement ADP-ribose). Ce qui est en concordance avec l'activité élevée de la nitrogénase notée pendant ce temps là (Figure 24).

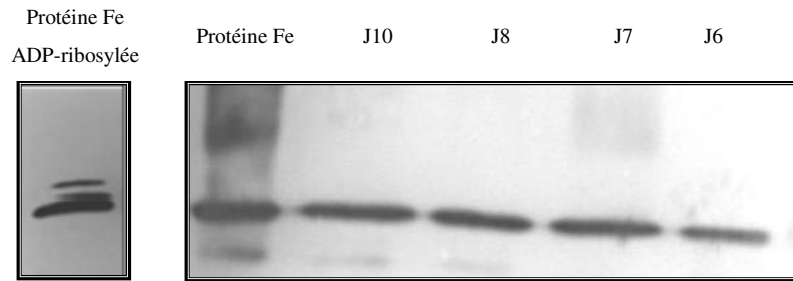


Figure 25 : Visualisation par Western Blot de l'état de modification de la protéine Fe

Puisque dans l'étude précédente la bactérie a épuisé tout l'ammonium qui se trouvait dans le milieu de culture, on a refait une autre culture microaérobie (10% d'O₂) à la noirceur sans ammonium (avec du RCV seul) mais en gardant la même concentration d'O₂ (Figure 26).

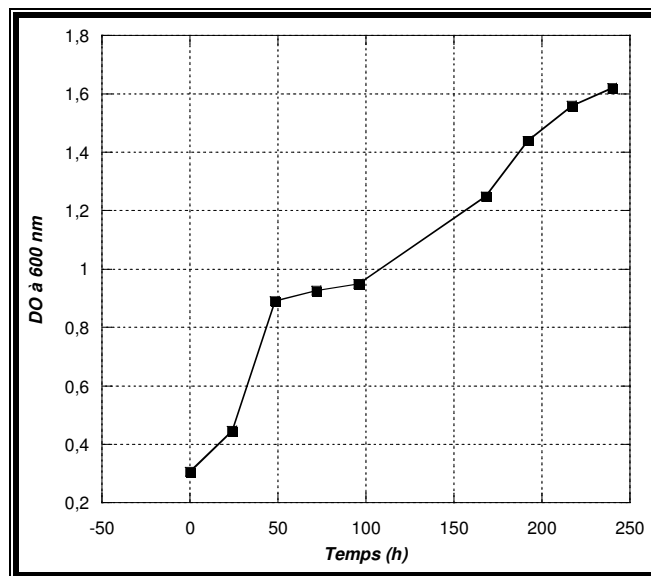


Figure 26 : Culture en microaérobie (10% O₂) à la noirceur de la souche sauvage de *R. capsulatus* sans ammonium

La variation de la densité cellulaire au cours du temps montre une bonne croissance cellulaire mais malheureusement on n'a pu aller jusqu'à la phase stationnaire à cause d'un problème technique qui nous a obligé à arrêter la culture après 240 h de culture. Mais la conclusion qu'on peut tirer de cette courbe est que les conditions de culture (noirceur avec

10% d'O₂ et avec un milieu sans ammonium) sont favorables à une bonne fixation d'azote en microaérobie à la noirceur.

La visualisation de l'état de la protéine Fe par Western Blot des échantillons pour lesquels on a noté une bonne activité de la nitrogénase confirme ce qu'on a déjà retrouvé dans l'expérience précédente (figure 27).

