

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Rôle d'AmtB dans la régulation posttraductionnelle de la nitrogénase et le transport
de l'ammonium chez *Rhodobacter capsulatus*

par

Pier-Luc Tremblay

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en microbiologie et immunologie

Avril, 2008

© Pier-Luc Tremblay, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Rôle d'AmtB dans la régulation posttraductionnelle de la nitrogénase et le transport
de l'ammonium chez *Rhodobacter capsulatus*

présentée par:

Pier-Luc Tremblay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Marc Drolet, Président-rapporteur

Patrick C. Hallenbeck, Directeur de recherche

France Daigle, Membre du jury

James W. Coulton, Examineur externe

_____ Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Processus essentiel à la vie sur terre, la réduction de l'azote diatomique en ammoniac est effectuée par un groupe restreint de procaryotes. Cette réaction catalysée par la famille des nitrogénases requiert entre 20 et 30 moles d'ATP pour chaque mole d'azote réduite. Par conséquent, une régulation rigoureuse et précise de l'expression et de l'activité de ces enzymes permet à la cellule bactérienne d'économiser de l'énergie. Chez les bactéries pourpres non-sulfureuses, l'inhibition réversible de l'activité des nitrogénases est causée par l'ajout d'ammonium dans le milieu, par la noirceur ou la teneur en oxygène. À cause de considérations énergétiques, ces α -protéobactéries au métabolisme polyvalent pratiquent la fixation de l'azote principalement lors de la photosynthèse anoxygénique. Le mode de régulation posttraductionnelle le mieux caractérisé est l'ADP-ribosylation de l'une des sous-unités du complexe enzymatique de la nitrogénase molybdène. DraT, une ADP-ribosyltransférase, effectue la modification. Lorsque le signal (ammonium ou noirceur) responsable de la perte d'activité disparaît, DraG, une ADP-ribosylglycohydrolase, enlève le résidu ADP-ribosyl.

Chez *Rhodobacter capsulatus*, l'ajout d'ammonium inhibe réversiblement l'activité de la nitrogénase molybdène via un mécanisme ADP-ribosylation dépendant et/ou un autre mécanisme ADP-ribosylation indépendant. Dans les deux cas, AmtB, un transporteur d'ammonium, et GlnB/GlnK, les protéines PII jouant un rôle central dans la régulation de l'assimilation et de la fixation de l'azote, sont impliqués. En effet, l'inactivation par insertion ou délétion de l'un des trois gènes codant pour ces protéines entraîne l'abolition de la régulation posttraductionnelle de la nitrogénase molybdène. Dans cette thèse de doctorat, nous rapportons des éléments nouveaux permettant de mieux comprendre le rôle d'AmtB et des protéines PII dans cette voie de transduction du signal. La séquestration de GlnB et de GlnK par AmtB après l'ajout d'ammonium a été démontrée. Le rapport glutamine/ α -cétoglutarate (variant à la hausse en présence d'ammonium) régit l'état d'uridylylation des protéines PII. L'impact limité de cette modification des protéines PII dans leur

interaction avec AmtB a été caractérisé. La génération de mutations ponctuelles et de délétions dans AmtB a permis d'apporter d'autres évidences quant au rôle potentiel de certains acides aminés et de la queue C-terminale dans le transport de l'ammonium, l'interaction avec GlnB/GlnK et la régulation de la nitrogénase molybdène. L'ensemble des résultats obtenus avec cette analyse mutationnelle permet de conclure que la séquestration de GlnK est nécessaire mais insuffisante pour conduire à l'inhibition réversible de la nitrogénase molybdène. De plus, AmtB doit être compétente pour le transport d'ammonium pour qu'il y ait une régulation standard de la fixation de l'azote.

Mots clés: fixation de l'azote, nitrogénase, régulation posttraductionnelle, ADP-ribosylation, transduction du signal, transporteur d'ammonium, protéines PII, séquestration membranaire

ABSTRACT

The biological reduction of diatomic nitrogen to ammonia, carried out by a small group of prokaryotes, is an essential process for life on earth. Catalyzed by the nitrogenase family, this reaction requires between 20 and 30 moles of ATP per mole of dinitrogen reduced. Consequently, a strict and precise regulation of nitrogenase expression and activity ensures an efficient utilization of energy by the bacterial cell. In the purple non-sulfur bacteria, reversible inhibition of nitrogenases activity is induced by ammonium addition, darkness, or exposition to oxygen. Due to energetic considerations, these metabolically versatile α -proteobacteria carry out nitrogen fixation most effectively during anoxygenic photosynthesis. ADP-ribosylation of a subunit of the molybdenum nitrogenase enzymatic complex is the most studied mode of posttranslational nitrogenase regulation. DraT, an ADP-ribosyltransferase, performs the protein modification. Once the inhibiting signal (ammonium or darkness) disappears, DraG, an ADP-ribosylglycohydrolase, removes the ADP-ribosyl residue.

In *Rhodobacter capsulatus*, ammonium addition reversibly inhibits molybdenum nitrogenase activity via an ADP-ribosylation-dependent mechanism and/or an ADP-ribosylation-independent mechanism. In both cases, AmtB, an ammonium transporter and GlnB/GlnK (PII proteins), central regulatory proteins in nitrogen assimilation and fixation, are implicated. Inactivation by insertion or deletion of any one of the three genes coding for these proteins abolishes posttranslational regulation of the molybdenum nitrogenase. In this PhD. thesis, we report new elements enlightening the role of AmtB and of the PII proteins in this signal transduction pathway. The ammonium-dependent GlnB/GlnK sequestration by *R. capsulatus* AmtB was demonstrated. The uridylylation state of PII proteins is governed by the glutamine/2-oxoglutarate ratio (which increases after ammonium addition). The limited impact of this modification on the AmtB-PII complex formation/dissociation was characterized. Substitutions and deletions in AmtB provided other evidence concerning the function of specific highly conserved amino

acids and of the C-terminal tail in ammonium transport, GlnB/GlnK sequestration and posttranslational regulation of the molybdenum nitrogenase. This mutational analysis also reveals that GlnK-AmtB complex formation in itself is necessary but not sufficient for the reversible inhibition of the molybdenum nitrogenase. Moreover, a correlation between ammonium transport by AmtB and regulation of molybdenum nitrogenase activity was observed.

Key words: nitrogen fixation, nitrogenase, posttranslational regulation, ADP-ribosylation, signal transduction, ammonium transporter, PII proteins, membrane sequestration.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
REMERCIEMENTS.....	xi
CHAPITRE I.....	2
REVIEW DE LITTÉRATURE.....	2
1. MÉTABOLISME DE L'AZOTE.....	2
1.1 L'assimilation de l'azote.....	3
1.1.1 La glutamate déshydrogénase et la L-alanine déshydrogénase.....	4
1.1.2 La glutamate synthase.....	7
1.1.3 La glutamine synthétase.....	11
1.1.3.1 La régulation transcriptionnelle de la glutamine synthétase.....	13
1.1.3.2 Les facteurs σ^{70} et σ^{54}	15
1.1.3.3 Le système de régulation à deux composants NtrB/NtrC.....	17
1.1.3.4 Régulation de l'activité de NtrB par GlnB et GlnK (PII).....	20
1.1.3.5 Autres régulateurs de la transcription de <i>glnALG</i>	24
1.1.3.6 La régulation posttraductionnelle de la glutamine synthétase.....	26
1.1.3.7 L'adénylyltransférase (GlnE).....	27
1.1.3.8 L'uridylyltransférase (GlnD).....	29
1.2 La fixation de l'azote.....	31
1.2.1 La nitrogénase.....	32
1.2.1.1 La dinitrogénase réductase.....	33
1.2.1.2 La dinitrogénase.....	33
1.2.1.3 Les nitrogénases alternatives.....	36
1.2.1.4 Transport des électrons jusqu'à la dinitrogénase réductase.....	37
1.2.1.5 Maturation de la nitrogénase.....	40
1.2.1.6 Diversité des organismes réducteurs de N ₂	42
1.2.2 La régulation de l'expression et de l'activité de la nitrogénase.....	48
1.2.2.1 Organisation des gènes de la fixation de l'azote.....	49
1.2.2.2 Structure des opérons <i>nifHDK</i> et <i>anfHDGK</i>	54
1.2.2.3 Les activateurs NifA et AnfA.....	55
1.2.2.4 La régulation de la transcription de <i>nifA1</i> , <i>nifA2</i> et <i>anfA</i> par NtrB/C.....	57
1.2.2.5 Oxygène et intensité lumineuse: RegB/RegA et HvrA.....	59
1.2.2.6 Le transport du molybdène et la répression d' <i>anfA</i>	64
1.2.2.7 GlnB/GlnK et la régulation de l'activité de NifA et d'AnfA.....	65
1.2.2.8 NifL et le contrôle de l'activité de NifA.....	67
1.2.2.9 La régulation posttraductionnelle des nitrogénases molybdène et fer.....	71
1.2.2.10 DraT et DraG.....	73
1.2.2.11 Autres mécanismes d'ADP-ribosylation.....	77
2. LA FAMILLE DE PROTÉINES AMT/MEP/RH.....	79
2.1 Structure des protéines Amt/Mep.....	82

2.2	Identité du substrat: le NH_3 ou le NH_4^+ ?	87
2.3	Les protéines Rhesus (Rh)	92
2.4	Interaction entre Amt et les protéines PII	94
2.5	Conclusion	99
CHAPITRE II		101
RÉSULTATS		101
CHAPITRE III		167
DISCUSSION		167
BIBLIOGRAPHIE		182
ANNEXE A		217

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I. Distribution phylogénétique des gènes <i>nifH</i> à travers les espèces cultivables.....	46
TABLEAU II. Organisation des gènes impliqués dans la fixation et l'assimilation de l'azote chez <i>Rhodobacter capsulatus</i> et fonction de leur produit	51
TABLEAU III. Cibles et effets physiologiques de différentes toxines ADP-ribosylantes.....	79
TABLEAU IV. Temps de doublement de souches d' <i>E. coli</i> cultivées dans un milieu minimal M9 à pH 5 en présence de 1 mM NH ₄ Cl à 37 °C	225

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	Cycle de l'azote.....	2
FIGURE 2.	Opéron <i>gdhA</i> d' <i>Escherichia coli</i>	6
FIGURE 3.	Opéron <i>gltBDF</i> d' <i>Escherichia coli</i>	8
FIGURE 4.	i. Site actif et anneau hexamérique de la glutamine synthétase. ii. Cycle de la biosynthèse de la glutamine effectué par la glutamine synthétase	13
FIGURE 5.	Opéron <i>glnALG</i> d' <i>Escherichia coli</i>	14
FIGURE 6.	Rôle de GlnB d' <i>Escherichia coli</i> dans l'expression et l'activité de la glutamine synthétase	22
FIGURE 7.	Structure du trimère PII de <i>Synechococcus elongatus</i> représentative de la famille GlnB-K.....	23
FIGURE 8.	Uridylylation/déuridylylation des protéines PII.....	29
FIGURE 9.	i. Structure de la dinitrogénase (MoFe-protein) et de la dinitrogénase réductase (Fe-protein). ii. Cofacteur FeMo et centre P de la dinitrogénase. iii. Circulation des électrons entre la dinitrogénase réductase et la dinitrogénase	35
FIGURE 10.	Intermédiaires dans la réduction du N ₂ au niveau du cofacteur FeMo	36
FIGURE 11.	Maturation de la dinitrogénase.....	41
FIGURE 12.	Schéma représentant les 3 niveaux de régulation de l'expression et de l'activité des nitrogénases molybdène et fer de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	51
FIGURE 13.	Représentation des différents systèmes dont l'expression est régulée par RegB/RegA chez <i>Rhodobacter capsulatus</i> et <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	61
FIGURE 14.	Identification d'interactions protéiques impliquant GlnB, GlnK, NtrB, NifA1, NifA2, PcrA, DraT et Era de <i>Rhodobacter capsulatus</i> avec un système levure à deux hybrides.....	66
FIGURE 15.	Interaction entre GlnK, NifL et NifA d' <i>Azotobacter vinelandii</i> en réponse à différents stimuli environnementaux.....	69
FIGURE 16.	Interaction entre GlnK, NifL et NifA de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en réponse à différents stimuli environnementaux.....	70
FIGURE 17.	Modèle de la régulation de l'activité de DraT et de DraG d' <i>Azospirillum brasilense</i> en réponse à un choc NH ₄ ⁺	76
FIGURE 18.	Évolution des protéines Amt et Rh et distribution des gènes codant pour celles-ci dans les trois royaumes de la vie	81
FIGURE 19.	i. Structure de l'homotrimère AmtB d' <i>Escherichia coli</i> . ii. Structure de l'homotrimère Amt-1 d' <i>Archeoglobus fulgidus</i>	83
FIGURE 20.	Structure du site de recrutement périplasmique du NH ₄ ⁺ et du pore hydrophobe d'AmtB d' <i>Escherichia coli</i>	86
FIGURE 21.	Interactions de la queue C-terminale cytoplasmique d'un monomère AmtB d' <i>Escherichia coli</i> avec la sous-unité adjacente	87
FIGURE 22.	Mécanismes de transport associés aux protéines Amt/Rh	90
FIGURE 23.	Transport du NH ₄ ⁺ par AmtB d' <i>Escherichia coli</i>	91
FIGURE 24.	Structure de la protéine NeRh50 de <i>Nitrosomonas europaea</i>	94
FIGURE 25.	Structure du complexe GlnK-AmtB d' <i>Escherichia coli</i>	97

FIGURE 26. Blocage du pore hydrophobe d'AmtB d' <i>Escherichia coli</i> par la boucle T de GlnK.....	98
FIGURE 27. Régulation de l'activité de la glutamine synthétase de différents <i>Rhodobacter capsulatus</i> mutants.....	217
FIGURE 28. Alignement de séquences en acides aminés de membres sélectionnés de la famille Amt/Mep	218
FIGURE 29. Arrangement topologique de la séquence en acides aminés d'AmtB d' <i>Escherichia coli</i>	220
FIGURE 30. Participation de l'hélice α transmembranaire M1 à la trimérisation d'AmtB d' <i>Escherichia coli</i>	221
FIGURE 31. Séquestration de GlnB par des variants AmtB	222
FIGURE 32. Modèle expliquant la fonction de senseur du niveau d'ammonium d'AmtB d' <i>Escherichia coli</i>	223
FIGURE 33. Uridylylation/déuridylylation des protéines PII dans une souche <i>amtB</i>	224

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ADPR	Adénosine diphosphate ribose
AT-N	Domaine N-terminal de l'adénylyltransférase (GlnE)
AT-C	Domaine C-terminal de l'adénylyltransférase (GlnE)
α CG	α -cétoglutarate
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
°C	Degré centigrade
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CD	Domaine central de NifA
CoA	Coenzyme-A
CTP	Cytosine triphosphate
DBD	Domaine C-terminal de NifA
é	Électron
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fe-S	Centre fer-soufre
FMN	Flavine mononucléotide
GDP	Guanine diphosphate
GTP	Guanine triphosphate
H	Heure
HTH	Motif d'attachement à l'ADN Helix-turn-Helix
kb	Kilopaire de bases
kDa	KiloDalton
μ M	Micromolaire
mM	Millimolaire
M	Molaire
mg	Milligramme
min	Minute
NAD ⁺ /H	Nicotinamide adénine dinucléotide (+: oxydée; H: réduite)
NADP ⁺ /H	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (+: oxydée; H: réduite)
ND	Domaine N-terminal de NifA
NT	Domaine N-terminal de l'uridylyltransférase (GlnD)
P/P _i	Phosphate
pb	Paire de bases
R	Domaine central de l'adénylyltransférase (GlnE)
TM	Hélice α transmembranaire
UMP	Uracile monophosphate
UTP	Uracile triphosphate

REMERCIEMENTS

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

Tout d'abord, je remercie mon directeur de thèse, Patrick C. Hallenbeck, pour sa générosité et son support constant. Ses précieux conseils ont grandement contribué à améliorer la qualité de mon travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers nos collaborateurs de l'université Ruhr Bochum, Bernd Masepohl et Thomas Drepper, pour leur importante participation à ma première publication. Merci à Amélie Pelletier, ancienne étudiante à la maîtrise, pour son travail sur la protéine GlnK. Je veux souligner les efforts de trois stagiaires, Irina Moukhina, Lina Hadj et Rita Simo-Guemfing, qui ont contribué à faire progresser mon investigation.

Je remercie les collègues du laboratoire qui travaille ou qui ont travaillé sur la production biologique de l'hydrogène: Ariane Bisailon, Guillaume Sabourin, Jonathan Turcot et Jose J. Mansure. Vous avez suscité des discussions scientifiques et générales palpitantes.

Finalement, pour leurs encouragements, je dis merci à ma famille, Carol, Marjolaine, Karine et Nadine.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Métabolisme de l'azote

Le cycle biogéochimique de l'azote est alimenté par un réservoir d'azote atmosphérique (N_2) de plus de 3.8×10^{15} tonnes métriques. Six processus, tous mis en marche par des microorganismes, permettent aux différentes formes réduites ou oxydées de l'azote de circuler dans l'environnement: la fixation, l'assimilation, l'ammonification, la nitrification, la dénitrification et l'oxydation anaérobie de l'ammonium (NH_4^+) (anammox) (voir figure 1) (Atlas et Bartha, 1998).

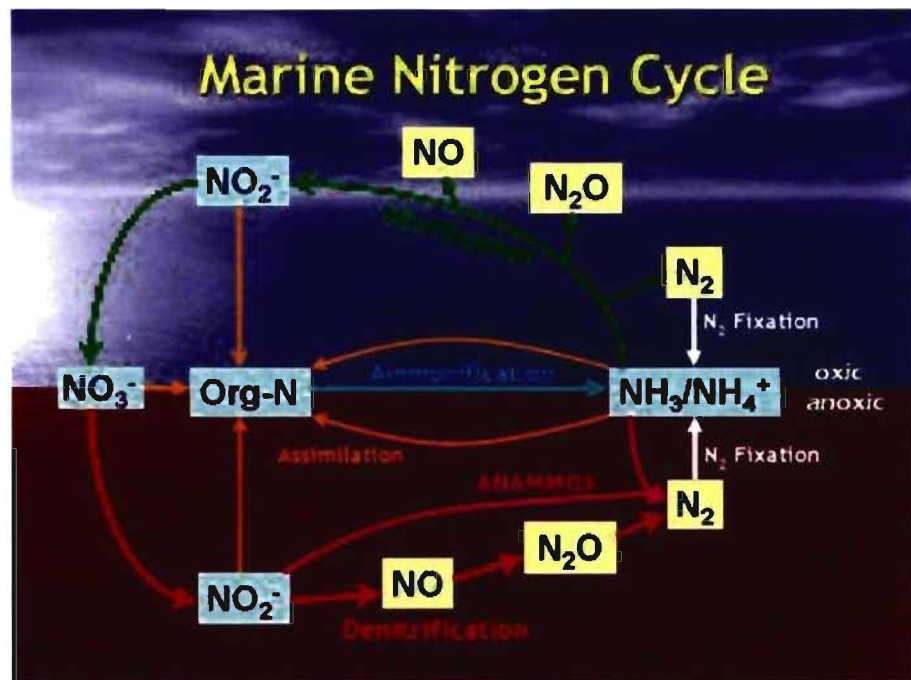


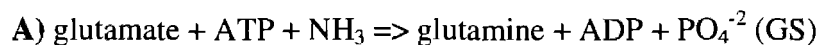
Figure 1. Cycle de l'azote. (Figure tirée de http://www.mpi-bremen.de/en/Nitrogen_Cycling_in_the_Black_Sea.html).

En résumé, la fixation consiste en la réduction du N_2 en ammoniac (NH_3). Le NH_3 est ensuite assimilé par les plantes et incorporé dans des molécules organiques comme les acides aminés, les nucléotides, etc. Les acides aminés et d'autres petites molécules contenant de l'azote peuvent être assimilés directement par les animaux, les champignons et divers hétérotrophes. L'azote organique des plantes et des

animaux morts est reconverti en NH_3 par ammonification. La nitrification, effectuée par des bactéries du sol, consiste en l'oxydation du NH_3 jusqu'au nitrate (NO_3^-) en passant par le nitrite (NO_2^-). Les plantes assimilent aussi le NO_3^- et le réduisent en NH_3 . Pour compléter le cycle, le NO_3^- est réduit en N_2 en passant par les intermédiaires suivants: le NO_2^- , le monoxyde d'azote (NO) et le protoxyde d'azote (N_2O). Dans l'océan, le NH_3 et le NO_2^- peuvent être convertis directement en N_2 par un processus appelé anammox. Dans ce cas, le NH_4^+ , la forme cationique du couple $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ majoritaire en solution à un pH physiologique, réagit avec le NO_2^- pour donner du N_2 et deux molécules d'eau. La première partie de cette revue de littérature se consacrera à l'assimilation et la fixation de l'azote.

1.1 L'assimilation de l'azote

Une variété de composés organiques azotés peut être assimilée par les microorganismes. Le NH_3 est souvent la source d'azote préférée. C'est le cas pour *Escherichia coli* puisque le NH_3 supporte le taux de croissance le plus rapide. *E. coli* a servi d'organisme modèle pour l'étude de l'assimilation du NH_3 . Deux voies métaboliques entrent en jeu pour la génération de glutamate et de glutamine à partir du NH_3 . Lorsque le milieu est limité en NH_3 , la glutamine synthétase (GS) (GlnA) et la glutamate synthase (GOGAT) (GltBD) catalysent les réactions suivantes:

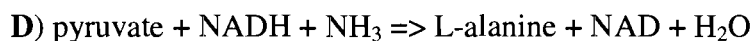


Lorsque le NH_3 est abondant dans le milieu, la glutamate déshydrogénase (GDH) (GdhA) catalyse la réaction suivante :



Chez certaines bactéries pourpres non-sulfureuses telles que *Rhodobacter capsulatus* et *Rhodoblastus acidophilus*, la L-alanine déshydrogénase (AldA) est responsable de

l'assimilation de l'azote dans un milieu riche en NH_3 en catalysant la réaction suivante (Caballero et al., 1989; Herbert et al., 1978) :



La voie d'assimilation GS-GOGAT est plus appropriée dans un environnement pauvre en NH_3 parce que l'affinité de la glutamine synthétase pour le NH_3 est plus haute que celle de la glutamate déhydrogénase. En effet, la constante de Michaelis (K_m) de la glutamine synthétase pour le NH_3 est de $<0,2$ mM alors que celle de la glutamate déhydrogénase est de >1 mM (Miller et Stadtman, 1972). Par contre, la voie GS-GOGAT nécessite près de 15 % des molécules d'ATP disponibles dans la cellule (Lengeler et al., 1999). Une fois la glutamine et le glutamate synthétisés, et donc le NH_3 assimilé, diverses voies métaboliques sont alimentées pour la synthèse des composantes azotées de la cellule (Revue par Reitzer, 2003). Le glutamate fournit ~88 % de l'azote cellulaire et la glutamine fournit le reste (Wohlheuter et al., 1973). Outre son rôle dans la biosynthèse, chez *Escherichia coli*, le glutamate participe à la réponse de la cellule au stress osmotique. Quand l'osmolarité externe s'accroît, la concentration intracellulaire en glutamate et en K^+ augmente (Revue par Csonka et Hanson, 1991). Le glutamate forme le plus important groupe d'anions contrebalançant la présence de K^+ . La concentration en glutamate demeure constante en dépit de l'ajout d'azote externe (Revue par Csonka et Hanson, 1991). En permanence inférieure à la concentration en glutamate, la concentration en glutamine intracellulaire varie selon la disponibilité en azote externe et est un indicateur de celle-ci (Ikeda et al., 1996). Le rôle détaillé de la glutamine dans la régulation du métabolisme de l'azote sera abordé ultérieurement.