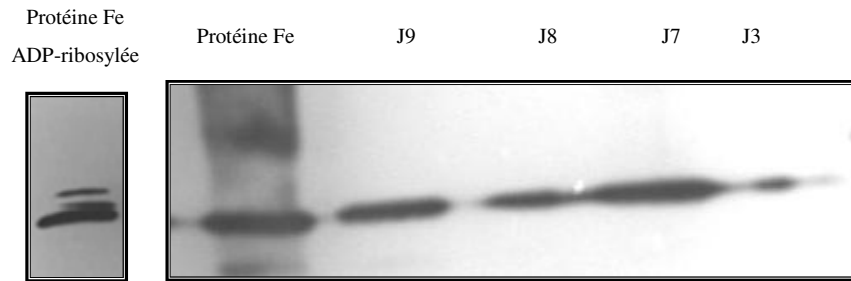


Figure 27 : Visualisation par Western Blot de la protéine Fe

Chapitre 4 : Discussion

La disponibilité du nitrogène limite souvent la croissance des plantes dans l'écosystème terrestre. Ceci affecte la productivité agricole ainsi que tous les processus de l'écosystème à différents niveaux. En agriculture, le nitrogène est l'un des fertilisants les plus utilisés avec un taux d'importation toujours en croissance. Par exemple, en Asie développée l'importation totale de l'azote utilisé comme fertilisant était moins que 1.5 millions de tonnes par année en 1961 alors qu'elle a augmenté à presque 47 millions de tonnes en 1996. La seule réaction biologique équilibrant la perte d'azote du sol ou de l'écosystème est la fixation biologique d'azote: la réduction enzymatique de N_2 en ammonium. Ce processus est unique aux bactéries et Archaea dont leur contribution globale d'azote fixé est entre 100 et 200 millions de tonnes par année: de 90 à 130 Tg pour le système terrestre et 100 à 200 Tg pour le système marin (Hurek et al. 2003). D'où l'intérêt de l'étude de ce phénomène.

La régulation de la fixation de l'azote est souvent très complexe et varie d'un organisme diazotrophique à un autre. Il semble que cette régulation se fait à trois niveaux chez la bactérie photosynthétique pourpre non-sulfureuse, *R. capsulatus*. La régulation de la nitrogénase par l'ADP-ribosylation, qui peut causer un «switch-off» de son activité, n'est connue que chez les protéobactéries. Cette réponse peut être déclenchée suite à un changement brusque des conditions environnementales (présence d'azote fixé: ammonium; ou manque d'énergie: manque de lumière) amenant la bactérie dans les conditions défavorables pour la fixation de l'azote.

Chez *R. capsulatus*, le système de régulation de la nitrogénase suite à un choc d'ammonium a été très bien étudié. C'est pour cette raison qu'on a voulu voir ce qui pourrait se passer

suite à un choc de noirceur sachant que la fixation d'azote est une réaction hautement énergétique et que la lumière constitue une source d'énergie très importante. L'incubation d'un échantillon d'une culture photosynthétique de la souche sauvage de *R. capsulatus* 20 min à la noirceur, a présenté un "switch-off" de l'activité de la nitrogénase dû à une ADP-ribosylation de la protéine Fe (Figure 15 & 16). Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus dans le cas d'un choc d'ammonium chez cette même bactérie (Yakunin et al. 2002). Donc le choc d'ammonium et le choc de noirceur ont tous les deux les mêmes effets: une ADP-ribosylation de la protéine Fe qui cause un "switch-off" de l'activité de la nitrogénase. La même étude réalisée chez les mutants *GlnB*⁻, *GlnK*⁻, *AmtB*⁻ et *AmtY*⁻ a montré que ces quatre protéines interviennent dans le système de régulation de la nitrogénase suite à un choc de noirceur. Ainsi on peut conclure que les principales protéines du système de régulation de la nitrogénase suite à un choc d'ammonium, interviennent aussi dans le cas de l'élimination de la source d'énergie à une culture photosynthétique (Tremblay et al. 2007; Tremblay et al. 2008).

Une des questions qui peuvent se poser concernant le phénomène du "switch-off" est l'identité du signal métabolique entre les effecteurs du "switch-off" et les enzymes régulatrices DRAT (la dinitrogénase réductase ADP-ribosyltransférase) et DRAG (la dinitrogénase réductase activatrice de la glycohydrolase). Les études génétiques chez *Rhodospirillum rubrum* s'avèrent non concluantes, mais ils ont suggéré l'implication du ratio NAD(P)/NAD(P)H dans la régulation de ces enzymes (Noréan et al. 1994). Il a été démontré que l'ADP-ribosylation de la dinitrogénase réductase (Fe) est catalysée par DRAT avec le coenzyme NAD comme principal donneur du groupement ADP-ribose. Cette même étude a prouvé aussi que la concentration de NAD⁺ joue un rôle essentiel dans l'initiation du "switch-off" de l'activité de la nitrogénase (Noréan et al. 1997).

Cependant, ce type d'étude n'a pas été réalisé avec *R. capsulatus* et n'avait jamais été fait avec des cultures soumises à un choc de noirceur. C'est la raison pour laquelle on a pensé à mettre au point un protocole qui nous permettra d'avoir une idée sur la variation du ratio NAD/NADH chez cette bactérie quand elle est soumise à un choc d'ammonium ou même un choc de noirceur. Malheureusement on n'est pas parvenu à atteindre notre but puisqu'on

a mis beaucoup de temps à adapter un protocole déjà publié à *R. capsulatus*. Les améliorations apportées à ce protocole, nous ont permis d'avoir de belles courbes standards. Néanmoins, même avec ce nouveau protocole il nous était impossible d'avoir des résultats reproductibles avec les échantillons bactériens. Plusieurs approches peuvent être suggérées pour les études futures qui visent à étudier un rôle potentiel du rapport NAD/NADH dans la régulation de la nitrogénase en réponse à un choc d'ammonium ou à un changement brusque dans l'alimentation lumineuse. D'autres méthodes d'extraction des ces nucléotides peuvent être développées. Aussi, il se peut que les concentrations soient trop faibles pour être détectables d'une manière fiable par une méthode enzymatique. Alors, on peut suggérer l'utilisation d'une méthode analytique de dosage de NAD et de NADH comme la HPLC (High performance liquid chromatography). Elle a été déjà utilisée avec succès pour détecter ces composés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Sporty et al. 2008).

En commun avec la plupart des bactéries diazotrophique, *R. capsulatus* fait une régulation transcriptionnelle de ses gènes *nif*. Une régulation assez bien étudiée pour la croissance photohétérotrophique, mais non développée pour une croissance diazotrophique en microaérobie. Dans ce mémoire on a examiné l'indépendance d'une culture à la noirceur par rapport à certaines protéines régulatrices de l'expression de la nitrogénase moyennant le test "shake-agar". Tout comme dans une croissance photohétérotrophique, aucune ne s'avèrent absolument nécessaire à la noirceur. Néanmoins, les résultats montrent que le mutant *glnB* présente une croissance retardée, un effet jamais noté auparavant avec les cultures photosynthétiques. Cette différence peut indiquer que la régulation dans les deux conditions a des différences subtiles. D'autres études futures seront nécessaires pour éclaircir ce point.

Une autre différence notée dans cette étude, entre la croissance diazotrophique photohétérotrophique et en microaérobie à la noirceur, est au niveau du transport des électrons vers la nitrogénase. Jusqu'à maintenant on a toujours pensé que le système membranaire Rnf (Rhodobacter nitrogen fixation) était absolument nécessaire pour la fixation d'azote. L'analyse de la structure secondaire des produits des gènes *rnf*, suggère

que ces derniers codent pour quatre protéines membranaires et deux protéines Fe-S qui contiennent un motif cystéine typique (C-X₂-C-X₂-C-X₃-C-P) des protéines [4Fe-4S]. La comparaison de l'activité de la nitrogénase *in vivo* et *in vitro* chez le mutant *rnf*⁻, montre que le produit de ce gène est impliqué dans le transport d'électrons à la nitrogénase. De plus, le mutant avait même présenté un taux réduit de nitrogénase (Schmechl et al. 1993). Or les études préliminaires réalisées (figure 19 & 20), montrent qu'une souche mutante *rnf*⁻ peut pousser dans la noirceur en microaérobie en absence d'azote fixé, quoique la croissance semble être plus lente par rapport à la souche sauvage. Si le Rnf ne fournit pas les électrons indispensables à la fixation de l'azote, c'est nécessairement un autre complexe qui le fait. Le NADH généré par le métabolisme n'est pas assez réducteur pour réduire directement la nitrogénase, donc un complexe membranaire capable de créer le flux d'électrons serait nécessaire. L'identification des protéines, inconnues jusqu'à présent, impliquées dans le transport des électrons nécessaires à l'activité de la nitrogénase en microaérobie peut se faire en utilisant les micro-puces d'ADN. Autrement, on peut faire des recherches bioinformatiques pour en trouver les bonnes séquences surtout que la séquence génomique de *R. capsulatus* vient d'être disponible (Strnad et al. 2010).