1.1.1 La glutamate déhydrogénase et la L-alanine déhydrogénase

La glutamate déhydrogénase est un hexamère composé de sous-unités identiques avec un poids moléculaire total de 300 kDa. Cette enzyme est encodée par le gène monocistronique *gdhA* à partir d'un promoteur unique σ^{70} -dépendant (voir

figure 2). Chez *Escherichia coli*, la présence de glutamate ou d'aspartate externe réprime l'expression de la glutamate déhydrogénase par un mécanisme inconnu (Revue par Reitzer, 1996). Chez une autre entérobactérie, *Klebsiella aerogenes*, l'ajout de lysine dans le milieu réduit par deux la formation de glutamate déhydrogénase *in vivo* (Janes et al., 2001). La pauvreté du milieu en NH_3 entraîne aussi une réduction de la transcription de *gdhA*. La protéine NAC (Nitrogen Assimilation Control) cause cette répression chez *Escherichia coli*, chez *Klebsiella aerogenes* et chez *Klebsiella pneumoniae* (Camarena et al., 1998; Macaluso et al., 1990; Rosario et Bender, 2005). NAC est composée de deux sous-unités identiques de 32 kDa et appartient à la famille des régulateurs de la transcription LysR. En effet, NAC possède en N-terminal un motif d'attachement à l'ADN HTH (Helix-Turn-Helix) typique de la famille LysR. Contrairement aux régulateurs de cette famille, la protéine NAC n'a pas besoin de l'attachement d'une petite molécule effectrice en C-terminal pour être active (Schwacha et Bender, 1993). En plus de la glutamate déhydrogénase, NAC réprime sa propre expression et celle de la glutamate synthase. NAC active la transcription des opérons *hut* (histidine utilization), *ure* (urea utilization), *dad* (d-amino acid dehydrogenase) et *cod* (cytosine deaminase). À remarquer, tous ces opérons sont transcrits avec une ARN polymérase associée au facteur σ^{70} . Quant au gène *nac*, il est transcrit par une ARN polymérase associée au facteur σ^{54} et nécessite la présence de l'activateur NtrC~P. Cette protéine est phosphorylée lorsque la concentration en NH_3 dans le milieu est faible. Ainsi, NAC permet le couplage du système de régulation à deux composantes NtrB (NRII) / NtrC (NRI) avec des opérons transcrits à l'aide du facteur σ^{70} (Bender, 1991). Les sections 1.1.3.2 et 1.1.3.3 apporteront plus de détails quant aux facteurs σ et au système de régulation à deux composantes Ntr. Chez *Klebsiella aerogenes*, la transcription de *gdhA* est réduite par trois lorsque NAC s'attache à une séquence ATC-N₉-TAT aux alentours de la position -89 par rapport au site d'initiation de la transcription. Dans cette conformation, Nac concurrence probablement un activateur inhibé par la présence de lysine. La répression est plus forte (10 fois moins de transcription de *gdhA*) lorsque NAC, sous une forme tétramérique, s'attache aux alentours des

positions -89 et +57 et induit la formation d'une boucle d'ADN bloquant la transcription (Goss et al., 2002; Rosario et Bender, 2005).



Figure 2. Opéron *gdhA* d'*Escherichia coli*. Légende: rose = répresseur. (Figure tirée de <http://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=OPERON&object=TU0-1201>; Keseler et al., 2004).

Chez *Escherichia coli*, un site d'attachement pour la protéine régulatrice CRP (ou CAP) couvrant la région -35 du promoteur de *gdhA* a été identifié (Riba et al., 1988). Cet homodimère de 44 kDa possède deux motifs d'attachement à l'ADN HTH et est impliqué dans la répression catabolique; c'est-à-dire dans la gestion de l'expression des enzymes nécessaires au métabolisme de sources de carbone (lactose, maltose, glycérol, etc.) moins favorables à la croissance bactérienne après l'épuisement du glucose, un sucre permettant une croissance plus rapide. CRP active la transcription à partir de plus d'une centaine de promoteurs et réprime l'expression de certains gènes tel que *ompA* (outer membrane complex A protein), *crp* et l'opéron *gal* (galactose). En présence de l'effecteur allostérique cAMP (AMP cyclique), la protéine CRP s'attache à une séquence de 22 pb et améliore ou rend difficile l'accès au promoteur de l'ARN polymérase (Revue par Lawson et al., 2004). La concentration en cAMP est inversement proportionnelle au taux de croissance. L'enzyme responsable de la synthèse du cAMP, l'adénylate cyclase (Cya), est probablement activée par la forme phosphorylée de IIA^{Glc}, une protéine jouant un rôle dans le système phosphoénolpyruvate:sucre phosphotransférase de transport des sucres (PTS) (Park et al., 2006). Dans le cas de *gdhA*, la protéine CRP est un répresseur puisque la quantité d'ARNm et l'activité de GdhA sont plus importante en présence de glucose qu'en présence de glycérol (Riba et al., 1988).

La L-alanine déhydrogénase de *Rhodobacter capsulatus* est composée de six sous-unités identiques et possède un poids moléculaire total de 240 kDa. Le K_m de cette enzyme pour le NH_3 se situe entre 8.3 mM et 28 mM dépendant de la souche de *Rhodobacter capsulatus* étudiée (Caballero et al., 1989). La régulation de l'expression ou de l'activité de la L-alanine déhydrogénase est un sujet peu étudié. Chez *Rhizobium leguminosarum*, une bactérie symbiotique fixatrice d'azote, un régulateur de la famille AsnC-Lrp, AldR, est nécessaire pour l'expression d'AldA (Lodwig et al., 2004). Le régulateur AldR est une protéine de 17 kDa possédant un motif d'attachement à l'ADN HTH en N-terminal typique de la famille AsnC.

1.1.2 La glutamate synthase

La glutamate synthase de la bactérie pourpre non-sulfureuse *Azospirillum brasilense* est composée de quatre hétérodimères formés d'une sous-unité de 160 kDa et d'une autre de 52 kDa. *gltB* encode la grosse sous-unité alors que *gltD* encode la petite sous-unité. GltB contient un cofacteur FMN (Flavine Mononucléotide) et un centre $[3\text{Fe-4S}]^{0,+1}$. GltD contient un cofacteur FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et probablement deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{+1,+2}$ (Agnelli et al., 2005). GltB catalyse la synthèse réductive du glutamate à partir de la glutamine et de l' α -cétoglutarate (αCG). La petite sous-unité GltD est une NADPH oxydoréductase FAD-dépendante qui transfère des équivalents réducteurs du NADPH en passant par le cofacteur FAD, le centre $[3\text{Fe-4S}]^{0,+1}$ et au moins l'un des deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{+1,+2}$ jusqu'au cofacteur FMN de la grosse sous-unité GltB (Revue par Van den Heuvel et al., 2004).

Les gènes *gltB* et *gltD* sont situés sur l'opéron *gltBDF* transcrit à partir d'un promoteur possédant un motif reconnu par le facteur σ^{70} (voir figure 3). Aucun rôle spécifique n'a été identifié pour GltF jusqu'à maintenant (Goss et al., 2001). Quatre répresseurs et trois activateurs sont impliqués dans la régulation de l'opéron *gltBDF* d'*Escherichia coli*. Tout comme pour *gdhA*, CRP-cAMP s'attache en amont de l'opéron *gltBDF* aux alentours de la position -65 et fait office de répresseur (Paul et

al., 2007). La protéine NAC est aussi impliquée dans la régulation négative de *gltBDF* (Zimmer et al., 2000).



Figure 3. Opéron *gltBDF* d'*Escherichia coli*. Légende: rose = répresseur; vert = activateur. (Figure tirée de <http://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=EG10403>; Keseler et al., 2004).

Le régulateur ArgR peut s'attacher aux alentours des sites -352 et -331 en amont de *gltBDF* et réduit l'expression de cet opéron. ArgR est un hexamère de 98 kDa composé de deux trimères liés par six arginine (Van Duyne et al., 1996). La partie N-terminale de la protéine contient un site d'attachement à l'ADN HTH alors que la partie C-terminale contient un site d'attachement pour l'arginine. ArgR reconnaît un opérateur constitué de deux séquences d'ADN plus ou moins palindromiques de 18 pb séparées par 2 ou 3 pb appelées boîtes ARG (Berg, 1988). En plus de réprimer la transcription d'une trentaine de gènes donc ceux responsables de la biosynthèse de l'arginine (*argE*, *argI*, *argCBH*, *argD*, *argR*, *argG*, *carAB*, etc.), ArgR est impliqué dans la recombinaison site-spécifique permettant la résolution en monomère de multimères de plasmides possédant un origine de répllication ColE1 (Stirling et al., 1988). Sachant que le glutamate est un précurseur de l'ornithine qui à son tour est convertit en arginine, le produit final de cette voie de synthèse exerce donc une inhibition «feedback» par l'entremise d'ArgR sur la glutamate synthase.

FNR (Fumarate and Nitrate Reduction) est le dernier facteur de transcription réprimant légèrement l'expression de la glutamate synthase (Constantinidou et al., 2006). De la même famille que le régulateur CRP, FNR est un homodimère de 56 kDa possédant un motif d'attachement à l'ADN HTH en C-terminal et un centre Fe-S

en N-terminal (Revue par Körner et al., 2003). FNR contrôle l'expression de plus de 100 gènes impliqués dans le passage de la bactérie d'un environnement aérobie à un environnement anaérobie. En particulier, FNR réprime l'expression des gènes responsables de la respiration aérobie et active ceux qui permettent la réduction d'accepteurs d'électrons alternatifs comme le nitrate et le fumarate. Le centre Fe-S permet à FNR de sentir le niveau d'O₂ dans la cellule. En effet, l'O₂ convertit les deux centres [4Fe-4S]²⁺ du dimère en centres [2Fe-2S]²⁺. Dans cette conformation, FNR devient incapable de se lier à l'ADN à cause d'une diminution de son taux de dimérisation (Revue par Kiley et Beinert, 2003).

En absence des activateurs Lrp (Leucine-responsive Regulatory Protein) et IHF (Integration Host Factor), l'expression de l'opéron *gltBDF* est réduite 30 fois (Paul et al., 2001). Ces deux protéines s'attachent simultanément en amont de *gltBDF*; aux alentours des positions -246, -215 et -152 pour Lrp et des positions -89 et -85 pour IHF. Lrp d'*Escherichia coli* est un homodimère de ~40 kDa possédant un motif d'attachement à l'ADN HTH en N-terminal, un domaine central responsable de la régulation de la transcription et un domaine C-terminal sensible à la leucine. Lrp affecte la transcription d'au moins 10% de tous les gènes d'*Escherichia coli*; entre autre, ceux impliqués dans le métabolisme des acides aminés ou dans la synthèse des pili (Revue par Brinkman et al., 2003). La leucine indique au régulateur Lrp la quantité disponible de protéines et de peptides dans le milieu. Dépendant de l'abondance en nutriments, Lrp inhibe habituellement l'expression des gènes associés au catabolisme et active l'expression de ceux associés à l'anabolisme. La leucine peut atténuer ou accentuer l'activité de régulation de Lrp ou encore n'avoir aucun effet. Une cellule d'*E. coli* contient 3000 dimères de Lrp. À une concentration comparable *in vitro*, les dimères Lrp forment un complexe hexadécamérique réduit en octamère en présence de leucine (Chen et al., 2001; Chen et Calvo, 2002). Selon le modèle proposé par Chen et al. (2001), les deux formes oligomériques de Lrp interagissent avec différents promoteurs ce qui explique la variabilité des effets de la leucine. Compte tenu de la grande quantité de Lrp dans la cellule, ce régulateur pourrait agir aussi en tant qu'organisateur de la structure du chromosome (D'Ari et al., 1993).

Dans le cas de l'opéron *gltBDF*, la régulation Lrp est peu sensible à la leucine. Par contre, l'expression de Lrp est stimulée par le ppGpp (3', 5'-bipyrophosphate guanosine), un indicateur d'une limitation en acides aminés ou en sources d'énergie (Landgraf et al., 1996). La combinaison d'IHF et de Lrp stabilise le complexe formé entre l'ARN polymérase et le promoteur. IHF pourrait plier l'ADN de manière à permettre un contact entre les complexes ARN-polymérase-*gltBp* et Lrp-ADN (Paul et al., 2007). IHF est un hétérodimère composé de deux sous-unités de 10 kDa chacune encodées par *himA* et *himD*. Contrairement aux autres membres de la famille «DNA-binding Proteins» de type II (HU, TF1, etc.), IHF reconnaît la séquence consensus T/AATCAANNNTTA/G et s'attache spécifiquement à ce site (Revue par Travers, 1997). IHF plie l'ADN de 160° et participe, entre autre, à la condensation du chromosome (Revue par Swinger et Rice, 2004).

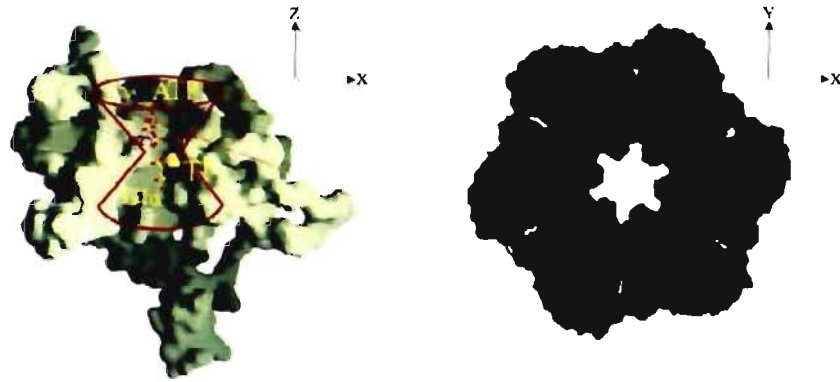
Le troisième et dernier facteur activant la transcription de *gltBDF* est GadE, une protéine impliquée dans l'adaptation d'*Escherichia coli* à un environnement acide (Hommais et al., 2004). GadE a un poids moléculaire de ~20 kDa et contient un motif d'attachement à l'ADN en C-terminal typique de la famille LuxR. L'effet positif de GadE sur la transcription de *gltBDF* a été démontré par micropuce ADN et l'attachement de GadE au promoteur de *gltBDF* a été observé par retard sur gel. GadE est exprimée préférentiellement à un pH acide de 4.5 ou 5.5 par rapport à un pH de 7.4 (Tucker et al., 2002). *E. coli* possède quatre systèmes pour survivre dans un milieu acide: un système réprimé par le glucose peu caractérisé et trois systèmes basés respectivement sur la décarboxylation du glutamate, de l'arginine et de la lysine (Castanie-Cornet et al., 2001; Iyer et al., 2003). De ces quatre mécanismes, la décarboxylation du glutamate est celui qui consomme le plus de protons. Puisque le transport du glutamate à l'intérieur de la cellule entraîne l'entrée simultanée d'un proton, la production intracellulaire de glutamate par GltBD est essentielle pour que ce système de survie soit efficace. En plus de cet opéron, GadE active, entre autre, l'expression des gènes *gadA*, *gadB* et *gadC* responsables de la décarboxylation du glutamate (Ma et al., 2003).

1.1.3 La glutamine synthétase

La glutamine synthétase bactérienne est un dodécamère de ~620 kDa formé de deux anneaux hexamériques se faisant face (voir figure 4i). L'enzyme possède 12 sites actifs localisés à l'interface entre le domaine C-terminal d'une sous-unité et le domaine N-terminal de la sous-unité adjacente. La grande majorité des résidus composant le site actif provient du domaine C-terminal. Le glutamate et l'ATP s'attache aux extrémités opposées du site actif en forme de sablier (voir figures 4i et 4ii). Au centre du site actif, 2 Mg^{2+} et/ou 2 Mn^{2+} se lient aux sites n1 et n2. Le cation n1 stabilise la forme active de la glutamine synthétase et joue un rôle dans l'attachement du glutamate. Le cation n2 est impliqué dans le transfert du groupe phosphoryl-. La synthèse de la glutamine se fait en deux étapes: la formation de l'intermédiaire γ -glutamyl phosphate et la production de glutamine. En premier lieu, le cation n2 coordonne le γ -phosphate de l'ATP pour permettre la phosphorylation du groupe γ -carboxylate du glutamate et la synthèse de l'intermédiaire. Finalement, le NH_3 attaque le γ -glutamyl phosphate et entraîne la libération d'une molécule de phosphate et d'une molécule de glutamine (Revue par Eisenberg et al., 2000). D'un point de vue structural, l'arrivée de l'ATP à proximité du cation n2 provoque la migration de la boucle Asp-50', la portion N-terminale du site actif, vers le futur site d'attachement du NH_4^+ (voir figure 4ii). Simultanément, l'arginine 339 se déplace vers le site d'attachement du groupe γ -carboxylate du glutamate. Ces deux changements de conformation augmentent l'affinité de GlnA pour le NH_4^+ et le glutamate. Le glutamate pénètre ensuite dans le site actif et se lie au-dessus de la boucle Glu-327 (résidus 323-330) de façon à ce que le groupe γ -carboxylate soit dans l'entourage du cation n1. La fonction principale de la boucle Glu-327 est d'empêcher l'hydrolyse aberrante de l'intermédiaire γ -glutamyl phosphate en bloquant l'entrée du site actif. Le groupe amine du glutamate modifie l'orientation de la boucle Asn-264 (résidus 255-266) et permet à celle-ci de coopérer avec la sérine 53' de la boucle Asp-50' pour stabiliser la boucle Glu-327 dans une conformation favorisant la protection du site actif. La polarisation par les deux cations et l'arginine 339 du groupe γ -phosphate entraîne la synthèse du γ -glutamyl phosphate. Une fois cette

étape franchit, le NH_4^+ entre dans le site actif et s'ancre dans le vestibule chargé négativement formé par les résidus Glu-327, Asp-50', Tyr-179, Glu-212 et Ser-53'. Le NH_4^+ perd un proton au dépend de la chaîne latérale de l'asparagine 50'. L'attaque par le NH_3^+ du γ -glutamyl phosphate résulte en la formation d'un adduit tétraédrique lié à la glutamine 327 par un pont salin. Finalement, la glutamine est relâchée après le transfert d'un proton de l'adduit vers la glutamine 327 et l'ouverture du site actif par la boucle Glu-327 (Revue par Eisenberg et al., 2000).

i



ii

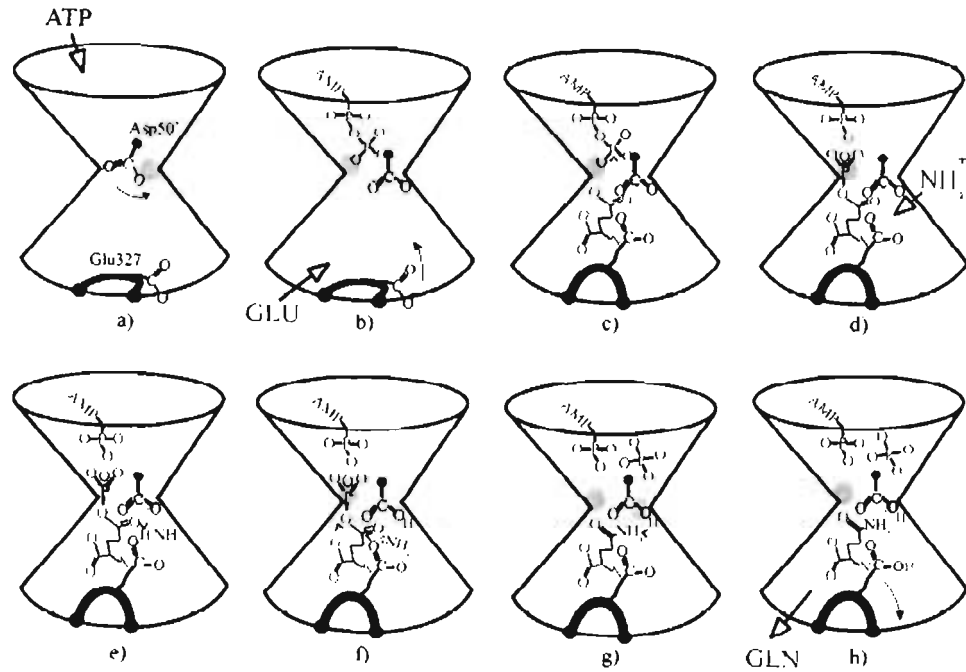


Figure 4. i. Site actif et anneau hexamérique de la glutamine synthétase. ii. Cycle de la biosynthèse de la glutamine effectué par la glutamine synthétase. (Figure tirée de Eisenberg et al., 2000).

1.1.3.1 La régulation transcriptionnelle de la glutamine synthétase

La glutamine synthétase est encodée par le gène *glnA* situé sur l'opéron *glnALG* (voir figure 5). GlnL (NtrB) et GlnG (NtrC) sont les membres d'un système

de régulation à deux composantes sur lequel nous reviendrons dans la section 1.1.3.3. Chez *Escherichia coli*, GlnA est transcrit à partir de deux promoteurs: *glnAp1* et *glnAp2*. Puisque la glutamine synthétase est la seule enzyme capable de fabriquer de la glutamine, la bactérie doit exprimer un niveau basal de GlnA indépendamment de la concentration en NH_3 dans le milieu. *glnAp1* est donc un promoteur plus faible que *glnAp2* permettant une transcription minimale de *glnALG* lorsqu'il y a abondance de NH_3 (Revue par Reitzer, 2003). Le promoteur σ^{70} -dépendant *glnAp1* est situé 116 pb en amont de *glnAp2*, un promoteur σ^{54} -dépendant. *glnAp2* est responsable de l'augmentation draconienne de la transcription de *glnA* en conditions de croissance déficientes en azote fixé. *glnAp1* et *glnAp2* peuvent assurer la transcription de *glnA* seul ou de l'opéron *glnALG* en entier. En effet, la transcription à partir de ces promoteurs peut prendre fin ou non au terminateur Rho-indépendant situé dans la partie 5' de *glnL* (Rocha et al., 1985). En aval de *glnA*, le promoteur *glnLp* σ^{70} -dépendant permet l'expression exclusive de *glnLG* (Pahel et al., 1982).

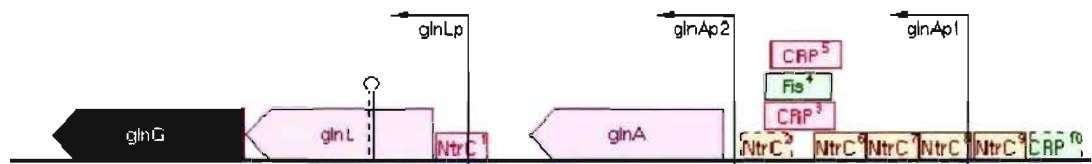


Figure 5. Opéron *glnALG* d'*Escherichia coli*. Légende: rose = répresseur; vert = activateur; brun = activateur et répresseur. (Figure tirée de <http://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=EG10383>; Keseler et al., 2004).

Chez les bactéries pourpres non-sulfureuses tel que *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* et *Azospirillum brasilense*, *glnA* fait partie de l'opéron *glnBA*. *glnB* code pour un régulateur PII; famille de protéines occupant une place central dans le métabolisme de l'azote. Chez *Rhodospirillum rubrum*, le promoteur faible σ^{70} -dépendant *glnBp1* et le promoteur fort σ^{54} -dépendant *glnBp2* ont des fonctions

similaires au couple *glnAp1* et *glnAp2* d'*Escherichia coli* (Cheng et al., 1999). Par contre, la transcription à partir de *glnBp2* en présence de NH_4^+ demeure plus forte que celle à partir de *glnBp1*. En plus des promoteurs *glnBp1* et *glnBp2*, l'opéron *glnBA* d'*Azospirillum brasilense* contient un troisième promoteur *glnAp* peu caractérisé et situé entre les régions codantes de *glnB* et de *glnA* (de Zamaroczy et al., 1993). Chez *Rhodobacter capsulatus*, malgré la présence de transcrits *glnBA* et de transcrits *glnA*, seulement un couple de promoteurs *glnBp1-2* bâti sur le même modèle que celui retrouvé chez *Rhodospirillum rubrum* a été détecté en amont de *glnBA* (Foster-Hartnett et Kranz, 1994). À la différence de *glnBp2* de *Rhodospirillum rubrum*, le promoteur fort *glnBp2* de *Rhodobacter capsulatus* est indépendant du facteur σ^{54} . Pour expliquer l'existence de transcrits *glnA*, Borghese et Wall (1995) ont recherché la présence de structures tige-boucle dans l'ARNm. Une structure tige-boucle potentielle située dans la partie 3' de *glnB* pourrait être la cible de la RnaseIII et entraîner une dégradation rapide de l'ARNm en amont. Une seconde structure tige-boucle comprenant le codon de départ de *glnB* pourrait compliquer la traduction de ce gène.

1.1.3.2 Les facteurs σ^{70} et σ^{54}

La transcription des régions codantes d'ADN en ARNm nécessite une structure en cis, le promoteur, et un complexe enzymatique composé de cinq sous-unités ($\beta\beta'\alpha_2\omega$), l'ARN polymérase. Pour s'attacher à une séquence promoteur spécifique et pour initier la transcription, l'ARN polymérase d'*Escherichia coli* doit s'adjoindre une autre sous-unité sélectionnée parmi l'un des sept facteurs σ . Deux facteurs σ sont impliqués dans l'expression de la glutamine synthétase: σ^{70} (*rpoD*) et σ^{54} (*rpoN*). La famille σ^{70} est responsable de l'initiation de la transcription des gènes ménage et des gènes facultatifs dans un environnement donné. C'est la famille de facteurs σ prédominante durant la phase exponentielle de croissance. σ^{70} reconnaît deux éléments du promoteur de 5-6 pb de long centrés autour des positions -10 et -35. Subséquemment à la reconnaissance et à l'ancrage sur le promoteur de l'ARN polymérase $\beta\beta'\alpha_2\omega\sigma$, les brins d'ADNdb sont séparés pour former le complexe

ouvert. Le brin gabarit s'approche du site actif de l'ARN polymérase et l'autre brin est séquestré par des acides aminés aromatiques du facteur σ . Après la synthèse d'un brin d'ARN de 8 à 10 nucléotides de long, le relâchement du facteur σ permet à l'ARN polymérase d'échapper au promoteur et de progresser le long de la séquence codante d'ADN jusqu'à la terminaison de la transcription. σ^{70} est une protéine de ~36 kDa constituée de quatre domaines (σ^1 , σ^2 , σ^3 , σ^4) ayant des fonctions distinctes: σ^1 régule la cinétique de la transcription, σ^2 s'attache à la région -10 du promoteur, σ^3 stabilise le complexe ouvert et σ^4 s'attache à la région -35. L'expression et l'activité de σ^{70} sont contrôlées par la régulation transcriptionnelle, la maturation, la dégradation protéolytique et l'inhibition post-traductionnelle (revue par Paget et Helmann, 2003). Le facteur σ^{54} est nécessaire pour l'expression de gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote, l'utilisation de sources de carbone, certaines voies de fermentation, la synthèse des flagelles et la virulence bactérienne. De tous les facteurs σ , σ^{54} est le seul qui ne soit pas un homologue de σ^{70} . σ^{54} est une protéine de ~54 kDa composée de trois régions. La région N-terminale interagit avec les protéines activatrices en amont (ex :NtrC-P) pour contrôler la formation d'un complexe ouvert au niveau du promoteur. La région centrale contient le domaine d'attachement minimal à l'ARN polymérase et un autre domaine qui augmente l'affinité de σ^{54} pour l'ADN. La région C-terminale reconnaît et s'attache à la séquence consensus du promoteur située autour des positions -24 et -12. La principale différence entre σ^{54} et σ^{70} réside au niveau de la régulation de l'initiation de la transcription. Une fois l'ARN polymérase- σ^{70} attachée au promoteur et l'ADN ouverte, la transcription débute spontanément. Au contraire, l'ARN polymérase- σ^{54} doit interagir avec une protéine activatrice située 150 pb en amont du promoteur pour débiter sa progression. Après sa phosphorylation ou l'attachement d'un ligand, l'activateur hydrolyse l'ATP et utilise l'énergie pour changer la conformation fermée du complexe promoteur-ARN polymérase- σ^{54} en conformation ouverte (Revue par Buck et al., 2000).

1.1.3.3 Le système de régulation à deux composantes NtrB/NtrC

NtrC (Nitrogen Regulatory Protein C) contrôle directement ou par l'entremise de Nac, la transcription de 2% du génome d'*Escherichia coli*. Principalement, NtrC active l'expression de gènes minimisant le ralentissement de la croissance observé en conditions limitantes pour l'azote (Zimmer et al., 2000). NtrC est une protéine de ~52 kDa constituée de trois domaines: le domaine récepteur N-terminal de 124 résidus qui contient un site de phosphorylation sur l'aspartate 54, le domaine central de 240 résidus responsables de l'hydrolyse de l'ATP et par conséquent de l'activation de la transcription par l'ARN-polymérase- σ^{54} et le domaine C-terminal de 90 résidus qui permet la dimérisation et l'attachement à l'ADN grâce à un motif HTH. Sous sa forme inactive, NtrC est un dimère incapable d'utiliser l'énergie de l'ATP. Lorsque l'aspartate 54 est phosphorylée, NtrC forme un anneau de six sous-unités possédant une activité ATPase (Revue par Rombel et al., 1998). Cet activateur est membre d'un système de régulation à deux composantes, type de voie de transduction du signal le plus répandu chez les bactéries. C'est NtrB (Nitrogen Regulatory Protein B), une histidine kinase, qui fournit un groupement phosphoryl à NtrC. À souligner, NtrC catalyse sa propre phosphorylation et peut aussi recevoir le groupement phosphoryl d'une molécule centrale dans le métabolisme du carbone, l'acétyl phosphate (Feng et al., 1992; Keener et Kustu, 1988). Protéine cytoplasmique de 39 kDa sous forme d'homodimère *in vivo*, NtrB possède trois domaines: le domaine N-terminal contenant un motif PAS impliqué chez d'autres protéines dans l'attachement d'un ligand ou dans des interactions intra- et intermoléculaires, le domaine central siège de la dimérisation et possédant une légère activité phosphatase et le domaine C-terminal regroupant les sites d'attachement pour l'ATP et la protéine PII (GlnB). Avant de donner un groupement phosphoryl à NtrC, NtrB doit s'autophosphoryler sur le résidu histidine 139 situé dans le domaine central. Pour ce faire, chaque sous-unité du dimère hydrolyse une molécule d'ATP et phosphoryle l'autre sous-unité (Ninfa et al., 1993). Deux mécanismes se combinent lorsqu'il s'agit d'enlever le groupement phosphoryl attaché à l'aspartate 54 de NtrC : une activité lente autophosphatase de NtrC et une augmentation de la déphosphorylation induite par le complexe NtrB-PII

(Keener et Kustu, 1988). La nature exacte du second phénomène reste à élucider. S'agit-il d'une activité phosphatase du complexe NtrB-PII ou encore d'un effet amplificateur sur l'activité phosphatase de NtrC?

L'expression de l'opéron *glnALG* d'*Escherichia coli* à partir du promoteur σ^{70} -dépendant *glnAp1* est inhibée par NtrC-P (Reitzer et Magasanik, 1985). Au contraire, NtrC-P active la transcription à partir du promoteur fort σ^{54} -dépendant *glnAp2*. Par rapport à la première base de la séquence codante, NtrC-P s'attache à cinq endroits dans la région promoteur: -140, -108, -90, -68 et -45 (voir figure 5). Les éléments amplificateurs en cis situés aux positions -140 et -108 ont une affinité élevée pour NtrC-P et sont responsables de l'effet bénéfique de l'activateur sur l'expression de *glnALG*. Par contre, ils ne sont pas essentiels pour que NtrC-P entraîne l'ouverture du complexe fermé promoteur-ARN polymérase- σ^{54} . Lorsque présent en grande concentration *in vitro*, un mutant NtrC-P incapable de s'attacher à l'ADN peut quand même interagir avec l'ARN polymérase- σ^{54} et initier la transcription (Porter et al., 1993). Les trois éléments -90, -68 et -45 ont une affinité faible pour NtrC-P. Deux de ces trois éléments (-90 et -68) sont responsables de l'inhibition de la transcription de *glnALG* lorsque la concentration en NtrC-P est élevée (Atkinson et al., 2002). -90 et -68 fixent le seuil supérieur de l'expression de la glutamine synthétase en conditions limitantes pour l'azote. La présence de copies de NtrC-P attachées aux positions -90, -68 et peut-être -45 réduirait la flexibilité de l'ADN et empêcherait la formation d'une boucle permettant un contact entre les dimères NtrC-P situés aux positions -140 et -108 et le facteur σ^{54} . La transcription à partir du promoteur σ^{70} -dépendant *glnLp* est réprimée par NtrC-P (Ueno-Nishio et al., 1984). Lorsque le milieu contient du NH_4^+ , *glnLp* et *glnAp1* permettent juste assez de transcription de NtrBC pour assurer l'activation rapide de *glnALG* après l'épuisement de la source d'azote.

NtrC-P régule aussi l'expression des opérons *glnBA* des bactéries pourpres non-sulfureuses. NtrC-P active la transcription de *glnBA* d'*Azospirillum brasilense* à partir du promoteur σ^{54} -dépendant *glnBp2* et inhibe la transcription à partir du

promoteur σ^{70} -dépendant *glnBp1*. L'expression de *glnA* seul à partir de *glnAp* est indépendante de NtrC-P (Huergo et al., 2003). Chez *Rhodobacter capsulatus*, un phénomène peu fréquent survient: l'activation d'un promoteur fort indépendant de σ^{54} par NtrC-P (*glnBp2*). Le promoteur faible *glnBp1* de cette bactérie est réprimé par NtrC-P. Le système NtrBC de ces deux espèces est encodé sur l'opéron *nifR3ntrBC*. NifR3 est une protéine de fonction inconnue présentant une grande similarité avec le cadre de lecture ouvert YhdG d'*Escherichia coli* co-transcrit avec le régulateur Fis (Foster-Hartnett et al., 1993). L'expression de *nifR3ntrBC* d'*Azospirillum brasilense* est inhibée par NtrC-P (Machado et al., 1995). Au contraire, chez *Rhodobacter capsulatus*, la transcription de *nifR3ntrBC* est constitutive malgré la présence de deux sites d'attachement de NtrC-P aux positions +1 et -81. En y regardant de plus près, Cullen et al. (1998) se sont aperçus que la synthèse de la protéine NifR3 est réduite 40 fois par l'inactivation de *ntrC* et augmentée 5 fois en absence de NH_4^+ dans le milieu. Ces deux situations n'ont pas d'impact sur la concentration de NtrC. Puisque la stabilité et la quantité d'ARNm NifR3 sont similaires chez la souche sauvage et chez le mutant *ntrC*, Cullen et al. estiment que NtrC-P s'attacherait aux éléments amplificateurs +1 et -81 et stimulerait la traduction de NifR3. À la fois chez *Azospirillum brasilense* et *Rhodobacter capsulatus*, un autre système de régulation à deux composantes impliqué dans le métabolisme de l'azote est encodé par l'opéron *ntrYX* situé en aval de *nifR3ntrBC*. NtrY serait une histidine kinase qui au contraire de NtrB, posséderait une extension N-terminale s'insérant dans la membrane. NtrX d'*Azospirillum brasilense* ressemble à NtrC et développe une activité ATPase après une phosphorylation *in vitro* par le carbamyl phosphate (Assumpção et al., 2007). Chez *Rhodobacter capsulatus*, NtrC est absolument essentielle pour la croissance dans un milieu déficient en azote fixé (Kutsche et al., 1996). La comparaison des phénotypes de mutants *ntrB*, *ntrY* et d'un double-mutant *ntrBntrY* en absence de NH_4^+ a révélé que NtrY peut se substituer à NtrB en tant que donneur d'un groupement phosphoryl à NtrC (Drepper et al., 2006). Le modèle proposé pour expliquer la transmission d'un signal connexe par ces deux kinases à NtrC est que NtrB sent le niveau intracellulaire d'azote par l'intermédiaire

des protéines PII et que NtrY, protéine transmembranaire, sent le niveau extracellulaire d'azote.

1.1.3.4 Régulation de l'activité de NtrB par GlnB et GlnK (PII)

Chez *Escherichia coli*, les activités kinase et phosphatase de NtrB sont régulées principalement par GlnB (voir figure 6). Lorsque le ratio glutamine/ α -cétoglutarate (Gln/ α CG) intracellulaire est élevé, GlnB s'attache au domaine C-terminal de NtrB, inhibe l'activité kinase et stimule l'activité phosphatase (Revue par Leigh et Dodsworth, 2007). Le ratio Gln/ α CG est un indicateur de la qualité et de la quantité des sources de carbone et d'azote disponibles. GlnB est une protéine de ~12 kDa organisée en homotrimer contenant deux hélices α et six feuillets β (voir figure 7). Les boucles T, B et C se dégagent de la structure de la protéine (Carr et al., 1996). Un ratio Gln/ α CG faible favorise l'uridylylation de la tyrosine 51 située dans l'apex de la boucle T par GlnD. Cette enzyme, sur laquelle nous reviendrons dans la section 1.1.3.8, sent directement le niveau intracellulaire de glutamine. Lorsque celui-ci augmente, GlnD enlève par hydrolyse l'UMP lié à GlnB (Jiang et al., 1998A). Puisqu'il s'agit d'un trimère, GlnB peut adopter quatre degrés d'uridylylation GlnB-0UMP, GlnB-1UMP, GlnB-2UMP et GlnB-3UMP. Plus le niveau d'uridylylation est élevé, moins GlnB a la capacité d'inhiber la phosphorylation de NtrC par NtrB (Atkinson et al., 1994). Deux effecteurs, l'ATP et l' α CG se lient directement à GlnB. Avant que l' α CG puisse s'attacher à GlnB, l'ATP doit déjà être présent à la surface de la protéine (Kamberov et al., 1995). À des concentrations physiologiques d'ATP, il y a une molécule d' α CG par trimère de GlnB. La présence de cette molécule inhibe l'occupation des deux autres sites d'attachement par l' α CG. En effet, l'affinité du trimère GlnB pour la deuxième et la troisième molécule d' α CG est 30 à 40 fois moins élevée que pour la première (Jiang et al., 1998A). La cristallisation de GlnK d'*Escherichia coli*, un homologue identique à GlnB à 67 %, a montré que l'ATP s'insère dans un vestibule formé par la boucle B et la base de la boucle T d'une sous-unité et la boucle C de la sous-unité adjacente (Xu et al., 1998). L'analyse

mutationnelle de ce vestibule chez GlnB laisse croire qu'il est aussi impliqué dans l'attachement de l' α CG (Jiang et al., 1997). Sous sa forme uridylylée, GlnB est incapable de former un complexe avec NtrB (Atkinson et al., 1994). L'introduction de mutations dans la boucle T confirme son importance dans l'interaction de GlnB avec NtrB et GlnD (Jiang et al., 1997). La somme de ces observations suggère que les résidus UMP bloquent le contact de la boucle T de GlnB avec NtrB. La présence d'une seule molécule d' α CG à la surface de GlnB favorise la régulation de NtrB. L'attachement de deux α CG supplémentaires empêche GlnB de se lier à NtrB, et ce même si la protéine PII est exempte de groupement uridylyl (Revue par Ninfa et Atkinson, 2000). La structure cristal de GlnK de l'archaea *Methanocaldococcus jannaschii* en présence d'ATP et d' α CG donne des indices quant au rôle de ces effecteurs dans l'interaction des protéines PII avec leurs partenaires. En effet, l'attachement de Mg-ATP dans le vestibule cause la compaction de la boucle T. Ce changement de conformation génère un site d'attachement pour l' α CG dans l'apex de la boucle T (Yildiz et al., 2007). La présence d' α CG, une molécule chargée négativement à cette position, changerait les propriétés de l'interface GlnK-protéine partenaire et provoquerait une répulsion électrostatique. GlnK de *Methanocaldococcus jannaschii* ne subit pas de modification covalente lorsque le ratio Gln/ α CG diminue. Dans ce cas, l' α CG fait le même travail que le groupement uridylyl chargé négativement de GlnB d'*Escherichia coli*. Il est donc possible que l'attachement d'ATP et d' α CG à GlnB ou à d'autres protéines PII bactériennes altère l'arrangement de la boucle T et prévienne l'interaction avec des partenaires protéiques dans la régulation du métabolisme de l'azote.

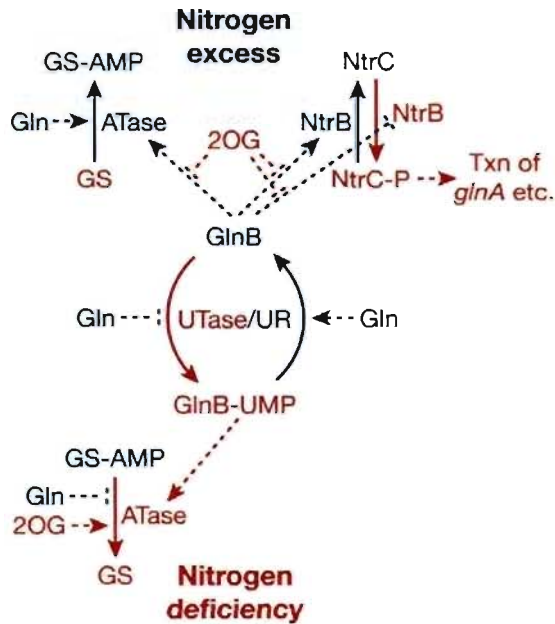


Figure 6. Rôle de GlnB d'*Escherichia coli* dans l'expression et l'activité de la glutamine synthétase. Légende: bleu = environnement riche en azote fixé; rouge = environnement pauvre en azote fixé; ligne pleine = modifications posttraductionnelles des protéines; ligne pointillée = rôles des effecteurs et de GlnB; flèche = effets positifs des effecteurs et de GlnB; trait = effets négatifs des effecteurs et de GlnB. (Figure tirée de Leigh et Dodsworth, 2007).

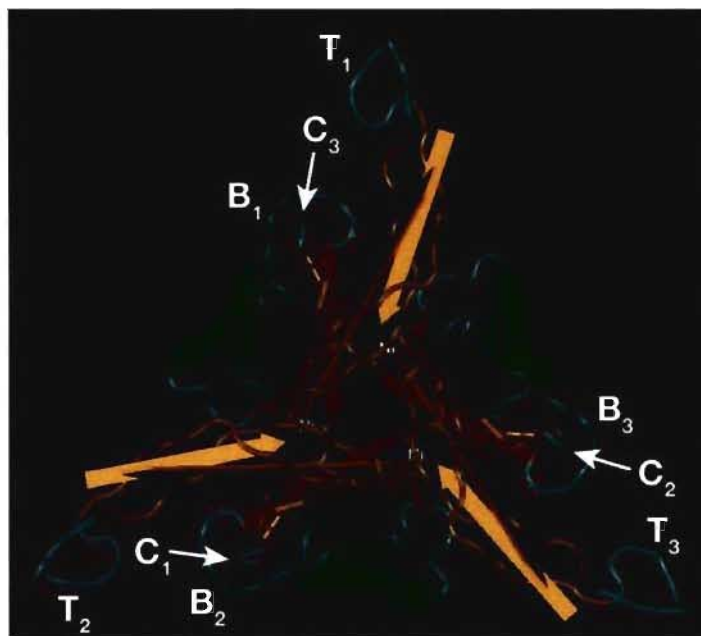


Figure 7. Structure du trimère PII de *Synechococcus elongatus* représentative de la famille GlnB-K. Légende: vert = hélice α ; jaune = feuillet β ; B_x = boucle B; C_x = boucle C; T_x = boucle T; rouge = ions nickel et sulfate présents dans le tampon de cristallisation mais absents de la structure de la protéine native. (Figure tirée de Leigh et Dodsworth, 2007).

Un système levure à deux hybrides a permis d'établir que GlnK, la deuxième protéine PII d'*Escherichia coli*, interagit aussi avec NtrB (Salinas et Contreras, 2003). Le mutant $\Delta glnK$ continue à exprimer les gènes Ntr 16H après le transfert dans un milieu pauvre en azote au lieu de 4H pour la souche sauvage. Lorsqu'une source d'azote devient disponible après plus de 10H de croissance dans le milieu pauvre, les cellules $\Delta glnK$ sont incapables de réprimer la transcription à partir des promoteurs NtrC-dépendants (Blauwkamp et Ninfa, 2002). Deux raisons expliquent ce phénotype. Tout comme GlnB, la protéine GlnK purifiée stimule l'activité phosphatase de NtrB *in vitro* (Atkinson et Ninfa, 1999). De plus, les deux protéines PII peuvent être séquestrées à la membrane cytoplasmique par AmtB suite à un choc NH_4^+ . Dans la souche sauvage en absence d'azote, il y a une stoechiométrie de 1:1 entre GlnK et AmtB et de 500:1 entre GlnK et GlnB (Javelle et al., 2004). La séquestration de GlnB par AmtB est détectable par Western Blot seulement dans une souche $\Delta glnK$. Ce faisant, il est probable que dans la souche sauvage, GlnB

interagisse très peu ou pas du tout avec AmtB. En absence de GlnK, GlnB se retrouve accrochée en trop grande quantité à AmtB et ne peut stimuler efficacement l'activité phosphatase de NtrB située dans le cytoplasme (Blauwkamp et Ninfa et al., 2003).

glnB d'*Escherichia coli* est un gène monocistronique transcrit à partir de trois promoteurs σ^{70} -dépendants situés aux positions -33 (*glnBp1*), -95 (*glnBp2*) et -118 (*glnBp3*). Considérée généralement comme constitutive, l'expression de *glnB* est réduite deux fois par un régulateur s'attachant autour de la position -44, PurR (He et al., 1993). Ce répresseur homodimérique de la famille LacI contient un motif HTH d'ancrage à l'ADN dans sa partie N-terminale et un site d'attachement pour un co-répresseur, la guanine ou l'hypoxanthine, dans sa partie C-terminale. Par contre, PurR n'a aucun effet sur la synthèse de la glutamine par GlnA en conditions limitantes ou non pour l'azote. L'homologue de GlnB, GlnK est encodée par l'opéron *glnKamtB*. AmtB est un transporteur de NH_4^+ homotrimérique de ~45 kDa qui sera l'objet de la deuxième partie de cette revue de littérature. *glnKamtB* est transcrit à partir d'un promoteur σ^{54} -dépendant activé par NtrC et GadX. Comparativement à *glnAp2*, *glnKp* nécessite une concentration de NtrC-P beaucoup plus élevée pour son activation. À cause de cela et de l'expression constitutive de GlnB, GlnK a un rôle dans la régulation de l'expression des gènes Ntr plus loin dans le temps par rapport au début de la carence en azote que GlnB (Revue par Ninfa et Atkinson, 2000). Tout comme GadE, GadX régule l'expression de gènes impliqués dans un système de résistance à l'acide basé sur la décarboxylation du glutamate (Tramonti et al., 2002). GadX est une protéine de la famille AraC/XylS de ~31 kDa ayant la capacité de se dimériser *in vivo* avec un motif HTH d'attachement à l'ADN situé dans sa partie C-terminale.