Chez la bactérie photosynthétique *R. rubrum*, contrairement à *R. capsulatus*, il a été démontré que le système FixABCX, déjà impliqué dans la fixation d'azote chez la plupart des bactéries diazotrophiques, est nécessaire pour l'activité de la nitrogénase en condition photohétérotrophique. C'est un système associé à la membrane, il est requis pour le transfert d'électrons à la nitrogénase (Edgren et al. 2006). Dans cette optique, il est intéressant de noter que des homologues de FixABC sont présents dans le génome de *R. capsulatus*. Plus tard, il serait intéressant de muter ces gènes et de voir l'effet sur la fixation de l'azote en microaérobie en vue de rechercher le complexe qui pourrait remplacer Rnf dans le transport des électrons.

L'étude de la fixation d'azote en microaérobie à la noirceur chez *R. capsulatus* a prouvé que la concentration optimale d'oxygène permettant d'obtenir une activité fixatrice d'azote est de 10% dans le gaz barbotant (nitrogène). Le débit optimal d'injection du mélange gazeux dans la culture cellulaire est de 6 ml/min. Cependant Thomas Edgren et al, ont

obtenu un maximum d'activité de la nitrogénase en présence de 1,5% d'oxygène par milligramme de protéines. Malgré la sensibilité de la nitrogénase à l'oxygène, les hautes concentrations utilisées n'ont pas inhibé son activité. Ceci peut être expliqué par la génération d'une PMF ("proton motive force") en présence d'oxygène. Cette force (PMF) est produite par le transfert des électrons respiratoires. Elle accroît à son tour la génération de réductants nécessaires à l'activité de la nitrogénase et peut aussi affecter la synthèse d'ATP. Il a été montré dans la même étude, que la présence du pyruvate et de l'oxygène peut supporter l'activité de la nitrogénase dans la noirceur chez *R. rubrum* cultivée en présence de glutamate comme source d'azote (Edgren et al. 2006). Alors que nous avons réussi à avoir un maximum d'activité de la nitrogénase chez *R. capsulatus* en microaérobie à la noirceur même en absence de toute source d'azote dans le milieu de culture (Figure 24 & 26).

Cette étude physiologique pourrait être complétée par une étude génétique en vue de déterminer les gènes responsables de la fixation d'azote en microaérobie et à la noirceur chez *R. capsulatus* en ayant recours aux micro-puces d'ADN.

Finalement, même s'il est connu depuis long temps que certaines bactéries diazotrophiques peuvent faire la fixation d'azote en microaérobie, ceci était très peu étudié. Certainement à cause de la difficulté de faire des études dans des conditions contrôlables et reproductibles. Ce qui a été noté avec les expériences de la croissance en flacons "Erlenmeyer". On a trouvé des difficultés à maintenir des conditions de culture constantes (comme la concentration de l'oxygène). On a donc mis en marche un système qui nous permet de contrôler le débit total ainsi que la composition du gaz (**Chapitre 2.2.3.3**).

Conclusion

L'étude de la régulation de la nitrogénase à la noirceur avait été décomposée en deux principales parties. La première a porté sur la détermination des effecteurs du système de régulation quand une culture photosynthétique est exposée à un choc de noirceur. On a étudié l'effet de l'élimination de la source de lumière chez les mutants: *glnK*, *glnB*, *amtB*, *amtY* et *draG/draT*. Le suivi de l'activité de la nitrogénase ainsi que l'immuno-empreinte nous ont permis de démontrer que le même système de régulation intervenant suite à un choc d'ammonium, intervient aussi suite à un choc de noirceur via une ADP-ribosylation de la protéine Fe provoquant ainsi un "Switch-off" de l'activité de la nitrogénase.

Il a été prouvé dans la littérature que la variation du ratio NAD/NADH aurait un effet dans la régulation de la nitrogénase chez *R. rubrum*. On a pensé alors à suivre la variation de ce ratio durant un choc de noirceur et d'ammonium chez *R. capsulatus*. On a commencé tout d'abord par la mise au point d'un protocole de dosage enzymatique de NAD et de NADH. Après plusieurs essais, on a réussi à développer un protocole qui nous a permis d'avoir de belles courbes standards mais ce dernier ne nous a pas permis d'avoir des résultats reproductibles avec des échantillons de la souche sauvage et du mutant RC34. Il est probable que les quantités sont trop faibles et qu'il serait plus efficace d'utiliser une méthode analytique telle que: la HPLC (High-performance liquid chromatography).