1.1.3.5 Autres régulateurs de la transcription de *glnALG*

Le promoteur fort σ^{54} -dépendant *glnAp2* est activé 1.4 fois par Fis (Factor for Inversion Stimulation), un régulateur global du métabolisme bactérien. Fis, la protéine la plus abondante dans la chromatine durant la phase exponentielle, joue un

rôle dans l'adaptation de la cellule à des conditions permettant une croissance rapide. Fis est un homodimère de ~22 kDa possédant un motif d'attachement à l'ADN HTH en C-terminal. Cet activateur se fixe autour de la position -55 en amont du promoteur *glnAp2* (Huo et al., 2006). L'introduction d'une courbure dans l'ADN par Fis entre les éléments amplificateurs ayant une affinité élevée pour NtrC-P et le promoteur est responsable de cette légère augmentation de l'expression. Lorsque des bactéries en phase stationnaire sont inoculées à nouveau dans un milieu riche, Fis passe de 100 à 50000 copies par cellules avant la première division (Ball et al., 1992). Ceci semble indiquer que la transcription de *glnA* est positivement régulée par l'entrée de la culture bactérienne dans la phase exponentielle.

En plus de GdhA, CRP réduit aussi quatre fois l'expression de la glutamine synthétase en combinant deux effets contraires. CRP est requise pour l'activation du promoteur faible σ^{70} -dépendant *glnAp1* et réprime 21 fois la transcription à partir de *glnAp2* (Tian et al., 2001). Pour établir ce taux de répression, des mutants *cya* cultivés dans un milieu déficient en azote avec du glycérol comme source de carbone ont été exposés ou non à du cAMP. CRP s'attache autour de la position -70 en amont de *glnAp1* (Reitzer et Magasanik, 1985). Deux mécanismes sont impliqués dans l'inhibition de *glnAp2* par CRP. *In vitro*, CRP s'attache autour de la position -51 en amont de *glnAp2* et réduit 2 fois l'expression de GlnA en introduisant dans l'ADN une courbure empêchant NtrC d'approcher efficacement les sites amplificateurs de la région promoteur (Mao et al., 2007). L'ajout de cAMP exogène augmente trois fois l'expression de l'opéron *glnHPQ*. Ces trois gènes codent pour un système ABC (Atp-Binding Cassette) haute-affinité de transport de la glutamine. GlnH est une protéine périplasmique responsable de la capture de la glutamine et de sa livraison aux autres sous-unités du système ABC. L'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire au transport unidirectionnel de la glutamine est effectuée par GlnQ. GlnP est la protéine transmembranaire permettant le passage de la glutamine. L'augmentation de l'expression de GlnHPQ accentue l'importation de la glutamine et par conséquent, la déuridylylation des protéines PII par GlnD. Les interactions entre CRP et le système PII-Ntr assurent l'intégration de signaux provenant du métabolisme du carbone dans

la régulation de l'assimilation de l'azote (Maheswaran et Forchhammer, 2003; Mao et al., 2007).

1.1.3.6 La régulation posttraductionnelle de la glutamine synthétase

L'activité de la glutamine synthétase purifiée est inhibée partiellement par neuf métabolites: la sérine, l'alanine, la glycine, l'AMP, le CTP, le tryptophane, l'histidine, le carbamyl phosphate et la glucosamine-6-phosphate. Lorsqu'elles sont combinées, ces molécules réduisent presque à néant l'activité de la glutamine synthétase. C'est ce que Woolfolk et Stadtman (1967) appelle l'inhibition rétroactive cumulative. La glycine, la serine et l'alanine occupent le site d'attachement du glutamate de la glutamine synthétase de *Salmonella typhimurium* (Liaw et al., 1993). Ces quatre acides aminés s'attachent à GlnA par l'entremise de la chaîne principale, $^+NH_3-CH-COO^-$, qu'ils ont en commun. CTP et AMP s'installent dans le site d'attachement de l'ATP (Liaw et al., 1994). L'inhibition rétroactive cumulative régule la fonction anabolique de GlnA. C'est-à-dire que ce mode de répression agit dans des conditions où GdhA est responsable de l'assimilation du NH_3 et où GlnA produit la glutamine essentielle à la synthèse des composantes cellulaires (Revue par Reitzer, 2003).

L'AMP participe principalement à un système de régulation de l'activité assimilatoire du NH_3 de GlnA par adénylylation réversible covalente. Chacune des 12 sous-unités de GlnA peut être adénylylée sur la tyrosine 397 lorsque le ratio $Gln/\alpha CG$ est élevé. L'addition d'un résidu AMP à une sous-unité résulte en son inactivation et augmente la susceptibilité des autres sous-unités à l'inhibition rétroactive cumulative (Revue par Stadtman, 1990). L'intégration des signaux carbone et azote dans la régulation de GlnA par la combinaison des deux modes régulateurs principaux, l'adénylylation et l'activation de la transcription par NtrC-P, engendre une variété de situations possibles. Lorsque la source de carbone est de qualité (Ex.: glucose) et que le milieu est pauvre en azote, la concentration de glutamine synthétase déadénylylée dans la cellule est élevée. L'ajout d'azote entraîne

une réduction du nombre de copies intracellulaires de GlnA et l'adénylylation en masse des sous-unités. Quand la source de carbone est de moins bonne qualité (Ex.: glycérol), la déadénylylation et l'activation de la transcription de GlnA surviennent seulement lorsque le manque d'azote est assez sévère pour limiter la croissance. L'activation transcriptionnelle et post-traductionnelle de GlnA est aussi induite par le remplacement d'une source de carbone de mauvaise qualité par une source de carbone de bonne qualité indépendamment d'une altération dans la disponibilité de l'azote (Maheswaran et Forchhammer, 2003).

1.1.3.7 L'adénylyltransférase (GlnE)

L'adénylylation et la déadénylylation de GlnA sont catalysées par la même adénylyltransférase (GlnE). Cette enzyme est encodée par l'opéron *ygiFglnE*. Le gène *ygiF* code pour une adénylate cyclase potentielle. Quoique la région promoteur de cet opéron soit peu caractérisée, *ygiFglnE* est exprimé de façon constitutive indépendamment du niveau d'azote fixé (Van Heeswijk et al., 1993). Protéine cytoplasmique de ~108 kDa, GlnE serait composée de trois domaines et de deux séquences de liaison: le domaine de déadénylylation N-terminal (AT-N) (acides aminés 1-440), le domaine central de régulation (R) (463-606), le domaine d'adénylylation C-terminal (AT-C) (628-946) et les deux séquences de liaison Q1 et Q2 (respectivement les résidus 441 à 462 et 607 à 627) (Clancy et al., 2007). AT-N et AT-C contiennent chacun un motif β -polymérase distinctif des nucléotidyltransférases. Ce site comprend une boucle riche en glycine suivie par une paire d'aspartates participant à la chélation de deux Mg^{2+} . Ces cations positionnent le substrat et stabilisent les états transitionnels du phosphate pentavalent. AT-N catalyse la phosphorylation de GlnA-AMP et produit une molécule d'ADP en consommant un phosphate (Anderson et Stadtman, 1970). AT-C utilise un ATP et libère un pyrophosphate pour adénylyler GlnA (Shapiro et Stadtman, 1968).

GlnB, GlnB-UMP et la glutamine régule l'activité de GlnE en s'y attachant (voir figure 6). GlnK peut aussi jouer ce rôle mais avec beaucoup moins d'efficacité

que GlnB (Revue par Ninfa et Atkinson, 2000). GlnB et la glutamine stimulent l'adénylylation de GlnA et inhibent la déadénylylation. Ces effecteurs agissent en synergie. L'attachement de trois molécules d'ATP et d'une molécule d' α CG à GlnB accentue sa capacité à activer l'adénylylation. La saturation de l'homotrimère par trois α CG empêche la stimulation de l'adénylylation par GlnB. GlnB-UMP active la déadénylylation et inhibent l'adénylylation. Ces deux actions de GlnB-UMP requièrent une concentration élevée de α CG (Jiang et al., 1998B). La glutamine se lie à un site inconnu localisé dans le domaine AT-C (Jiang et al., 2007). Selon Clancy et al. (2007), la région de GlnE interagissant avec GlnB et GlnB-UMP serait comprise entre les acides aminés 466 et 507 dans le domaine R. Ce résultat a été obtenu en ajoutant des anticorps monoclonaux de souris bloquant l'accès à différentes régions de GlnE à des réactions *in vitro* d'adénylylation/déadénylylation en présence de glutamine, de GlnB et de GlnB-UMP. Il reste à déterminer l'identité du site exact d'attachement et si c'est le même ou non pour GlnB et GlnB-UMP. Chez la bactérie pourpre non-sulfureuse fixatrice d'azote *Rhodospirillum rubrum*, la régulation de l'activité de GlnE exhibe des caractéristiques différentes par rapport à ce qui est observé chez *Escherichia coli*. La glutamine n'a aucun effet sur l'adénylylation et la déadénylylation de GlnA par GlnE *in vitro*. Les trois protéines PII (GlnB, GlnK, GlnJ) de *R. rubrum* stimulent l'adénylylation mais n'inhibent pas la déadénylylation. Dans ce cas, il semblerait que l' α CG joue un rôle plus important dans la régulation de GlnE et par conséquent dans l'activité de la glutamine synthétase (Jonsson et al., 2007).

La capacité de GlnK et de GlnB d'*Escherichia coli* de former des hétérotrimères *in vivo* est un autre phénomène dont il faut tenir compte lorsque l'on étudie le rôle de ces protéines dans l'assimilation de l'azote (Forchhammer et al., 1999; Van Heeswijk et al., 2000). Cette interaction entre GlnB et GlnK augmente considérablement le nombre d'espèces possibles de protéines PII dans la bactérie: GlnB₃, GlnB₂GlnK, GlnBGlnK₂, GlnK₃, GlnB-UMP₃, GlnB-UMP₂GlnK-UMP, GlnB-UMPGlnK-UMP₂, GlnK-UMP₃ et toutes les espèces partiellement uridylylées. Jusqu'à maintenant, il a été démontré qu'un hétérotrimère GlnB-GlnK uridylylé est

capable de stimuler la déadénylylation de la glutamine synthétase *in vitro* mais avec moins d'efficacité que l'homotrimère GlnB uridylylé. Ce niveau différent d'activité à mener à l'hypothèse que la formation de complexes GlnB-GlnK raffine davantage la transduction du signal dans le cadre, entre autre, de la régulation de l'activité de GlnA (Forchhammer et al., 1999; Van Heeswijk et al., 2000).

1.1.3.8 L'uridylyltransférase (GlnD)

Tel que mentionné furtivement dans la section 1.1.3.4, GlnD fixe et enlève un résidu uridylyl à la tyrosine 51 des protéines PII. Lorsque la cellule contient peu de glutamine, GlnD catalyse la formation de PII-UMP et de pyrophosphate à partir de PII et d'UTP. La protéine PII s'attache en premier à GlnD suivie de l'UTP. Après la réaction, le pyrophosphate est relâché avant PII-UMP. L'augmentation du niveau intracellulaire de glutamine entraîne l'hydrolyse de PII-UMP (voir figure 8). Dans ce cas, UMP et PII ne sont pas libérés dans un ordre précis par GlnD. Dans des conditions physiologiques, le cation Mg^{2+} est essentiel pour les deux activités de GlnD. Les molécules d' α CG et d'ATP liées aux protéines PII activent les deux types de réaction *in vitro*. La glutamine réprime l'uridylylation et stimule la déuridylylation simultanément (Jiang et al., 1998A). Chez *Escherichia coli*, l'uridylylation de GlnK est aussi efficace que celle de GlnB. Par contre, la déuridylylation de GlnK est 10 fois plus lente (Atkinson et Ninfa, 1999).

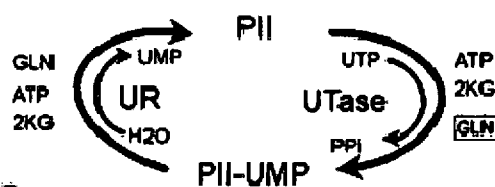


Figure 8. Uridylylation/déuridylylation des protéines PII. Légende: UR/Utase = GlnD; GLN = glutamine; 2KG = α -cétoglutarate; Encadré = Effet répresseur. (Figure tirée de Jiang et al., 1998C).

GlnD est encodée sur l'opéron *mapglnDdapD* et transcrit à partir d'un promoteur peu caractérisé indépendant du facteur σ^{54} et du niveau d'azote fixé (Van Heeswijk et al., 1993). Map est une méthionine aminopeptidase qui enlève la méthionine présente à l'extrémité N-terminal de toutes les chaînes peptidiques synthétisées chez *Escherichia coli*. Une paire de sous-unités DapD constitue la tetrahydrodipicolinate succinylase. Impliquée dans la voie métabolique de synthèse de la lysine, DapD catalyse la formation de N-succinyl-2-amino-6-ketopimelate à partir du tetrahydrodipicolinate et de succinyl-CoA. GlnD est une enzyme monomérique de ~102 kDa avec un motif β -polymérase en N-terminal entre les résidus 70 à 169 (domaine NT). Tondervik et al. (2006) ont conduit une recherche dans des banques de données permettant d'identifier d'autres domaines potentiels dans GlnD: un domaine signature présent dans toutes les uridylyltransférases de la famille GlnD (résidus 191 à 400), un domaine His-Asp (résidus 468 à 602), un domaine IMP déhydrogénase (résidus 332 à 686) et deux domaines aspartokinase-chorismate mutase TyrA (ACT). L'identité des domaines de GlnD impliqués dans l'uridylylation, la déuridylylation, l'attachement de la glutamine et l'interaction avec les protéines PII n'a pas encore été établie avec certitude. Les études cinétiques menées par Jiang et al. (1998A) laissaient croire à un seul site actif pour l'uridylylation et la déuridylylation dans le domaine NT et à un seul site d'attachement pour la glutamine. L'introduction de mutations ponctuelles dans le domaine NT va dans le sens de l'analyse cinétique quant à une région exclusive responsable des deux réactions catalysées par GlnD (Ninfa et al., 2000). Récemment, l'observation qu'un mutant GlnD tronqué (acides aminés 1 à 358) catalyse l'uridylylation des protéines PII mais pas la déuridylylation contredit l'hypothèse du site unique. Selon Tondervik et al. (2006), le site actif pour la déuridylylation pourrait être contenu dans le domaine His-Asp que l'on retrouve aussi chez plusieurs enzymes possédant une activité phosphohydrolase. Quant au site d'attachement de la glutamine, il serait situé dans la région des deux séquences ACT en C-terminal. Présent chez plusieurs enzymes impliquées dans la régulation du métabolisme des acides aminés, le domaine ACT est une structure à laquelle s'attache une variété de ligands.

GlnD de *Rhodospirillum rubrum* est requise pour l'uridylylation et la déuridylylation des trois protéines PII: GlnB, GlnJ et GlnK. Cette protéine GlnD présente deux différences majeures par rapport à celle que l'on retrouve chez *Escherichia coli*. Tout d'abord, la glutamine stimule la déuridylylation mais n'inhibe pas l'uridylylation *in vitro*. Ensuite, l' α CG régule positivement l'uridylylation mais n'a pas d'effet sur la déuridylylation par GlnD (Jonsson et Nordlund, 2007). GlnD d'*Azospirillum brasilense* catalyse l'uridylylation de GlnB et de GlnZ. Quoique GlnD d'*A. brasilense* soit exprimée en absence ou en présence d'azote fixé, le nombre de copies de cette enzyme augmente 4 fois lorsque la cellule croît dans des conditions propices à la réduction du N₂. Cette régulation positive n'est que partiellement dépendante du système NtrB/NtrC (Van Dommelen et al., 2002).

1.2 La fixation de l'azote

L'atmosphère terrestre est composée à 78% de N₂. La réduction de l'azote atmosphérique en NH₃ est une réaction essentielle pour la vie sur terre puisque la majorité des organismes vivants sont incapables d'utiliser le N₂ sous cette forme. Le triple lien unissant les deux molécules d'azote, rend le N₂ extrêmement stable et coûteux énergétiquement à réduire. Le N₂ peut être modifié par trois processus: la foudre, la réduction industrielle et la réduction biologique. La foudre participe à la fixation de 10 millions de tonnes métriques de N₂ par an, la réduction industrielle est responsable de la fixation de 80 millions de tonnes métriques par an et la réduction biologique fixe entre 100 et 175 millions de tonnes métriques par an (Burns et Hardy, 1975; Hardy, 1993). L'énergie libérée par la foudre brise le triple lien du N₂ et entraîne la formation de nitrate qui plus tard est assimilé par les plantes. L'industrie utilise le procédé de Haber-Bosch pour produire du NH₃ à partir du N₂ et du H₂. Cette réaction se fait à l'aide d'un catalyseur de Fe³⁺ à une pression située entre 200 et 400 atm et à une température de 450 à 500 °C. Le procédé Haber-Bosch nécessite annuellement 1% de toutes les sources d'énergie mondiales (Smith, 2002). Les

engrais azotés découlant de ce procédé permettent d'alimenter 40% de la population totale et coûtent annuellement 20 milliards de dollars US. En contraste, la réduction biologique du N_2 se fait dans des conditions de température et de pression courante sur terre. Jusqu'à maintenant, la capacité de fixer l'azote a été détectée seulement chez des procaryotes.

1.2.1 La nitrogénase

L'enzyme responsable de la réduction de l'azote diatomique en NH_3 est la nitrogénase. La réaction catalysée par la nitrogénase est la suivante : $N_2 + 8 e^- + 8 H^+ \Rightarrow 2 NH_3 + H_2$. Cette réaction est extrêmement coûteuse d'un point de vue énergétique puisqu'il faut hydrolyser 2 molécules d'ATP par électrons transférés. Possiblement à cause d'un léger découplage entre le transfert d'électrons et l'hydrolyse d'ATP, la consommation finale d'ATP nécessaire pour réduire une molécule de N_2 se situe entre 20 et 30 ATP (Pelmont, 1993). La nitrogénase étant inactivée irréversiblement par la présence d' O_2 , la production d'une molécule d' H_2 permet l'élimination de l'oxygène de l'environnement immédiat de l'enzyme par oxydation de l'hydrogène diatomique (Revue par Robson et Postgate, 1980). Trois autres stratégies ont été développées pour prévenir l'inactivation de l'enzyme par l' O_2 : une activité respiratoire élevée pour les microorganismes qui réduisent le N_2 en aérobic comme *Azotobacter*, un métabolisme anaérobic ou encore, chez certaines cyanobactéries, le développement de cellules relativement étanches à l' O_2 , les hétérocystes. La nitrogénase est un enzyme peu spécifique qui réduit de nombreux substrats en plus du NH_3 . L'acétylène, le cyanure, l'acétonitrile et l'azoture sont des exemples parmi d'autres (Revue par Burgess et Lowe, 1996). Présente chez certaines protéobactéries, cyanobactéries, firmicutes, bactéries vertes sulfureuses, spirochètes et archaea, la nitrogénase est construite sur un modèle présentant relativement peu de variations. Deux composantes forment la métalloenzyme: la dinitrogénase réductase (protéine Fe) et la dinitrogénase (protéine FeMo). L'étude structurale de l'enzyme, en particulier les diverses techniques de spectroscopie et la cristallographie à rayon X, a été effectuée à partir de la nitrogénase molybdène de *Azotobacter vinelandii*.

1.2.1.1 La dinitrogénase réductase

Protéine de 30 à 32 kDa, la dinitrogénase réductase (NifH) est organisée en homodimère contenant un centre [4Fe-4S]-Cys₄ à cheval entre les deux sous-unités (Georgiadis et al., 1992; Hausinger et Howard, 1983) (voir figure 9i et 9ii). Une molécule de Mg-ATP peut se lier à chacune des sous-unités de la dinitrogénase réductase (Revue par Burgess et Lowe, 1996). La principale fonction de cette protéine est de transférer à la dinitrogénase les électrons nécessaires à la réduction du N₂. De plus, la protéine Fe est essentielle pour l'insertion du cofacteur FeMo dans la dinitrogénase et pour la maturation de cette enzyme (Revue par Burgess et Lowe, 1996; Revue par Peters et al., 1995). La première étape du cycle de transfert des électrons de la dinitrogénase réductase à la dinitrogénase consiste en la réduction de la forme oxydée du centre [4Fe-4S]-Cys₄ de la protéine Fe (voir figure 9iii). Deux Mg-ADP sont ensuite relâchés et remplacés par deux Mg-ATP (Thorneley, 1992). La dinitrogénase réductase forme un complexe avec la dinitrogénase, l'électron est transféré et les deux Mg-ATP sont hydrolysés. Subséquemment, la forme oxydée de la protéine Fe se dissocie très lentement de la protéine FeMo. Cette étape limite le taux d'activité de la nitrogénase lorsque toutes les composantes de la réaction de fixation du N₂ sont en excès (Thorneley et Lowe, 1985). Le cycle est répété huit fois jusqu'à la complétion de la réaction (Revue par Burgess et Lowe, 1996).

1.2.1.2 La dinitrogénase

La dinitrogénase est un hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ (voir figure 9i et 9ii). Respectivement, les protéines α (NifD) et β (NifK) ont un poids moléculaire d'approximativement 59 et 54 kDa. Le contact entre les paires de protéines $\alpha\beta$ se fait presque exclusivement par l'entremise des protéines β . Deux centres P font la jonction entre les protéines α et β (Kim et Rees, 1992). Constitué de 8 molécules de fer et de 6 molécules de soufre, le centre P reçoit l'électron transféré à partir de la dinitrogénase réductase (Peters et al., 1997; Revue par Dance, 2007). Site d'attachement et de réduction du N₂, le cofacteur FeMo est situé dans la sous-unité α .

Ce cofacteur est constitué d'une molécule de molybdène, de 7 molécules de fer, de 9 molécules de soufre et d'un acide essentiel pour l'activité de l'enzyme, l'homocitrate (Revue par Burgess et Lowe, 1996; Revue par Dance, 2007; Imperial et al., 1989). Au centre du cofacteur, l'on retrouve une molécule dont l'identité reste à confirmer (Einsle et al., 2002). La densité d'électrons de cet inconnu laisse présumer qu'il s'agit d'une molécule de carbone ou d'azote ou encore d'oxygène. En ce qui concerne les étapes de la réduction du substrat au niveau du cofacteur, beaucoup de travail reste à faire. Toutefois, deux intermédiaires, l'hydrazine et le diazène ont été identifiés par spectroscopie ^{15}N -ENDOR permettant d'esquisser un cycle hypothétique de la réduction du N_2 (voir figure 10) (Barney et al., 2005). Le site initial d'attachement du N_2 , l'acheminement des électrons du centre P au cofacteur FeMo et le mode d'évacuation du NH_3 sont autant de phénomènes méconnus qui font actuellement l'objet d'investigations.

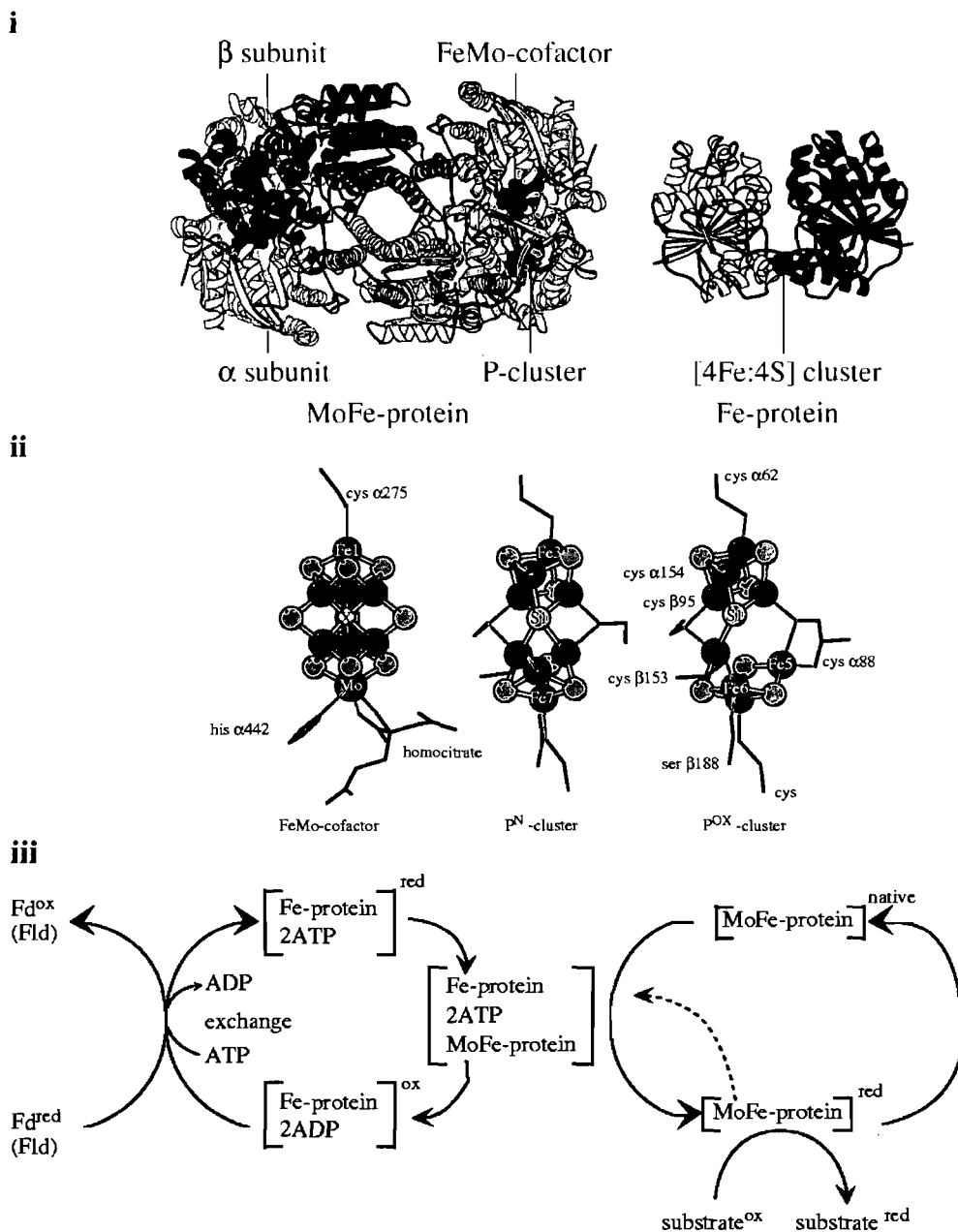


Figure 9. i. Structure de la dinitrogénase (MoFe-protein) et de la dinitrogénase réductase (Fe-protein). ii. Cofacteur FeMo et centre P de la dinitrogénase. Légende: noir = Fe et Mo; gris foncé = S; gris pâle = atome inconnu (X). iii. Circulation des électrons entre la dinitrogénase réductase et la dinitrogénase. (Figure tirée de Rees et al., 2005).

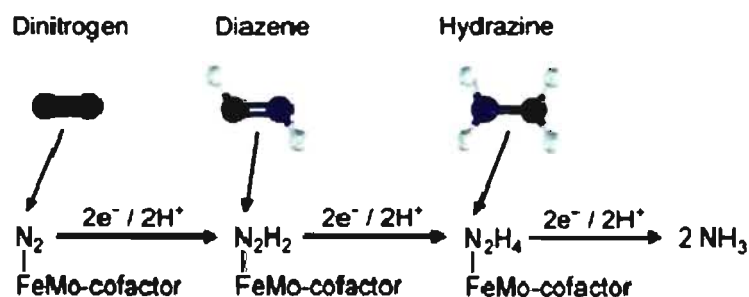


Figure 10. Intermédiaires dans la réduction du N_2 au niveau du cofacteur FeMo.
(Figure tirée de Barney et al., 2007).

1.2.1.3 Les nitrogénases alternatives

En plus de la nitrogénase molybdène décrite dans les deux sections précédentes, il existe trois nitrogénases alternatives moins communes à travers les diazotrophes; ces microorganismes capables de réduire le N_2 . Dans la nitrogénase vanadium (VnfHDK), la molécule de molybdène présente au cœur du cofacteur FeMo est remplacée par une molécule de vanadium. Cette enzyme est retrouvée, entre autre, chez le genre *Azotobacter* et chez les cyanobactéries du genre *Anabeana* (Boison et al., 2006; Revue par Rehder, 2000). Au point de vue structurale, la seule différence majeure entre la protéine MoFe et la protéine VFe est que celle-ci possède deux sous-unités δ (VnfG) supplémentaires de 13 kDa (Robson et al., 1989). Quant à la nitrogénase fer, son cofacteur FeFe ne contient aucune molécule de molybdène ou de vanadium (Chisnell et al., 1988). Tout comme la dinitrogénase vanadium, la dinitrogénase Fer possède aussi deux sous-unités δ (AnfG) de 15 kDa (Pau et al., 1993). Une combinaison de deux ou de trois de ces nitrogénases peut être synthétisée par la même espèce bactérienne. Par exemple, *Azotobacter vinelandii* possède ces trois types de nitrogénases alors que les bactéries pourpres non-sulfureuses *Rhodobacter capsulatus* et *Rhodospirillum rubrum* possèdent la Mo-nitrogénase et la Fe-nitrogénase (Loveless et Bishop, 1999). Dans tous les cas de figure, l'expression des nitrogénases Fe et V est inhibée par la présence de molybdène dans le milieu de culture (Revue par Masepohl et al., 2002; Revue par Rehder, 2000). Les microorganismes pourvus d'une ou de deux nitrogénases alternatives auraient un

avantage sélectif sur les autres diazotrophes puisqu'ils seraient capables de réduire le N_2 dans un milieu pauvre en molybdène comme un sol acide ou riche en fer (Pelmont, 1993).

Le système nitrogénase de *Streptomyces thermoautotrophicus* diffère des trois autres nitrogénases sur plusieurs points. Trois enzymes sont impliquées dans la réduction du N_2 chez cette bactérie : la CO déhydrogénase, la superoxyde oxydoréductase et la dinitrogénase FeMo. La CO déhydrogénase oxyde le CO et génère un anion superoxyde à partir de l' O_2 . Ce superoxyde est oxydé à son tour par la superoxyde oxydoréductase qui, ce faisant, libère des électrons. Ce dimère composé de sous-unités de 48 kDa agit ensuite comme une dinitrogénase réductase standard puisqu'il fournit des électrons à la dinitrogénase FeMo. La dinitrogénase de *Streptomyces thermoautotrophicus* est un hétérotrimère constitué de sous-unités de, respectivement, 18 kDa, 33 kDa et 93 kDa (Ribbe et al., 1997). Pour fonctionner ce système nitrogénase à besoin de seulement 4 ATP par molécule de N_2 réduite. Autre caractéristique surprenante, c'est l'oxygène, toxique pour les autres nitrogénases, qui sert de transporteur d'électrons.

1.2.1.4 Transport des électrons jusqu'à la dinitrogénase réductase

Deux familles de protéines sont impliquées dans le transport des électrons jusqu'à la dinitrogénase réductase de la nitrogénase molybdène: les flavodoxines et les ferrédoxines. Les flavodoxines sont des protéines acides d'une longueur variant entre 140 et 180 acides aminés et contenant un seul groupement prosthétique FMN. Les ferrédoxines sont des protéines acides d'une longueur variant entre 50 et 120 acides aminés et contenant 1 ou 2 centres Fe-S. Le cheminement des électrons jusqu'à la dinitrogénase réductase varie d'un microorganisme à l'autre. Trois exemples seront donnés dans cette section. Chez *Klebsiella pneumoniae*, la flavodoxine NifF est le seul transporteur d'électron associé à la nitrogénase. Cette protéine est réduite par les électrons libérés par la pyruvate-Fd oxydoréductase (NifJ) lors de la génération d'acétyl-coA à partir du pyruvate et de la coenzymeA (Nieva-

Gomez et al., 1980; Shah et al., 1983). NifJ est constituée de deux sous-unités de 120 kDa contenant chacune trois groupes Fe-S et un groupement prosthétique thiamine pyrophosphate. Chez *Azotobacter vinelandii*, la flavodoxine NifF est le transporteur d'électrons principal (Bennett et al., 1988). Les ferrédoxines FdxA, FdxN, FixFd, VnfFd et trois autres flavodoxines sont des candidates potentiellement impliquées dans l'approvisionnement en électrons de la dinitrogénase réductase (Revue par Saeki, 2004). Lorsque la ferrédoxine FdxN est inactivée, l'activité de la nitrogénase molybdène est réduite de 60 à 65%. Par contre, ce phénotype pourrait être dû à un rôle possible de FdxN dans l'assemblage du cofacteur FeMo (Rodriguez-Quinones et al., 1993). Dans des conditions où seulement la nitrogénase vanadium est fonctionnelle, la ferrédoxine VnfFd est essentielle pour la croissance d'*Azotobacter vinelandii* (Raina et al., 1993). Tout comme chez *Klebsiella pneumoniae*, NifJ fournit les électrons à la flavodoxine NifF ou aux autres flavodoxines/ferrédoxines.

La bactérie pourpre non-sulfureuse *Rhodobacter capsulatus* possède six ferrédoxines et une flavodoxine (FdxN, FdxA, FdxB, FdxC, FdxD, FdxE, NifF). De ce groupe, l'importance de la ferrédoxine FdxN et de la flavodoxine NifF dans le transport d'électrons jusqu'à la dinitrogénase réductase a été démontrée par des analyses mutationnelles. Lorsque *fdxN* est muté, la nitrogénase molybdène est 20 fois moins active que dans la souche sauvage. De plus, ce mutant contient 4 fois moins de nitrogénase molybdène. Cette ferrédoxine aurait un rôle à la fois dans la stabilisation de la nitrogénase Mo et dans le transport des électrons (Jouanneau et al., 1995). Dans un milieu limité en fer (formation de ferrédoxine problématique) et sans source d'azote réduit, la mutation de *nifF* empêche *Rhodobacter capsulatus* de croître. Dans un milieu abondant en fer, l'activité de la nitrogénase molybdène dans la souche *nifF* est réduite à 55% (Gennaro et al., 1996). FdxN est aussi impliqué dans l'approvisionnement en électrons de la nitrogénase fer de *Rhodobacter capsulatus* puisque dans un milieu dépourvu de molybdène, la souche *fdxN* croît très mal (Schüddekopf et al., 1993).

La pyruvate-Fd oxydoréductase, quoique capable de supporter la réduction du N_2 *in vitro* par la nitrogénase molybdène, n'est pas la source d'électrons principale de FdxN ou de NifF chez *Rhodobacter capsulatus* (Yakunin et Hallenbeck, 1998A). Un groupe de dix protéines Rnf (RnfA, RnfB, RnfC, RnfD, RnfE, RnfF, RnfG, RnfH, RnfX, RnfY) pourrait accomplir ce travail. L'inactivation par mutation de chacun des gènes *rnf*, à l'exception de *rnfH* pour lequel la construction d'un mutant reste à faire, empêche la croissance de *Rhodobacter capsulatus* dans des conditions où la réduction du N_2 est obligatoire (Saeki et al., 1993; Schmehl et al., 1993). Autre évidence de l'implication de ces protéines dans le transport d'électrons, lorsque l'opéron *rnfABCDGEH* est surexprimé, l'activité de la nitrogénase molybdène *in vivo* augmente de 50% à 100% mais l'activité *in vitro* et la quantité de nitrogénases molybdène dans la cellule demeurent inchangées (Jouanneau et al., 1998). Les protéines Rnf d'*Azotobacter vinelandii*, au contraire, seraient plutôt associées à l'expression des protéines NifHDK de la nitrogénase molybdène et à l'assemblage du centre [4Fe-4S]-Cys₄ de la dinitrogénase réductase (Curatti et al., 2005). Les protéines Rnf jouent aussi un rôle dans l'alimentation en électrons de la nitrogénase fer de *Rhodobacter capsulatus* puisque dans une souche *nifHDK*, tous les gènes *rnf*, à l'exception de *rnfB*, sont essentiels pour la croissance diazotrophique (Masepohl et Klipp, 1996; Schüddekopf et al., 1993).

L'hypothèse selon laquelle les protéines Rnf réduisent FdxN et/ou NifF a pris naissance suite à trois observations. Premièrement, RnfABCDGE forment un complexe protéique associé à la membrane (Jouanneau et al., 1998). Deuxièmement, la comparaison des séquences en acides aminés a révélé que RnfC possède des régions similaires à ce que l'on retrouve chez les H⁺-NADH-quinone oxydoréductase (H⁺-NQR); entre autre des sites d'attachement pour le NADH et le FMN. Troisièmement, les protéines RnfA, RnfD et RnfE ont entre 25% et 40% d'homologie avec NqrA, NqrC et NqrF, trois membres du complexe protéique membranaire formant la Na⁺-NADH-quinone oxydoréductase (NqrA, NqrB, NqrC, NqrD, NqrE, NqrF) (Na⁺-NQR) de *Vibrio alginolyticus* (Nakayama et al., 1998). Les enzymes H⁺-NQR et Na⁺-NQR sont respectivement impliquées dans la translocation

à travers la membrane de H^+ et de Na^+ . Donc, il a été proposé que le complexe protéique membranaire Rnf pourrait être organisé en deux sous-complexes: l'un comprenant RnfB et RnfC, ressemblant à la H^+ -NQR et couplant l'oxydation du NADH à la réduction de FdxN/NifF et l'autre, comprenant RnfADGE, ressemblant à la Na^+ -NQR et fournissant l'énergie nécessaire, par l'entremise d'une force proton motrice, à la réduction de FdxN/NifF par le NADH (Kumagai et al., 1997).

1.2.1.5 Maturation de la nitrogénase

La grande majorité des expériences visant à bien comprendre les étapes de la maturation de la nitrogénase molybdène a été effectuée chez *Azotobacter vinelandii* et chez *Klebsiella pneumoniae*. Trois protéines sont essentielles pour la maturation de la dinitrogénase réductase: NifM, NifS et NifU. NifM est une peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase (PPI). Cette enzyme convertit en *trans* le lien peptidyl-prolyl du résidu Pro258 et permet le repliement adéquat de la dinitrogénase réductase (Gavini et al., 2006). NifS est une cystéine désulfurase qui fournit le soufre nécessaire pour l'assemblage du centre $[4Fe-4S]-Cys_4$ alors que NifU est la chaperone où se fait cette assemblage (Yuvaniyama et al., 2000; Zheng et al., 1994). La maturation de la dinitrogénase FeMo se fait en plusieurs étapes (voir figure 11). D'abord, deux paires de groupes $[4Fe-4S]$ sont insérées dans le tétramère $\alpha_2\beta_2$ probablement par l'entremise du couple de protéines NifS et NifU. La dinitrogénase réductase en présence de Mg-ATP, amorce, par un mécanisme inconnu n'impliquant pas sa fonction transport d'électrons, la transformation des deux paires de groupes $[4Fe-4S]$ en deux groupes P et rend accessible le site d'insertion du cofacteur FeMo (Revue par Rubio et Ludden, 2005). Ensuite, la protéine NafY s'attache à la dinitrogénase immature et participe à l'insertion du cofacteur FeMo. Le rôle exact de NafY dans ce processus est soit de stabiliser le site d'insertion labile du cofacteur FeMo ou d'être elle-même à l'origine de l'insertion. Subséquemment, NafY se dissocie du tétramère mature $\alpha_2\beta_2$. Les chaperones GroEL sont requises pour l'expression d'une nitrogénase FeMo fonctionnelle. Ces protéines s'associent à NifHDK et serait nécessaires pour le repliement correct de l'activateur NifA. Le rôle détaillé de NifA

sera décrit dans la section 1.2.2.3. Les chaperones GroEL sont aussi impliquées, soit directement ou via la maturation de d'autres protéines de maturation, dans l'activation du cofacteur FeMo (Ribbe et Burgess, 2001).

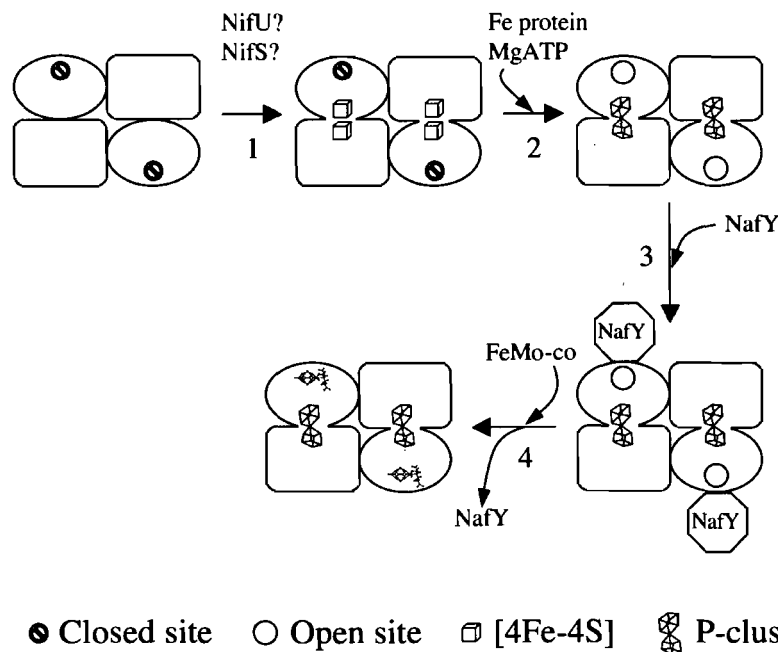


Figure 11. Maturation de la dinitrogénase. Légende: ovale = α (NifD); rectangle = β (NifK); octogone = NafY. Étape 1: chargement initial du tétramère $\alpha_2\beta_2$ avec 2 paires de centres [4Fe-4S]. Étape 2: formation des centres P et préparation du site d'insertion du cofacteur FeMo. Étape 3. Attachement de NafY et stabilisation du site d'insertion du cofacteur FeMo. Étape 4. Insertion du cofacteur FeMo, dissociation de NafY et génération de la dinitrogénase mature. (Figure modifiée à partir de Rubio et Ludden, 2005).

L'assemblage du cofacteur FeMo se fait avant l'insertion dans la dinitrogénase. La protéine NifB chaperonne l'assemblage du cofacteur NifB, un groupe Fe-S précurseur du cofacteur FeMo (Shah et al., 1994). Le cofacteur NifB est ensuite pris en charge et transformé par le couple de protéines NifEN (Revue par Rubio et Ludden, 2005). NifX s'attache au cofacteur NifB et contrôlerait le flux de cofacteurs NifB dans la voie de synthèse du cofacteur FeMo (Hernandez et al., 2007).

Subséquentement, la nitrogénase réductase catalyse l'insertion Mg-ATP-dépendante du molybdène et de l'homocitrate (synthétisé par NifV) dans le cofacteur FeMo (Hu et al., 2006). Le cofacteur FeMo mature s'attache ensuite à la protéine NafY.

1.2.1.6 Diversité des organismes réducteurs de N₂

Le groupe des diazotrophes est restreint en nombre mais étalé à travers plusieurs familles de bactéries et d'archaea (voir tableau I). L'identification de ces microorganismes dans l'environnement résulte de la détection du gène *nifH* ou quelquefois du gène *nifD* (Zehr et McReynolds, 1989; Ueda et al., 1995). Pour ce faire, une série de techniques de biologie moléculaire est utilisée: l'extraction de l'ADN ou des ARNm provenant d'échantillons environnementaux, la PCR, la RT-PCR, le clonage, le séquençage, les micropuces ADN, etc. Une similarité élevée entre les gènes *nifH* des différentes espèces réductrices laisse croire que la nitrogénase molybdène aurait atteint sa forme actuelle tôt dans l'évolution et se serait propagée chez les diazotrophes à partir d'un ancêtre commun (Postgate et Eady, 1988). Voici un bref survol des principaux groupes de diazotrophes.

Dans la nature, les diazotrophes entretiennent souvent des relations symbiotiques avec des organismes incapables de réduire le N₂. L'éventail des associations bénéfiques pour les deux membres du couple diazotrophes-eucaryotes est assez large. Par exemple, certaines cyanobactéries fournissent les éponges marines et les coraux en molécules d'azote fixé (Revue par Kneip et al., 2007). Dans l'intestin du termite, l'on retrouve des protozoaires flagellés contenant à leur tour des espèces de bactéries réductrices du N₂ constituant un phylum distinct nommé Endomicrobia (Stingl et al., 2005). Les champignons aussi se servent des cyanobactéries pour avoir accès à de l'azote fixé. C'est le cas du cyanolichen où il y a symbiose tripartite entre un champignon, une algue et une cyanobactérie. Dans ce ménage à trois, la cyanobactérie réduit l'azote et fournit aussi des molécules de carbone organique, l'algue se spécialise dans la photosynthèse et le champignon protège les cyanobactéries d'une concentration en O₂ inhibitrice pour l'activité de la

nitrogénase (Honegger, 2001). Autre forme d'interaction très commune dans la nature, une structure appelée mycorhize à arbuscules résulte de la symbiose entre les racines d'un arbre et un champignon. Dans ce cas, le champignon contient des β -protéobactéries fixatrices d'azote intracellulaires du genre *Burkholderia* (Revue par Kneip et al., 2007). La symbiose bipartite entre un protozoaire et un diazotrophe est plus rare et dans un seul cas, l'interaction entre le diatomé *Rhopalia gibba* et des cyanobactéries du genre *Cyanothece*, la fixation du N_2 par le partenaire procaryotique a été démontrée (Floener et Bothe, 1985).