La deuxième partie de l'étude peut être considérée comme un premier pas vers le développement du second mode de croissance de *R. capsulatus*: microaérobie à la noirceur. Au début, on a montré par le test "Shake-agar" que notre souche de laboratoire tolère la présence d'oxygène à la noirceur. Cette technique nous a permis aussi d'examiner la capacité de diverses souches mutantes, dans les principaux gènes de la régulation, de croître dans ces conditions. La croissance diazotrophique en microaérobie de la souche sauvage a été confirmée une deuxième fois en milieu liquide. Puis l'optimisation de la croissance dans

des conditions fixatrices d'azote (absence d'ammonium dans le milieu de culture) en microaérobie à la noirceur, avait montré que la concentration optimale d'oxygène mélangé avec l'azote est 10% avec un débit total de 6 ml/min. L'établissement des bonnes conditions de croissance diazotrophique en microaérobie permettra plusieurs études à l'avenir qui nécessitent une grande reproductibilité, par exemple, l'utilisation des micro-puces pour décerner les gènes responsables de la croissance de *R. capsulatus* en microaérobie à la noirceur.

Bibliographie

- Berman-Frank, I., P. Lundgren et P. Falkowski.** 2003. "Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria". *Research in Microbiology* **154**(3): 157-164.
- Cheng, Q.** 2008. "Perspectives in biological nitrogen fixation research". *Journal of Integrative Plant Biology* **50**(7): 786-798.
- Compaoré, J. et L. J. Stal.** 2010. "Oxygen and the light–dark cycle of nitrogenase activity in two unicellular cyanobacteria". *Environmental Microbiology* **12**(1): 54-62.
- Dixon, R. et D. Kahn.** 2004. "Genetic regulation of biological nitrogen fixation". *Nature Reviews Microbiology* **2**(8): 621-631.
- Drepper, T., S. Gross, A. F. Yakunin, P. C. Hallenbeck, B. Masepohl et W. Klipp.** 2003. "Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*". *Microbiology* **149**(8): 2203-2212.
- Edgren, T. et S. Nordlund.** 2006. "Two pathways of electron transport to nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum*: the major pathway is dependent on the fix gene products". *FEMS Microbiology letters* **260**(1): 30-35.
- Ferguson, S. J.** 1998. Nitrogen cycle enzymology. *Bio-inorganic Chemistry, Current Biology*. **2**: 182-193.
- Galloway, J. N.** 1998. "The global nitrogen cycle: changes and consequences". *Environmental Pollution* **102**: 15-24.
- Hurek, T. et B. Reinhold-Hurek.** 2003. "*Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes". *Journal of Biotechnology* **106**(2-3): 169-178.
- Karg, T. et B. Reinhold-Hurek.** 1996. "Global changes in protein composition of N₂-fixing *Azoarcus* sp. strain BH72 upon Diazome formation". *Journal of Bacteriology* **178**: 5748-5754.

- Klein, G., A. Jahn, M. Dorffler et J. Oelze.** 1993. "Activity and expression of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* under aerobiosis in the dark and in the light". Archives of Microbiology **159**: 233-236.
- Madigan, M., S. C. Sharon et A. S. Roderick.** 1984. "Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae". Journal of Bacteriology **157**: 73-78.
- Marchal, K., J. Sun, V. Keijers, H. Haaker et J. Vanderleyden.** 1998. "A Cytochrome cbb3 (Cytochrome c) Terminal Oxidase in *Azospirillum brasilense* Sp7 Supports Microaerobic Growth". Journal of Bacteriology. **180**(21): 5689-5696.
- 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*". Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **4**: 243-248.
- Masepohl, B. et R. G. Kranz.** 2009. Regulation of nitrogen fixation, Springer Science: 760-775.
- 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". Journal of General Microbiology **139**: 2667-2675.
- Noréan, 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". FEMS Microbiology letters **356**: 43-45.
- Noréan, A., A. Soliman et S. Nordlund.** 1997. "The role of NAD⁺ as a signal during nitrogenase switch-off in *Rhodospirillum rubrum*". Biochemical Journal **322**: 829-832.
- Pacaud-Mercier, K., M. Blaghen, K. M. Lee, D. Tritsch et J.-F. Biellmann.** 2007. "Electron transfer from NADH bound to horse liver alcohol dehydrogenase (NAD⁺ dependent dehydrogenase): Visualisation of the activity in the enzyme crystals and adsorption of formazan derivatives by these crystals". Bioorganic Chemistry **35**(1): 59-67.