La symbiose la plus commune dans la nature ayant pour but l'assimilation de l'azote est l'association entre une plante et un diazotrophes. Les α -protéobactéries des genres *Rhizobium*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* sont contenues à l'intérieur de nodules attachés au système racinaire de diverses plantes légumineuses. Ces diazotrophes fournissent de l'azote réduit et reçoivent en retour de la plante des composés organiques de carbone. À remarquer, les bactéries des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sont incapables de réduire le N_2 lorsqu'elles sont libres dans l'environnement (Atlas et Bartha, 1998). La formation des nodules fait l'objet d'un processus complexe et d'une régulation extrêmement serrée. Les Rhizobia sont attirés par les flavonoïdes ou isoflavonoïdes sécrétés par la plante. L'expression des gènes *nod* impliqués dans la synthèse des lipochitines oligosaccharides est alors induite. Ces molécules permettent aux Rhizobia de reconnaître la bonne espèce de plante à coloniser, provoquent le repliement des racines et la division des cellules méristématiques (Atlas et Bartha, 1998). Les racines excrètent aussi du tryptophane récupéré par les Rhizobia et transformé en acide indolacétique, une autre molécule participant au repliement des racines. Les diazotrophes pénètrent ensuite dans les racines, s'installent dans des vésicules membranaires situées à l'intérieur des cellules du parenchyme et prennent une forme bactéroïde. La nitrogénase des Rhizobia est protégée de l'oxygène par une compartimentation dans les nodules et par la leghémoglobine qui capture l' O_2 (de Billy et al., 1991). Les Rhizobia ne sont pas les seuls diazotrophes à pratiquer la symbiose avec les plantes. Les actinobactéries du genre *Frankia* forment des nodules attachés aux racines de plantes de l'ordre des

angiospermes (Torrey et Tjepkema, 1979). Les cyanobactéries sont aussi des symbiotes des plantes mais cette interaction ne résulte pas en la génération d'une structure spéciale comme les nodules. En effet, les cyanobactéries résident dans des cavités symbiotiques, structure qui existe chez les plantes indépendamment de la symbiose. Tel que mentionné dans la section 1.2.1, une fraction des cyanobactéries produisent des hétérocystes pour prémunir leurs nitrogénases contre les effets néfastes de l'O₂ et c'est probablement pour cette raison qu'un nodule est inutile. D'ailleurs les cyanobactéries symbiotiques ont une proportion d'hétérocystes plus élevée que les cyanobactéries libres. Autre caractéristique, le spectre d'hôte végétal pouvant accueillir les cyanobactéries est plus large que pour les Rhizobia ou *Frankia*. Les cyanobactéries symbiotiques ont un taux de fixation du N₂ plus élevé que les cyanobactéries libres et elles sont incapables de faire la photosynthèse pour prévenir une compétition pour le CO₂ entre la plante et le diazotrophe (Meeks, 1998; Revue par Kneip, 2007).

Deux groupes de bactéries libres réductrices d'azote et phototrophes sont présents à travers la majorité des écosystèmes: les cyanobactéries et les bactéries pourpres non-sulfureuses (Revue par Zehr et al., 2003). En effet, les cyanobactéries n'ont pas besoin d'être en symbiose avec des éponges, coraux, champignons ou plantes pour réduire le N₂. Retrouvées dans la nature sous forme unicellulaire ou sous forme de filament pluricellulaire (trichome), les cyanobactéries pratiquent une photosynthèse oxygénique. C'est-à-dire que l'eau est utilisée comme donneur final d'électrons et que la photolyse de l'eau produit de l'O₂. Les cyanobactéries peuvent être divisées en deux groupes : les formatrices d'hétérocystes et les non-formatrices d'hétérocystes. *Anabeana* et *Nostoc* sont les deux genres de cyanobactéries formatrices d'hétérocystes les plus étudiés. Dans le trichome de ce type de microorganisme, les hétérocystes sont retrouvés à travers les cellules végétatives à intervalle plus ou moins régulier. Donc, la fixation de l'azote se fait dans les hétérocystes et est séparée spatialement de la photosynthèse oxygénique effectuée dans les cellules végétatives (Revue par Thiel, 2004). La majorité des espèces de cyanobactéries non-formatrices d'hétérocystes sont incapables de réduire le N₂ ou

encore elles le font seulement en anaérobie ou en présence de faibles concentrations d'O₂. Par contre, selon Gallon (2004), les quelques cyanobactéries non-formatrices d'hétérocystes fixatrices de N₂ en aérobie, tel que *Trichodesmium* et *Gleothoece*, sont probablement responsables de 50% du total annuel de N₂ réduit sur terre. La stratégie adoptée par certains de ces microorganismes pour réduire au minimum l'impact de l'O₂ sur l'activité de la nitrogénase est de faire la photosynthèse oxygénique le jour et la fixation du N₂ la nuit (Revue par Gallon, 2004).

Les bactéries pourpres non-sulfureuses (*Rhodospirillaceae* et *Rhodobacteriaceae*) sont des α -protéobactéries possédant un métabolisme très polyvalent. Par exemple, *Rhodobacter capsulatus* est capable d'adopter 5 modes de croissances différents : photoautotrophe, photohétérotrophe, chimioorganotrophe par respiration aérobie, chimioorganotrophe par fermentation et chimiolithotrophe. À cause de l'énergie nécessaire pour la fixation de l'azote, l'activité de la nitrogénase est optimale dans les modes de croissance impliquant la photosynthèse. Les *Rhodospirillaceae* et les *Rhodobacteriaceae* pratiquent une photosynthèse anoxygénique qui n'utilise pas l'eau comme donneur d'électrons final et donc, qui ne produit pas d'O₂. Des petites molécules organiques, du H₂S, du S ou du H₂ peuvent remplacer l'eau (Imhoff, 1995). *Azospirillum*, *Rhodospirillum* et *Rhodobacter* sont les principaux genres étudiés de cette famille. Du lot, *Azospirillum* est le seul genre de *Rhodospirillaceae* actuellement reconnu pour être étroitement associé à une plante, *Oryza sativa* (Revue par Bashan et al., 2004). Le reste des *Rhodospirillaceae* et *Rhodobacteriaceae* évolue sous forme de bactéries libres présentes, entre autre, dans le sol et les marais (Revue par Masepohl et al., 2004).

Cluster	Group	Subcluster	Genera	
I	Alpha	1J	<i>Azospirillum</i>	
			<i>Gluconacetobacter</i>	
			<i>Mesorhizobium</i>	
			<i>Rhodobacter</i>	
			<i>Rhodospirillum</i>	
			<i>Rhizobium</i>	
			<i>Sinorhizobium</i>	
			1K	<i>Beijerinckia</i>
				<i>Methylocella</i>
				<i>Methylosinus</i>
	<i>Methylocystis</i>			
	<i>Rhizobium</i>			
	<i>Xanthobacter</i>			
	Beta	1J	<i>Burkholderia</i>	
		1K	<i>Burkholderia</i>	
			<i>Herbaspirillum</i>	
	Epsilon	1P	<i>Azoarcus</i>	
		1U	<i>Alcaligenes</i>	
		1F	<i>Arcobacter</i>	
		Gamma	1H	<i>Vibrio</i>
			1K	<i>Acidithiobacillus</i>
			1I	<i>Klebsiella</i>
				<i>Vibrio</i>
			1M	<i>Marichromatium</i>
				<i>Methylomonas</i>
			1N	<i>Azotobacter</i> (<i>vnfH</i>)
		1P	<i>Methylobacter</i>	
	1T	<i>Azomonas</i>		
		<i>Azotobacter</i>		
	Cyanobacteria	1U	<i>Pseudomonas</i>	
		1B	<i>Anabaena</i>	
<i>Chiorogioeopsis</i>				
<i>Calothrix</i>				
<i>Cyanothece</i>				
<i>Dermacarpa</i>				
<i>Fischerella</i>				
<i>Gloeotheca</i>				
<i>Lyngbya</i>				
<i>Myxosarcina</i>				
<i>Nostoc</i>				
<i>Oscillatoria</i>				
<i>Phormidium</i>				
<i>Plectonema</i>				
<i>Pseudanabaena</i>				
<i>Scytonema</i>				
<i>Sympioca</i>				
<i>Synechococcus</i>				

Cluster	Group	Subcluster	Genera
I			<i>Synechocystis</i>
			<i>Tolypothrix</i>
			<i>Trichodesmium</i>
			<i>Xenococcus</i>
	Firmicutes	1D	<i>Frankia</i>
		1E	<i>Paenibacillus</i>
II	Alpha	2C	<i>Rhodobacter</i>
	Delta	2E	<i>Desulfobacter</i>
	Gamma	2C	<i>Azotobacter</i>
	Firmicutes	2D	<i>Paenibacillus</i>
		2E	<i>Clostridium</i>
	Spirochaetes	2C	<i>Spirochaeta</i>
			<i>Treponema</i>
	Archaea	2B	<i>Methanobrevibacter</i>
			<i>Methanococcus</i>
			<i>Methanothermobacter</i>
		2F	<i>Methanosarcina</i>
III	Delta	3B	<i>Desulfobacter</i>
		3E	<i>Desulfomicrobium</i>
			<i>Desulfovibrio</i>
		3J	<i>Desulfotomaculum</i>
		3L	<i>Desulfonema</i>
		3P	<i>Desulfovibrio</i>
		3T	<i>Desulfovibrio</i>
	Firmicutes	3A	<i>Clostridium</i>
		3C	<i>Clostridium</i>
		3D	<i>Acetobacterium</i>
			<i>Clostridium</i>
		3J	<i>Desulfosporosinus</i>
	Spirochaetes	3C	<i>Spirochaeta</i>
			<i>Treponema</i>
		3K	<i>Spirochaeta</i>
	3L	<i>Spirochaeta</i>	
		<i>Treponema</i>	
	3S	<i>Spirochaeta</i>	
Archaea	3C	<i>Methanosarcina</i>	
Green sulphur	3L	<i>Chlorobium</i>	
		<i>Pelodictyon</i>	
IV	Spirochaetes	4A	<i>Treponema</i>
		4C	<i>Treponema</i>
	Archaea	4	<i>Methanobrevibacter</i>
			<i>Methanocaldococcus</i>

Cluster	Group	Subcluster	Genera
IV			<i>Methanococcus</i>
			<i>Methanopyrus</i>
			<i>Methanosarcina</i>
			<i>Methanothermobacter</i>
		4A	<i>Methanosarcina</i>
		4D	<i>Methanosarcina</i>

Tableau I. Distribution phylogénétique des gènes *nifH* à travers les espèces cultivables. Les groupes phylogénétiques (group) majeurs sont basés sur l'ARNr et les sous-clusters (subcluster) sur *nifH*, (Tableau tiré de Zehr et al., 2003).

1.2.2 La régulation de l'expression et de l'activité de la nitrogénase

Puisque la nitrogénase catalyse une réaction coûteuse en énergie, les diazotrophes ont développé une série de mécanismes pour réguler de manière très serrée l'expression et l'activité de cette enzyme. Chez *Rhodobacter capsulatus*, la fixation de l'azote est régulée à trois niveaux: 1- au niveau transcriptionnel par un système combinant GlnB, GlnD, NtrB/NtrC, NtrY/NtrX, RegB/RegA, MopA, MopB, IHF et HvrA responsable de la régulation de l'expression de NifA1, NifA2 et AnfA, les activateurs respectifs de la transcription des gènes de structure de la Mo-nitrogénase et de la Fe-nitrogénase; 2- l'activité de NifA est ensuite modulée par les deux protéines PII, GlnB et GlnK; 3- au niveau posttraductionnel par un système impliquant les protéines GlnB, GlnK, AmtB, DraT et DraG (voir figure 12) (Revue par Masepohl et al., 2004). Dans les sections suivantes, la structure, la fonction et l'organisation génétique de ces protéines régulatrices seront décrites en détail. Les différents stimuli impliqués dans le contrôle de la fixation de l'azote seront caractérisés. De plus, le système complexe de régulation de l'activité et de l'expression des nitrogénases de *Rhodobacter capsulatus* sera comparé à ceux retrouvés chez d'autres bactéries pourpres non-sulfureuses, chez les cyanobactéries, chez *Azotobacter vinelandii*, chez l'entérobactérie *Klebsiella pneumoniae*, etc.

1.2.2.1 Organisation des gènes de la fixation de l'azote

Chez *Rhodobacter capsulatus*, la majorité des gènes associés à la fixation de l'azote sont organisés en quatre grandes clusters (Tableau II) (Revue par Masepohl et al., 2004). La région A contient des gènes codant pour le complexe Rnf, la ferrédoxine FdxN et les protéines de maturation NifENXSVB1. La région B est composée des gènes de structure de la nitrogénase molybdène (*nifHDK*), du facteur σ^{54} (*rpoN*), d'une deuxième copie de la protéine NifB (*nifB2*), des gènes codant pour le système de transport du molybdène (*modABCD*) et des deux répresseurs dépendant du molybdate (*mopAB*). Particularité de *Rhodobacter capsulatus*, deux copies de l'activateur transcriptionnel des gènes *nif*, NifA, sont retrouvées dans la région A et la région B (encodé respectivement par les gènes *nifA1* et *nifA2*). La même observation peut être signalée en ce qui concerne NifU, la chaperone responsable de l'assemblage de la dinitrogénase réductase (NifH) et de la dinitrogénase (NifDK). En effet, deux gènes tronqués (*nifU1* dans la région A et *nifU2* dans la région B) encodent la partie C-terminale de NifU. Chez *Azotobacter vinelandii*, c'est la partie N-terminale de NifU qui participe à l'insertion des groupes [4Fe-4S] dans NifDK. Donc, le rôle exact de NifU1 et NifU2 reste à déterminer. La région C encode les deux systèmes de régulation à deux composantes NtrB/NtrC et NtrY/NtrX. Les gènes de structure de la nitrogénase fer (*anfHDGK*) sont situés dans la région D. Les autres gènes impliqués dans la fixation de l'azote sont éparpillés sur le chromosome. À noter, l'absence dans le génome de *Rhodobacter capsulatus* de NifM, une peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase nécessaire pour la maturation de la dinitrogénase réductase chez *Klebsiella pneumoniae* et chez *Azotobacter vinelandii* (Gavini et al., 2006; Howard et al., 1986). NafY ou la protéine de la même famille NifY sont aussi manquantes. NafY pour *Azotobacter vinelandii* et NifY pour *Klebsiella pneumoniae* participent à l'insertion du cofacteur FeMo dans la dinitrogénase immature (Homer et al., 1993; Homer et al., 1995).

Déjà au niveau de l'organisation des gènes, il y a un mécanisme de régulation de l'expression de la nitrogénase molybdène chez quelques souches de

cyanobactéries formatrices d'hétérocystes. Chez *Anabaena* sp. PCC 7120, pendant la différenciation en hétérocyte, les clusters de gènes codant pour NifHDK, les protéines de maturation associées et la ferrédoxine FdxN subissent un réarrangement par recombinaison spécifique de site (Golden et al., 1985; Golden et al., 1988). Un élément ADN de 11 kb (élément *nifD*) réside dans le gène *nifD* et un autre de 55 kb (élément *fdxN*) est situé dans le gène *fdxN*. L'excision de ces deux éléments est effectuée entre deux petite séquences répétées et permet ainsi l'expression de protéines NifD et FdxN fonctionnelles. Évidemment, dans les cellules végétatives non-fixatrices d'azote, les éléments ADN demeurent insérés. L'excision de l'élément NifD ne nécessite que la recombinase spécifique de site XisA (Lammers et al., 1986). Pour retirer l'élément FdxN du gène *fdxN*, la recombinase spécifique de site XisF et les gènes *xisH* et *xisI* présents sur l'élément FdxN sont requis (Carrasco et al., 1994; Ramaswamy et al., 1997). Le même phénomène a été observé chez *Nostoc punctiforme* qui contient un seul élément ADN de 23 kb inséré dans le gène *nifD* (Meeks et al., 2001).

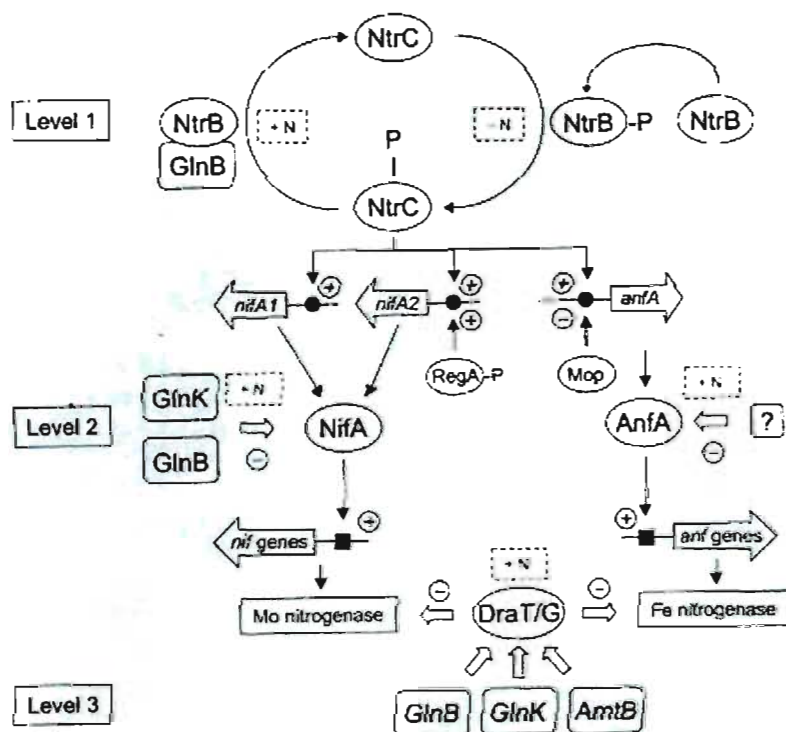


Figure 12. Schéma représentant les 3 niveaux de régulation de l'expression et de l'activité des nitrogénases molybdène et fer de *Rhodobacter capsulatus*. (Figure tirée de Masepohl et al., 2004).

A. Nitrogen fixation genes located in *nif* region A

Gene	Phenotype		Characteristics, function of gene product
	Nif	Anf	
<i>nifH</i>	n.t.	n.t.	Soluble protein
<i>nifE</i>	-	-	Integral membrane protein
<i>nifG</i>	n.t.	n.t.	Transmembrane segment in N-terminus
<i>nifD</i>	-	-	Integral membrane protein
<i>nifC</i>	-	-	Iron-sulfur protein
<i>nifB</i>	-	+	Iron-sulfur protein
<i>nifA</i>	-	-	Integral membrane protein
<i>fprA</i>	+	+	FMN-binding protein
<i>fdxC</i>	n.t.	n.t.	[2Fe-2S] ferredoxin
<i>fdxN</i>	+/-	+/-	2x [4Fe-4S] ferredoxin
<i>nifF</i>	-	-	Membrane protein
<i>orf10</i>	+	+	Soluble protein

<i>nifE</i>	-	+	FeMoco biosynthesis
<i>nifN</i>	-	+	FeMoco biosynthesis
<i>nifX</i>	+	+	FeMoco processing
<i>orf4</i>	+	+	Homologue of <i>A. vinelandii orf3</i>
<i>fdxB</i>	+	+	2x [4Fe-4S] ferredoxin
<i>nifQ</i>	q	+	Processing of molybdenum
<i>orf6</i>	+	+	Homologue of <i>A. vinelandii orf6</i>
<i>nifU1</i>	2x +	2x +	Truncated <i>nifU</i> gene
<i>nifS</i>	-	+	L-Cysteine desulfurase, FeS core formation
<i>nifV</i>	+/-	-	Homocitrate synthase
<i>nifW</i>	+	+	Stabilization of dinitrogenase
<i>nifA1</i>	2x -	2x +	Transcriptional activator of <i>nif</i> genes
<i>nifB1</i>	2x -	2x -	FeMoco and FeFeco biosynthesis
<i>orf1</i>	+	+	Periodic protein, homologue of <i>A. vinelandii orf2</i>
<i>nifZ</i>	+	+	Accumulation of active MoFe protein
<i>nifT</i>	+	n.t.	Homologue of <i>B. japonicum fixU</i>
<i>orf413</i>	+	n.t.	Soluble protein
<i>mop</i>	+	n.t.	Molybdate-binding protein

Abbreviations: + (wild type level growth); - (no growth); +/- (altered growth); n.t. (not tested); q (diazotrophic growth with 1 mM but not 4 μ M molybdate); 2x (duplicated gene; phenotype of double mutant)

B. Nitrogen fixation genes located in *nif* region B

Gene	Phenotype		Characteristics, function of gene product
	Nif	Anf	
<i>fdxD</i>	n.t.	n.t.	[2Fe-2S] ferredoxin
<i>nifH</i>	-	+	Dinitrogenase reductase (Fe protein) subunit
<i>nifD</i>	-	+	Dinitrogenase (MoFe protein) α subunit
<i>nifK</i>	-	+	Dinitrogenase (MoFe protein) β subunit
<i>nifU2</i>	2x +	2x +	Truncated <i>nifU</i> gene
<i>rpoN</i>	-	-	Alternative sigma factor (σ^{54} , RpoN, NtrA, NifR4)
<i>nifA2</i>	2x -	2x +	Transcriptional activator of <i>nif</i> genes
<i>nifB2</i>	2x -	2x -	FeMoco and FeFeco biosynthesis
<i>modD</i>	+	+	Molybdenum transport
<i>modC</i>	m	+	Molybdenum transport, ATP-binding
<i>modB</i>	m	+	Molybdenum transport, membrane protein
<i>modA</i>	m	+	Periplasmic molybdenum-binding protein
<i>mopA</i>	+	+	Molybdate-dependent repressor
<i>mopB</i>	+	+	Molybdate-dependent repressor

Abbreviation: m (diazotrophic growth with 50 μ M but not with 100 nM molybdate)

C. Nitrogen fixation genes located in *nif* region C

Gene	Phenotype		Characteristics, function of gene product
	Nif	Anf	
<i>nifR3</i>	+	n.t.	Homologue of enterobacterial <i>yhdG</i>
<i>ntrB</i>	+/-	n.t.	Sensor kinase (2-component reg. system)
<i>ntrC</i>	-	-	Response regulator (2-component reg. system)
<i>ntrY</i>	+	+	Sensor kinase (2-component reg. system)
<i>ntrX</i>	n.t.	n.t.	Response regulator (2-component reg. system)
<i>nrfA</i>	n.t.	n.t.	Homologue of <i>E. coli hfg</i> encoding HF-1

D. Nitrogen fixation genes located in the *anf* gene region

Gene	Phenotype		Characteristics, function of gene product
	Nif	Anf	
<i>anfA</i>	+	-	Transcriptional activator of <i>anf</i> genes
<i>anfH</i>	+	-	Alternative dinitrogenase reductase (Fe protein-3)
<i>anfD</i>	+	-	Alternative dinitrogenase (FeFe protein) α subunit
<i>anfG</i>	+	-	Alternative dinitrogenase (FeFe protein) δ subunit
<i>anfK</i>	+	-	Alternative dinitrogenase (FeFe protein) β subunit
<i>anf1</i>	+	-	Homologue of <i>A. vinelandii</i> <i>anfO</i>
<i>anf2</i>	+	-	Homologue of <i>A. vinelandii</i> <i>anfR</i>
<i>anf3</i>	+	-	Soluble protein

E. Nitrogen fixation and assimilation genes scattered in the chromosome

Gene	Phenotype		Characteristics, function of gene product
	Nif	Anf	
<i>nifF</i>	f	n.t.	Flavodoxin
<i>draT</i>	+	+	Dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase
<i>draG</i>	+	+	Dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase
<i>glnB</i>	+	+	PII-like signal transduction protein
<i>glnA</i>	Gln	Gln	Glutamine synthetase
<i>glnK</i>	+	+	PII-like signal transduction protein
<i>amtB</i>	+	n.t.	(Methyl)ammonium transport
<i>amtY</i>	+	n.t.	Ammonium transport
<i>glnD</i>	L	L	Uridyl transferase/uridylyl-removing enzyme
<i>himA</i>	-	-	IHF (integration host factor) α subunit
<i>Hip</i>	n.t.	n.t.	IHF (integration host factor) β subunit
<i>regB</i>	n.t.	n.t.	Sensor kinase (2-component reg. system)
<i>senC</i>	n.t.	n.t.	Maximal induction from the <i>puf</i> and <i>puh</i> operons
<i>regA</i>	n.t.	n.t.	Response regulator (2-component reg. system)
<i>hvrA</i>	+	n.t.	Histone-like protein
<i>orf350</i>	n.t.	n.t.	Soluble protein
<i>ranT</i>	+	+/-	Thioesterase-like protein
<i>ranR</i>	+	-	tetR-like protein
<i>pcrA</i>	n.t.	n.t.	ATP-dependent helicase
<i>Era</i>	n.t.	n.t.	RAS-like protein

Abbreviations: f (no diazotrophic growth when iron is omitted from the basic minimal medium); Gln (glutamine auxotroph); L (*glnD* null mutation is lethal in nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing conditions)

Tableau II. Organisation des gènes impliqués dans la fixation et l'assimilation de l'azote chez *Rhodobacter capsulatus* et fonction de leur produit. Les barres horizontales séparent les opérons. (Tableau modifié à partir de Masepohl et al., 2004).

1.2.2.2 Structure des opérons *nifHDK* et *anfHDGK*

L'opéron *nifHDK* de *Rhodobacter capsulatus* a une longueur de 4.4 kb. Quatre ARN messagers correspondant à *nifHDK*, *nifH*, *nifHD* et *nifDK* sont transcrits à partir de cet opéron (Willison et al., 1993). Le clivage endonucléolytique du transcrit *nifHDK* est le mécanisme le plus probable pour expliquer l'existence de ces espèces d'ARNm. D'ailleurs, la présence d'une structure tige-boucle potentielle entre la région codante *nifH* et *nifD* pourrait prévenir une dégradation trop rapide de l'extrémité 3' du transcrit *nifH*. La production d'ARNm multiples à partir de l'opéron *nifHDK* existe aussi chez *Azotobacter vinelandii*, *Azospirillum brasilense* et chez *Klebsiella pneumoniae* (Chang et al., 1988; de Zamoroczy et al., 1989; Jacobson et al., 1986). *In vitro*, la variation du ratio de NifH/NifDK de *Klebsiella pneumoniae* altère l'activité de la nitrogénase molybdène. Le clivage du transcrit *nifHDK* pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité de NifHDK par l'entremise du contrôle du ratio entre les différentes sous-unités. D'ailleurs, la culture de *Rhodobacter capsulatus* dans un milieu contenant du glutamate résulte principalement en la génération de transcrit *nifHDK*. Lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu sans source d'azote, les petits transcrits sont majoritaires (Willison et al., 1993). Même si ces deux conditions sont favorables à la transcription des gènes codant pour la nitrogénase molybdène, celle-ci est plus active dans un milieu dépourvu de source d'azote que dans un milieu contenant du glutamate (Yoch, 1979).

Les protéines de structure de la nitrogénase Fer sont exprimées à partir de l'opéron *anfHDGK123*. L'inactivation d'un seul de ces sept gènes empêche *Rhodobacter capsulatus* de croître en absence de molybdène dans des conditions où la fixation de l'azote est essentielle. Par contre, la nitrogénase alternative d'un triple mutant *anf123* est toujours capable de réduire l'acétylène (Revue par Masepohl et al., 2004). Anf1 et Anf2 sont respectivement des homologues de AnfO et AnfR d'*Azotobacter vinelandii*. Tout comme Anf123, ces deux protéines encodées sur l'opéron *anfHDGKOR* sont nécessaires pour la réduction du N₂ par AnfHDGK mais pas pour la réduction de l'acétylène (Mylona et al., 1996). La structure et le rôle

exact d'Anf123 et d'AnfOR reste à déterminer. À ce propos, les seuls éléments structuraux connus sont qu'AnfO/Anf1 contiennent du fer et qu'Anf3 pourrait être impliquée dans le transport des électrons puisqu'elle possède un cofacteur flavine-nucléotide (Joerger et al., 1989; Sicking et al., 2005). Un système levure à deux hybrides a démontré l'interaction d'Anf1 avec deux nouvelles protéines, RanR et RanT. L'inactivation de *ranR* ou de *ranT* cause le même phénotype que celui observé chez un mutant *anf1*. Outre la présence de fer dans Anf1, Sicking et al. (2005) ont relevés plusieurs indices qui laissent penser qu'Anf1, RanR et RanT sont responsables de l'acquisition et/ou de l'insertion de l'atome de fer se substituant au molybdène dans le cofacteur FeFe de la nitrogénase alternative de *Rhodobacter capsulatus*. RanT présente des similarités avec la superfamille des thioestérases. Chez *Yersinia pestis*, la production de la yersiniabactine, un sidérophore, nécessite un domaine thioestérase. Les gènes *tolQRA* situés en aval de *ranT* sont impliqués chez *Pseudomonas aeruginosa* dans le transport à travers la membrane externe de macromolécules tel que les sidérophores. Le gène codant pour RanR, protéine similaire aux régulateurs de la famille TetR, est localisé entre *rhbA* en aval et *tonB* en amont. RhbA catalyse la première étape de la synthèse du sidérophore rhizobactine de *Sinorhizobium meliloti* et TonB d'*Erwinia chrysanthemi* est nécessaire pour le transport des ferrisidérophores de cette bactérie.

1.2.2.3 Les activateurs NifA et AnfA

NifA active la transcription de *nifHDK* et d'autres gènes associés à la nitrogénase molybdène en réponse à une limitation en azote fixé et en oxygène. Les deux copies de NifA de *Rhodobacter capsulatus*, NifA1 (579 acides aminés) et NifA2 (582 acides aminés), sont identiques à l'exception de leur extrémité N-terminale qui fait respectivement 19 et 22 acides aminés (Paschen et al., 2001). La croissance diazotrophique en présence de molybdène est toujours possible dans un mutant *nifA1* ou *nifA2* mais pas dans un double mutant *nifA1nifA2* (Masepohl et al., 1988). Ces observations démontrent que NifA1 et NifA2 peuvent se substituer mutuellement. Les protéines NifA des diazotrophes sont constituées de trois

domaines distincts. Le domaine N-terminal (ND) peu homologue pourrait servir de senseur environnemental. Par exemple, NifA d'*Azotobacter vinelandii* possède un domaine GAF (cGMP-specific and -stimulated phosphodiesterases, *Anabaena* adenylate cyclases and *E. coli* FhlA) en N-terminal auquel peut s'attacher l' α CG (Little et Dixon, 2003). Le domaine central (CD) AAA+ Atpase plus conservé interagit probablement avec l'ARN polymérase (Revue par Fischer, 1994). Le site d'attachement potentiel pour l'ATP serait situé dans le premier tiers de CD. Le domaine C-terminal (DBD), un peu moins conservé que CD, contient un motif HTH d'attachement à l'ADN. Entre DBD et CD, il y a une région de 36 à 38 acides aminés contenant un motif Cys-X₁₁-Cys-X₁₉-Cys-X₄-Cys probablement responsable de l'attachement d'un groupe Fe-S (Fischer et al., 1988). Chez les Rhizobia, la présence de ce motif dans NifA corrèle avec la sensibilité de la protéine à l'oxygène (Revue par Dixon, 1998). Puisque ce motif est présent dans NifA de *Rhodobacter capsulatus*, la protéine est probablement sensible à l'oxygène. Au contraire, l'activité de NifA des γ -protéobactéries tel que *Klebsiella pneumoniae* n'est pas modulée par la pression partielle en O₂. Chez ce type de bactérie, une protéine additionnelle, NifL, est requise pour que l'activité de NifA soit régulée par l'oxygène et par l'azote fixé. Le système NifL-NifA des γ -protéobactéries sera décrit dans la section 1.2.2.8.

NifA1 et NifA2 de *Rhodobacter capsulatus* stimulent la transcription de *nifHDK* en collaborant avec le facteur σ^{54} de l'ARN polymérase. Les protéines NifA reconnaissent une séquence consensus appelé «Upstream Activator-binding Site» (UAS) (TGT-N₁₀-ACA) situé à plus de 100 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. Des éléments UAS identiques à la séquence consensus sont associés aux opérons *nifHDK*, *nifB1orf1nifZnifT* et *nifB2*. Des éléments UAS imparfaits sont situés en amont des opérons *nifEnifNnifXorf4fdxBnifQ*, *nifU2rpoN* et *orf6nifU1nifSnifVnifW* (Revue par Masepohl et al., 2004). L'ADN doit être plié pour que CD de NifA puisse interagir avec le complexe ARN polymérase- σ^{54} . Le même pré-requis est essentiel pour l'activation de la transcription par NtrC-P. IHF serait responsable en partie de l'introduction d'une courbure favorable à l'interaction NifA-ARN polymérase- σ^{54} (Hoover et al., 1990). Les sous-unités α et β d'IHF de

Rhodobacter capsulatus sont encodées par les gènes *himA* et *hip* (Toussaint et al., 1993). IHF s'attacherait sur l'ADN entre NifA et la région promoteur -24,-12. Une fois NifA à proximité de l'ARN polymérase- σ^{54} , l'activateur doit hydrolyser l'ATP pour induire la séparation des brins d'ADN et la formation du complexe ouvert (Revue par Dixon, 1998). La séquence consensus du site d'attachement d'IHF, ATCAA-N₄-TTG, a aussi été identifiée en amont d'*anfHDGK*. IHF favoriserait l'activation de l'expression de la nitrogénase fer par AnfA. Cet activateur interagit avec le facteur σ^{54} . AnfA a une structure similaire à celle de NifA. Les domaines N-terminal d'AnfA d'*Azotobacter vinelandii* et d'AnfA de *Rhodobacter capsulatus* contiennent un motif Cys-X₂-Gly-X-Cys formant un site d'attachement pour un deuxième groupe Fe-S (Jepson et al., 2002).

1.2.2.4 La régulation de la transcription de *nifA1*, *nifA2* et *anfA* par NtrB/C

nifA1 est quatre fois plus transcrit lorsque la source d'azote est du glutamate plutôt que du NH₄⁺ alors que pour *nifA2* cette augmentation est de trois fois. Le premier palier de régulation de la fixation de l'azote chez *Rhodobacter capsulatus* consiste en l'activation de l'expression de *nifA1*, *nifA2* et *anfA* par la forme phosphorylée de NtrC. En effet, la délétion de *ntrBntrC* abolit l'expression de NifA1 et NifA2 lorsque les conditions sont limitantes en azote fixé (Hübner et al., 1991). À remarquer, même en présence de NH₄⁺, chez la souche sauvage, il y a toujours un niveau basal de NifA1 et NifA2 probablement pour permettre une activation rapide de la transcription des gènes de structure de la nitrogénase molybdène lorsque la source d'azote est épuisée. NtrC-P stimule aussi la transcription des opérons *mopAmodABCD*, *glnBA*, *glnKamtB*, *amtY*, et *ureDABCEFG*. À l'exception des gènes *ure* requis pour la synthèse et l'activité de l'uréase, tous les autres gènes sont associés à la fixation de l'azote (pour la fonction de chacune des ces protéines voir le tableau II) (Revue par Masepohl et al., 2004). Comme pour le système de régulation à deux composantes NtrB/NtrC d'*Escherichia coli*, l'histidine kinase NtrB de *Rhodobacter capsulatus* s'autophosphoryle probablement sur l'histidine 214 avant de phosphoryler

NtrC (Cullen et al., 1996). Sous forme dimérique, NtrC-P s'attache à plus d'une centaine de paires de bases en amont des promoteurs concernés à un tandem d'éléments UAS (CGCC-N₂-A(T/A)(T/A)-N-(T/A)T-N₂-GC) similaires à ce que l'on retrouve chez *E. coli* (Bowman et Kranz, 1998; Foster-Hartnett et Kranz, 1994; Masepohl et al., 2001). L'autophosphorylation de NtrB et la phosphorylation subséquente de NtrC surviennent lorsque le ratio Gln/ α CG est bas. Chez *Escherichia coli*, la transmission de ce signal se fait par un mécanisme décrit précédemment dans cette revue de littérature impliquant cinq protéines: GlnA, GlnB, GlnK, GlnD et GlnE. Puisque *Rhodobacter capsulatus* possède un homologue pour chacune de ces protéines, il a été proposé que le mode de régulation de l'activité du système NtrB/NtrC soit similaire à ce qui est observé chez *E. coli* (Revue par Masepohl et al., 2004). L'uridylylation des protéines PII sur la tyrosine 51 par GlnD est au centre de cette voie de transduction du signal. L'existence de ce phénomène a aussi été démontré pour GlnB et GlnK de *Rhodobacter capsulatus*, pour GlnB, GlnK et GlnJ de *Rhodospirillum rubrum* et pour GlnB et GlnZ d'*Azospirillum brasilense* (Jonsson et Nordlund, 2007; Tremblay et al., 2007; Van Dommelen et al., 2002). Par contre, La régulation de l'activité de NtrB de *R. capsulatus* diffère substantiellement de celle de NtrB d'*E. coli*. Chez *R. capsulatus*, seulement l'une des deux protéines PII, GlnB, a un impact majeur sur les activités kinase et phosphatase de NtrB (Revue par Masepohl et al., 2002). GlnK joue un rôle beaucoup plus limité par rapport à son homologue entérique.

Deux différences majeures existent entre NtrC de *R. capsulatus* et NtrC d'*E. coli*: la première ne peut être phosphorylée par de petites molécules comme l'acétyl phosphate et active la transcription de ces gènes cibles en collaborant avec le facteur ménage σ^{70} (Bowman et Kranz, 1998). D'ailleurs, NtrC de *R. capsulatus* possède une délétion naturelle de 18 acides aminés dans le domaine central qui constitueraient le point de contact entre le facteur σ^{54} et NtrC d'*E. coli* (Jones et Haselkorn, 1989; Morett et Segovia, 1993). Contrairement au couple NtrC-P/ σ^{54} , l'initiation de la transcription par NtrC-P/ σ^{70} nécessite l'attachement d'ATP mais pas son hydrolyse (Bowman et Kranz, 1998).

1.2.2.5 Oxygène et intensité lumineuse: RegB/RegA et HvrA

Puisque la fixation de l'azote est optimale lorsque *Rhodobacter capsulatus* pratique la photosynthèse en anaérobie, la pression partielle en O₂ et l'intensité lumineuse régissent l'expression de la nitrogénase molybdène. Dans cette optique, le système de régulation globale à deux composantes RegB/RegA active à la fois des gènes responsables de la photosynthèse, de l'assimilation du carbone et de la fixation de l'azote en réagissant probablement à l'état redox des ubiquinones et/ou de la cytochrome C oxydase cbb₃ de la chaîne de transport des électrons (voir figure 13) (Elsen et al., 2000; Revue par Elsen, 2004; Swem et al., 2006). RegB/RegA réprime aussi sa propre expression et celle de l'opéron *hupSLC* codant pour une hydrogénase NiFe membranaire permettant à la bactérie de croître en utilisant le H₂ comme donneur d'électrons (Elsen et al., 2000). Plusieurs systèmes de régulation homologues possédant des fonctions similaires à RegB/RegA sont retrouvés chez d'autres bactéries photosynthétiques ou non: PrrB/PrrA de *Rhodobacter sphaeroides*, RegS/RegR de *Bradyrhizobium japonicum*, ActS/ActR de *Sinorhizobium meliloti*, RoxS/RoxR de *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (Revue par Elsen et al., 2004).

Encodée par un gène monocistronique, RegB est une histidine kinase de 50 kDa composée de deux domaines: le domaine transmembranaire N-terminal (NT) et le domaine cytoplasmique C-terminal (CT). Le profil d'hydrophobicité de NT et une analyse avec des fusions phosphatase alcaline laissent penser qu'il possède six hélices transmembranaires (Ouchane et Kaplan, 1999). NT est impliqué dans la dimérisation de la protéine (le dimère est la forme active de RegB) et la régulation des activités catalytiques de l'histidine kinase (Inoue et al., 1995). Entre la troisième et la quatrième hélice transmembranaire de NT, il y a un motif GGXXNPF fortement conservé qui perçoit le potentiel redox. Une étude de réticulation des protéines a révélé que cette séquence est un site d'attachement pour l'ubiquinone. La mutation du résidu phénylalanine compris dans ce motif rend l'autophosphorylation de RegB et la phosphorylation subséquente de RegA constitutives. *In vitro*, l'addition d'un analogue oxydé de l'ubiquinone, la coenzyme Q1, réprime six fois l'activité kinase

de RegB. La coenzyme Q1 réduite n'a aucun effet (Swem et al., 2006). CT contient l'histidine qui subira l'autophosphorylation catalysée par la sous-unité RegB adjacente (position 195), un site d'attachement pour l'ATP et une boîte redox formée des résidus 264 à 266 (Revue par Elsen et al., 2004). *In vitro*, l'exposition de RegB tronquée sans NT à des conditions oxydantes entraîne la formation d'une liaison disulfure intermoléculaires et la conversion de la forme active dimérique à une forme inactive tétramérique. La cystéine en position 265 est nécessaire pour cette oligomérisation. *In vivo*, l'expression en aérobic à partir du promoteur de l'opéron *puf* (gènes de structure du système antenne I et du centre réactionnel photosynthétique) est trois fois plus importante lorsque cette cystéine est remplacée par une alanine (Swem et al., 2003). RegB possède une activité kinase et une activité phosphatase. NT a un impact considérable sur la régulation de l'activité autokinase et déstabilise le phosphate de RegB-P. Au contraire, seulement CT module la déphosphorylation de RegA-P (Revue par Elsen et al., 2004).

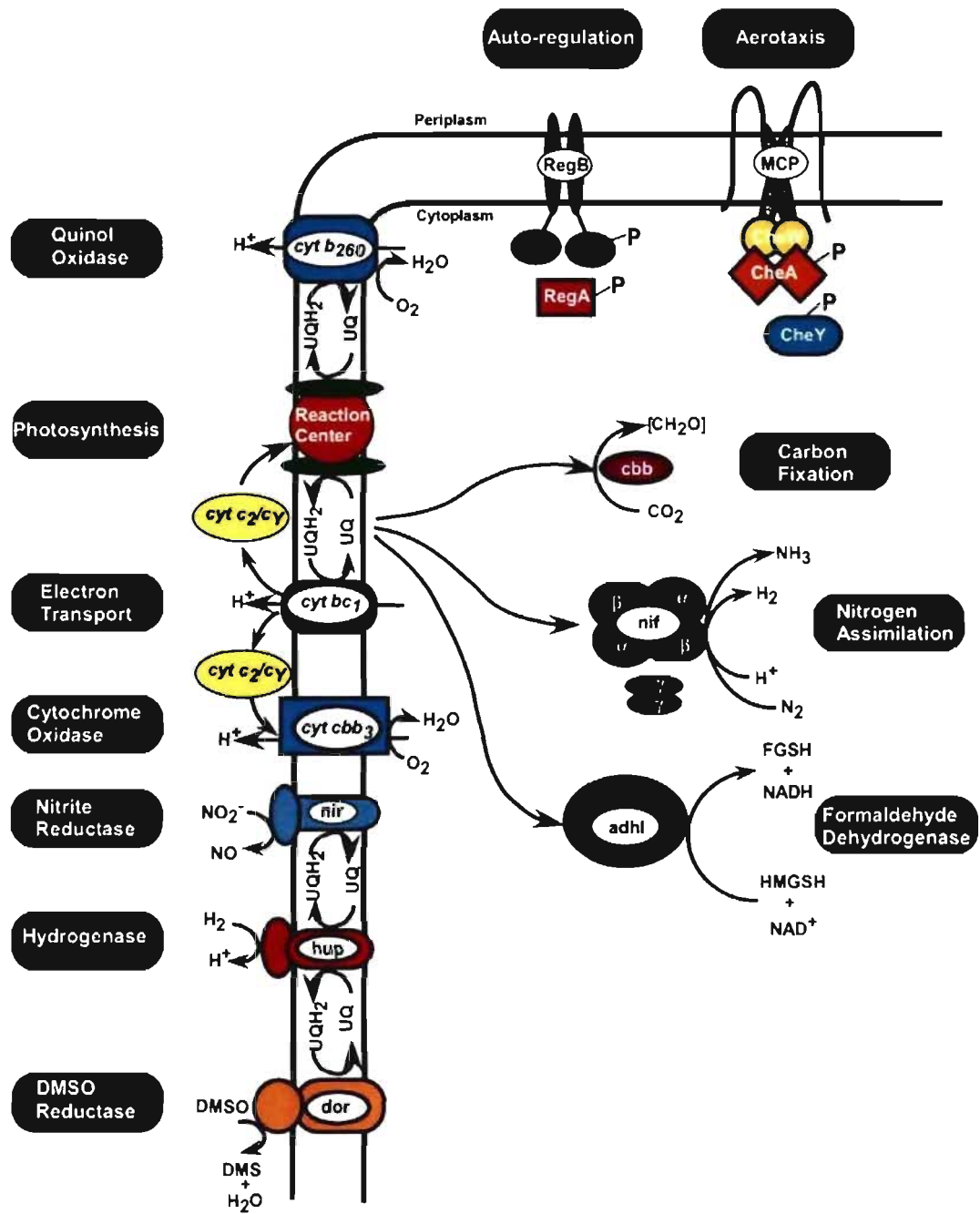


Figure 13. Représentation des différents systèmes dont l'expression est régulée par RegB/RegA chez *Rhodobacter capsulatus* et *Rhodobacter sphaeroides*. Légende: UQH₂ = ubiquinone réduite; UQ = ubiquinone oxydée; FGSH = S-formylglutathione; HMGS = Hydroxyméthylglutathione; DMS = diméthylsulfate; DMSO = diméthylsulfoxyde. (Figure tirée de Elsen et al., 2004).

L'activateur phosphorylé par RegB, RegA est une protéine de 20.4 kDa active sous forme dimérique. Le domaine N-terminal receveur (R) contient un aspartate en position 63 qui constitue le site de phosphorylation. Le domaine R est relié au domaine C-terminal transmetteur (T) par une charnière formée de quatre prolines. Un motif HTH d'attachement à l'ADN pratiquement conservé à 100% à travers les homologues de RegA est présent dans le domaine T (Revue par Dubbs et Tabita, 2004; Revue par Elsen et al., 2004; Masuda et al., 1999). La phosphorylation de l'aspartate 63 affecterait l'affinité de RegA pour l'ADN et faciliterait un changement de conformation favorisant une interaction avec l'ARN polymérase- σ^{70} . RegA déphosphorylée peut aussi stimuler la transcription de certains gènes. En effet, RegA-P réprime l'expression de la cytochrome C oxydase *cbb₃* (opéron *ccoNOQP*) en absence d'oxygène alors que RegA active l'expression de cette enzyme en aérobie (Swem et Bauer, 2002). Le couple RegA et RegA-P stimule la transcription de l'ubiquinol oxydase et inhibe celle de l'opéron *hupSLC* (Revue par Elsen et al., 2004). RegA-P reconnaît la séquence consensus 5'-YGCGRCR_xTATA_xGNCGC-3' (Laguri et al., 2003). En amont de *nifA2*, RegA-P s'attache entre le tandem de sites UAS-NtrC-P et l'élément promoteur -35, -10 (Elsen et al., 2000). L'inactivation de *regA* ou de *regB* de *Rhodobacter capsulatus* cultivé en anaérobie dans un milieu contenant du glutamate ou du NH₄⁺ comme source d'azote, n'a pas effet sur la transcription de *nifA1* et réduit entre 10 et 17 fois celle de *nifA2*. Dans les deux conditions, l'absence de RegA ou RegB n'abolit pas complètement la synthèse de NifA2. Puisque NtrC-P est absolument essentiel pour l'activation de *nifA2*, RegA-P servirait de co-activateur et assurerait une expression optimale de NifA2 dans des circonstances propices à la fixation de l'azote (Elsen et al., 2000).