- 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*". *Journal of Bacteriology* **185**(17): 5240-5247.
- Peter Wolk, C.** 2003. "Heterocyst Formation". *Annual Review of Genetics* **30**(1): 59-78.
- Rees, D. C. et J. B. Howard.** 2000. *Nitrogenase: standing at the crossroads*, Elsevier Science. **4**: 559-566.
- Rudnick, P., D. Meletzus, A. Green, L. He et C. Kennedy.** 1997. "Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria". *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 831-841.
- Schmehl, M., A. Jahn, A. M. z. Vilsendorf, S. Hennecke, B. Masepohl, M. Schuppler, M. Marxer, J. Oelze et W. Klipp.** 1993. "Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase". *Molecular and General Genetics* **241**: 602-615.
- Siefert, E. et N. Pfennig.** 1980. "Diazotrophic growth of *Rhodospseudomonas acidophila* and *Rhodospseudomonas capsulata* under microaerobic conditions in the dark". *Archives of Microbiology* **125**: 73-77.
- Spiller, H. et K. T. Shanmugam.** 1987. "Physiological conditions for nitrogen fixation in a unicellular marine Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Strain SF1". *Journal of Bacteriology* **169**: 5379-5384.
- Sporty, J. L., M. M. Kabir, K. W. Turteltaub, T. Ognibene, S. J. Lin et G. Bench.** 2008. "Single sample extraction protocol for the quantification of NAD and NADH redox states in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Separation Science* **31**(18): 3202-3211.
- Steenhoudt, O. et J. Vanderleyden.** 2000. "*Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects". *FEMS Microbiology Reviews* **24**(4): 487-506.
- Strnad, H., A. Lapidus, J. Paces, P. Ulbrich, C. Vlcek, V. Paces et R. Haselkorn.** 2010. "Complete Genome Sequence of the Photosynthetic Purple Nonsulfur Bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB1003". *Journal of Bacteriology* **192**(13): 3545-3546.

- Tremblay, P.-L., T. Drepper, B. Masepohl et P. C. Hallenbeck.** 2007. "Membrane Sequestration of PII Proteins and Nitrogenase Regulation in the Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*". *Journal of Bacteriology* **189**(16): 5850-5859.
- 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*". *Journal of Bacteriology* **190**(5): 1588-1594.
- Tsagou, V., I. Kefalogianni, K. Sini et G. Aggelis.** 2003. "Metabolic activities in *Azospirillum lipoferum* grown in the presence of NH₄⁺". *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**(5): 574-578.
- Weaver, P. F., J. D. Wall et H. Gest.** 1975. "Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*". *Archives of Microbiology* **105**: 207-216.
- Westby, C. A., C. S. Enderlin, N. A. Steinberg, C. M. Joseph et J. C. Meeks.** 1987. "Assimilation of NH₄⁺ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess". *Journal of Bacteriology*. **169**(9): 4211-4214.
- Willison, J. C. et G. Tissot.** 1994. "The *Escherichia coli* efg gene and the *Rhodobacter capsulatus* adgA gene code for NH₃-dependent NAD synthetase". *Journal of Bacteriology* **176**: 3400-3402.
- Yakunin, A. F. et P. C. Hallenbeck.** 2002. "AmtB Is Necessary for NH₄⁺-Induced Nitrogenase Switch-Off and ADP-Ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*". *Journal of Bacteriology* **184**(15): 4081-4088.
- Yen, H. et B. Marrs.** 1976. "Map of the genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*". *Journal of Bacteriology* **126**: 619-629.
- Zanon, J. P., M. F. S. Peres et E. A. L. Gattás.** 2007. "Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast". *Enzyme and Microbial Technology* **40**(3): 466-470.
- Zehr, J. P., S. Braun, Y. Chen et M. Mellon.** 1996. "Nitrogen fixation in the marine environment: relating genetic potential to nitrogenase activity". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **203**: 61-73.

- Zehr, J. P., B. D. Jenkins, S. M. Short et G. F. Steward.** 2003. "Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison". *Environmental Microbiology* **5**(7): 539-554.
- Zhang, Y., R. H. Burris, P. W. Ludden et G. P. Roberts.** 1997. "Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*". *FEMS Microbiology Letters* **152**(2): 195-204.