RegA de *Rhodobacter capsulatus* est transcrite à partir de l'opéron *senCregAhvrA*. SenC est impliqué dans l'assemblage de la cytochrome C oxydase *cbb₃*. Lors de la respiration aérobie, cette enzyme utilise des électrons provenant des cytochromes *c₂* et *c_γ* pour réduire l'O₂ en H₂O et générer un gradient de protons qui servira à la production d'ATP par l'ATPase (voir figure 13). La cytochrome oxydase *cbb₃* est un complexe de quatre protéines: CcoN, la sous-unité catalysant la réduction

du O₂, renferme un hème b «low-spin» et un complexe hème b₃ «high spin»-Cu_B (Cu_B: site d'attachement pour une molécule de cuivre), CcoO et CcoP arriment chacune un cytochrome de type c et CcoQ est une protéine membranaire qui stabiliserait l'enzyme en aérobic (Revue par Cosseau et Batut, 2004; Gray et al., 1994; Oh et al., 2002). SenC contient aussi un motif d'attachement pour le cuivre (CXXXXC). Puisque que le changement de la première cystéine de CXXXXC de SenC en alanine réduit de 82% l'activité de la cytochrome C oxydase cbb₃, il a été proposé que cette protéine de maturation livrerait un cuivre au site Cu_B de CcoN (Swem et al., 2005). HvrA est une protéine de ~ 12 kDa contenant un motif d'attachement à l'ADN HTH de la famille des protéines similaires à H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein) (Buggy et al., 1994). Chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, H-NS joue un rôle dans l'organisation du nucléoïde et dans l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation de la cellule à des stress environnementaux (Revue par Tendeng et Bertin, 2003). H-NS s'attache sur une région courbée de l'ADN à des séquences non-spécifiques. H-NS peut introduire elle-même une courbure dans l'ADN (Spurio et al., 1997). HvrA est un activateur trans qui contrôle l'expression du système antenne I et du centre réactionnel photosynthétique en réponse à une altération de la luminosité (Revue par Gregor et Klug, 1999). En condition de faible intensité lumineuse, HvrA active la transcription de l'opéron *puf* et du gène *puhA* (sous-unité H du centre réactionnel photosynthétique) entraînant ainsi la synthèse de davantage d'appareils photosynthétiques (Buggy et al., 1994). Chez *Rhodobacter sphaeroides*, la protéine homologue d'HvrA, SPB, réprime l'expression de l'opéron *puf* lorsque la luminosité est forte (Revue par Gregor et Klug, 1999). HvrA sert de lien régulateur entre la photosynthèse et la fixation de l'azote puisque l'inactivation d'*hvrA* dans une souche exprimant *nifA1* ou *nifA2* de façon constitutive libère la transcription de *nifHDK* et de *nifB1orf1nifZnifT* du contrôle du NH₄⁺ (Kern et al., 1998; Raabe et al., 2002). Une expérience de retard sur gel a démontré que HvrA se lie à la région promoteur de *nifHDK*. Le mécanisme de transmission du signal d'intensité lumineuse à HvrA n'est pas encore caractérisé.

1.2.2.6 Le transport du molybdène et la répression d'*anfA*

L'expression de la nitrogénase fer de *Rhodobacter capsulatus* est réprimée par la présence de molybdène. Chez *Rhodospirillum rubrum*, le molybdène n'a pas d'impact sur la synthèse de la nitrogénase Fer (Lehman et Roberts, 1991). En fait, cette enzyme est exprimée dès que la nitrogénase molybdène est absente à cause d'une inactivation génétique ou physiologique. MopA et MopB de *Rhodobacter capsulatus* sont deux répresseurs de la transcription d'*anfA* molybdate-dépendants pouvant se substituer l'un à l'autre. Protéines de 27-30 kDa, MopA et MopB sont dotées d'une structure similaire au régulateur de la transcription ModE d'*Escherichia coli*. La partie N-terminale de ModE contient deux motifs HTH (Brennan, 1993). La structure responsable de l'attachement du molybdate est composée de deux séquences répétées en tandem appelées domaines mop1 et mop2. Sous sa forme homodimérique, ModE lie deux molécules de molybdate avec une haute affinité. Des changements de conformation importants surviennent dans les domaines mop1 et mop2 et dans la partie N-terminale lorsque le molybdate s'attache à ModE (Gourley et al., 2001; Schüttelkopf et al., 2003). Il a été suggéré que ces modifications structurales améliorent l'affinité de la protéine pour l'ADN (Schüttelkopf et al., 2003). MopA et MopB peuvent aussi se suppléer pour réprimer l'expression des opérons *mopAmodABCD*, *morAB* et *morC* (Wiethaus et al., 2006). Quant à *mopB*, la régulation de la transcription de ce gène monocistronique est indépendante de MopA/MopB et de la présence ou non dans le milieu de molybdate. Les protéines ModABC forment un système ABC haute-affinité de transport du molybdate (Revue par Self et al., 2001). ModA est située dans le périplasme et lie le molybdate. Cette protéine est responsable de la livraison du molybdate aux autres sous-unités du système ABC. ModB est une protéine membranaire intégrale permettant le passage du molybdate et ModC hydrolyse l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire à ce transport (Maupin-Furlow et al., 1995; Wang et al., 1993). ModD est une protéine de 28 kDa de fonction inconnue. MorABC constitueraient aussi un transporteur ABC. L'implication de ce système dans l'import du molybdate reste à démontrer (Wiethaus et al., 2006). MopA possède une fonction unique par rapport à MopB; il active la

transcription du gène *mop*. Quoique sa fonction demeure nébuleuse, Mop pourrait attacher le molybdate (Revue par Masepohl et al., 2004).

1.2.2.7 GlnB/GlnK et la régulation de l'activité de NifA et d'AnfA

Chez *Rhodobacter capsulatus*, lorsque NifA1 est exprimée de façon constitutive, il y a tout de même une diminution de la synthèse de la nitrogénase molybdène dans un milieu contenant du NH_4^+ par rapport à un milieu contenant de la sérine (source pauvre en azote fixé) (Paschen et al., 2001). Plusieurs observations permettent de conclure que GlnB et GlnK répriment par une interaction directe l'activité de NifA1/NifA2 en présence d'une source riche en azote fixé (Revue par Masepohl et al., 2004). Chez le double mutant *glnBglnK*, il y a une expression anormale de NifA1 et de NifH en présence de NH_4^+ . Dans les mêmes conditions de croissance, le mutant *glnB* accumule NifA1 mais pas NifH démontrant ainsi que GlnK inhibe l'activité de NifA1 (Drepper et al., 2003). Quant à GlnB, le phénotype d'une souche *glnK* est le même que la souche sauvage, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'expression aberrante de NifA1 en présence de NH_4^+ . Avec cette étude génétique, il est impossible de cerner l'impact de GlnB sur la régulation de l'activité de NifA1. Par contre, un système levure à deux hybrides a révélé que GlnB et GlnK interagissent avec NifA1 et NifA2 (voir figure 14) (Pawlowski et al., 2003). Tout comme NifA1, l'expression constitutive d'AnfA n'est pas suffisante pour permettre la transcription de l'opéron *anfHDGK* en présence de NH_4^+ et en absence de molybdène (Drepper et al., 2003). Dans un double mutant *glnBglnK*, AnfA est synthétisée indépendamment de la source d'azote fixé utilisée mais il n'y a pas d'accumulation de la nitrogénase fer. Par conséquent, le mécanisme de régulation de l'activité d'AnfA n'implique pas les protéines PII et demeure inconnu (Drepper et al., 2003; Revue par Masepohl et al., 2004).

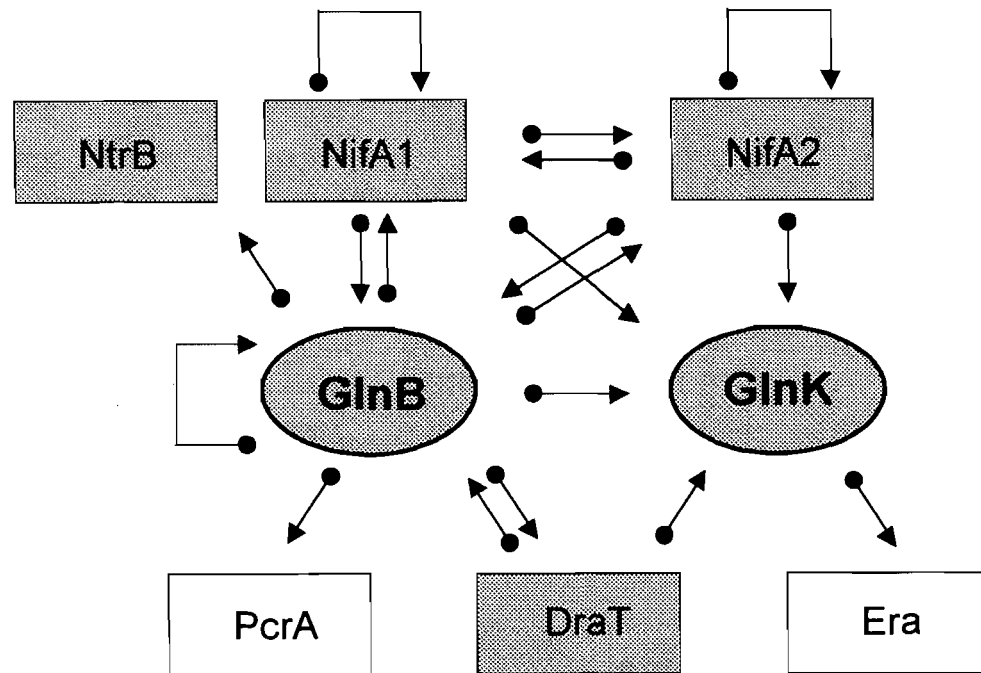


Figure 14. Identification d'interactions protéiques impliquant GlnB, GlnK, NtrB, NifA1, NifA2, PcrA, DraT et Era de *Rhodobacter capsulatus* avec un système levure à deux hybrides. Légende: fond gris = protéine impliquée dans la régulation de la fixation de l'azote. Pour les fonctions de PcrA et d'Era voir tableau IE. (Figure tirée de Pawlowski et al., 2003).

GlnB et GlnK d'*Azorhizobium caulinodans* répriment aussi l'activité de NifA (Michel-Reydellet et Kaminski, 1999). Au contraire, chez *Azospirillum brasilense* et *Rhodospirillum rubrum*, GlnB active NifA en absence d'azote fixé (Revue par Masepohl et al., 2004). Le gène *nifA* de ces deux α -protéobactéries est transcrit indépendamment de la présence ou non de NH_4^+ dans le milieu (Liang et al., 1991; Zhang et al., 2000). GlnB de *R. rubrum* doit être uridylylée au préalable pour activer NifA (Zhang et al., 2000). La délétion de ND de NifA d'*A. brasilense* rend la protéine active en présence de NH_4^+ (Arsene et al., 1996). *In vitro*, ND réduit la capacité de NifA à s'attacher à l'ADN (Monteiro et al., 2001). Un système levure à deux hybrides a démontré que GlnB interagit avec ND de NifA mais pas avec CD et DBD (Chen et al., 2005). À partir de ces trois observations effectuées chez *A. brasilense*, un modèle a été suggéré: la protéine PII s'attache à ND et ainsi

l'empêcherait d'inhiber l'activité de NifA en interagissant avec le domaine CD AAA⁺ ATPase catalytique (Arsene et al., 1996; Chen et al., 2005).

1.2.2.8 NifL et le contrôle de l'activité de NifA

Chez les diazotrophes de la famille des γ -protéobactéries, l'activité de NifA est régulée par NifL en réponse à une variation de la pression partielle en oxygène ou de la concentration en azote fixé (Revue par Martinez-Argudo et al., 2004). Exprimée à partir de l'opéron *nifLnifA*, NifL est une protéine cytoplasmique de ~57 kDa avec une structure similaire à celle de l'histidine kinase NtrB. En N-terminal, NifL de *Klebsiella pneumoniae* possède un domaine PAS alors que NifL d'*Azotobacter vinelandii* en possède deux. PAS de *K. pneumoniae* et PAS1 d'*A. vinelandii* contiennent un cofacteur FAD et sont requis pour permettre à NifL de sentir l'état redox (Revue par Martinez-Argudo et al., 2004). L'oxydation du cofacteur FAD active NifL et par conséquent inhibe l'activité de NifA. La réduction du cofacteur FAD inactive NifL (Hill et al., 1996). L'identité du donneur physiologique d'électrons à NifL n'a pas encore été confirmée. Une hypothèse a été formulée selon laquelle NifL de *Klebsiella pneumoniae* serait réduit directement par le réservoir de ménaquinone en anaérobiose (Thummer et al., 2007). En C-terminal, NifL d'*A. vinelandii* contient un domaine d'attachement pour l'ATP de la superfamille des ATPases GHKL. Même si l'ATP et l'ADP peuvent s'attacher à cette région de la protéine, NifL n'a pas d'activité ATPase ou transphosphorylation (Austin et al., 1994). GHKL est aussi le domaine de NifL interagissant avec la forme déuridylylée de GlnK (Little et al., 2002). Moins homologue à GHKL, le domaine correspondant de NifL de *K. pneumoniae* est incapable de lier un nucléotide adénosine (Klopprogge et al., 2002). NifL d'*A. vinelandii* contient un domaine H de dimérisation et d'autophosphorylation situé entre PAS2 et GHKL. L'histidine conservée de ce domaine n'est pas essentielle pour la transduction du signal (Woodley et Drummond, 1994).

Les opérons *nifLA* et *glnKamtB* d'*Azotobacter vinelandii* sont transcrits de façon constitutive (Meletzus et al., 1998; Toudkarian et Kennedy, 1986). De plus, chez cette bactérie il n'y a qu'une protéine PII, GlnK. Dans ces circonstances, GlnK déuridylylée forme un complexe avec NifL qui interagit subséquemment avec NifA en présence de NH_4^+ (Revue par Martinez-Argudo et al., 2004). L'uridylylation de GlnK par GlnD et sa dissociation subséquente de NifL est donc le premier niveau de régulation de la nitrogénase molybdène. ND (GAF) et CD (AAA^+ atpase) de NifA interagissent avec GHKL de NifL (voir figure 15) (Reyes-Ramirez et al., 2002). La présence d'ADP sur le domaine GHKL augmente l'affinité de NifL pour NifA et stabilise le complexe formé par les deux protéines (Revue par Little et al., 2006). Quand le cofacteur FAD de NifL est réduit et que GlnK est uridylylée, la dissociation de NifL-NifA est facilitée par l'attachement d' αCG à ND de NifA. Par contre, cette molécule d' αCG ne peut empêcher la formation du complexe NifL-NifA si GlnK est déuridylylée ou FAD oxydé (Little et Dixon, 2003; Revue par Little et al., 2006). NifL pourrait inhiber l'activation transcriptionnelle opérée par NifA grâce à plusieurs mécanismes: la prévention de l'attachement à l'ADN par l'entremise de DBD, le remodelage de ND pour induire la répression des activités de CD tel que l'oligomérisation, l'hydrolyse de l'ATP et l'interaction avec le facteur σ^{54} et finalement l'inhibition des activités de CD par un autre processus (Shingler, 1996; Zhang et al., 2002).

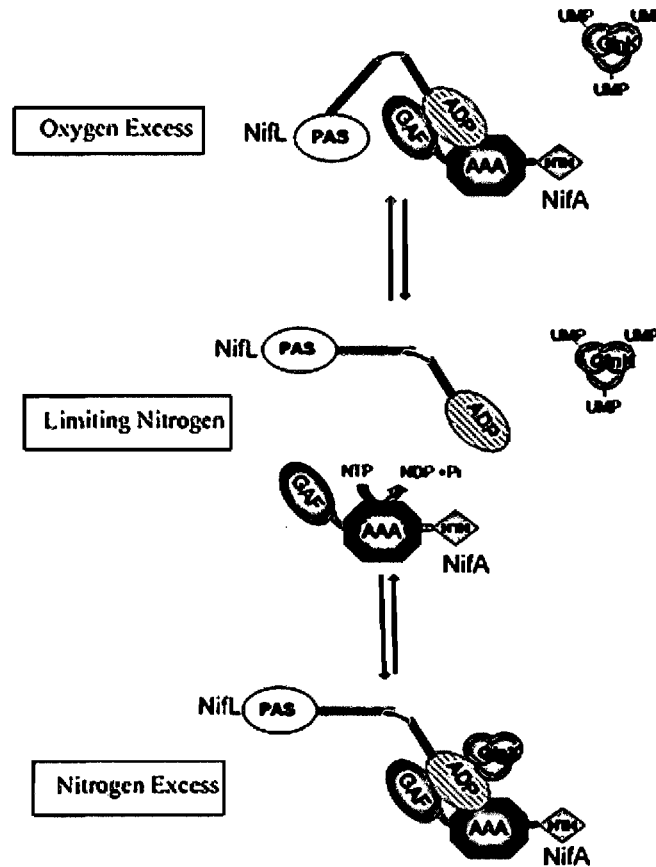


Figure 15. Interaction entre GlnK, NifL et NifA d'*Azotobacter vinelandii* en réponse à différents stimuli environnementaux. (Figure tirée de Martinez-Argudo et al., 2004).

Chez *Klebsiella pneumoniae*, l'expression des opérons *nifLA* et *glnKamtB* est régulée par une voie de transduction du signal impliquant GlnD, GlnB, NtrB et NtrC similaire à ce qui a été décrit dans la section 1.2.2.4 à propos de la transcription des activateurs NifA1, NifA2 et AnfA de *Rhodobacter capsulatus*. NifA est constitutivement associée à son inhibiteur, NifL. Lorsque la réserve d'azote fixé est épuisée, GlnK uridylylée forme un complexe éphémère avec NifL-NifA et provoque la dissociation de ce couple (voir figure 16) (Stips et al., 2004). En anaérobiose, NifL est séquestrée à la membrane cytoplasmique possiblement par le réservoir de ménaquinone (Klopprogge et al., 2002; Stips et al., 2004; Thummer et al., 2007). NifA est active seulement lorsque la culture de *K. pneumoniae* est cultivée en

absence d'oxygène et de NH_4^+ . À remarquer, la forme déuridylylée de GlnK est aussi capable de désagréger NifL-NifA (Edwards et Merrick, 1995; He et al., 1998). Après l'ajout de NH_4^+ , c'est probablement la séquestration de GlnK par la protéine membranaire AmtB qui assure l'intégrité du complexe NifL-NifA (Klopprogge et al., 2002; Stips et al., 2004).

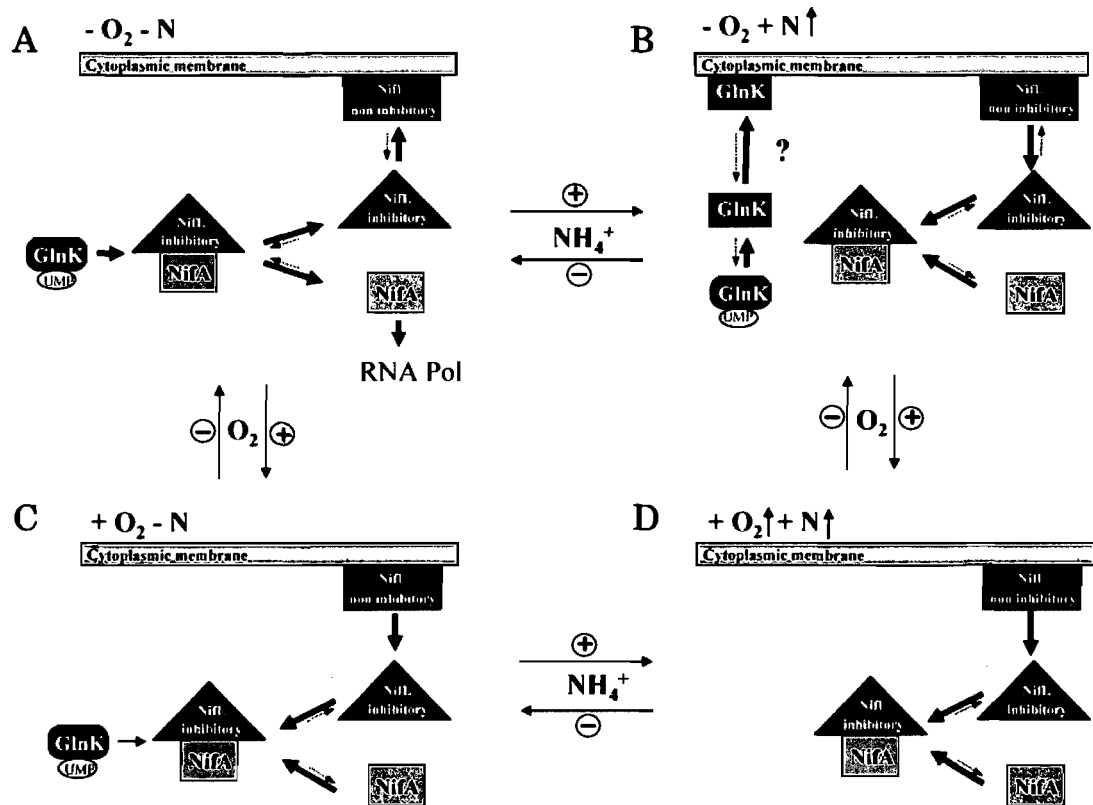


Figure 16. Interaction entre GlnK, NifL et NifA de *Klebsiella pneumoniae* en réponse à différents stimuli environnementaux. (Figure tirée de Stips et al., 2004).

1.2.2.9 La régulation posttraductionnelle des nitrogénases molybdène et fer

L'ajout de NH_4^+ ($> 100 \mu\text{M}$) ou l'exposition à la noirceur de *Rhodobacter capsulatus* suppriment l'activité de la nitrogénase molybdène à l'intérieur de deux à trois minutes (switch-off) (Hallenbeck et al., 1982; Jouanneau et al., 1983; Pierrard et al., 1993). Après l'épuisement du NH_4^+ ou l'illumination de la culture, la fixation de l'azote reprend. Le mécanisme de régulation posttraductionnelle des nitrogénases molybdène et fer le mieux caractérisé est l'ADP-ribosylation de l'arginine conservée en position 102 d'une des deux sous-unités des dinitrogénases réductases NifH et AnfH (Masepohl et al., 1993; Revue par Masepohl et al., 2004). L'ADP-ribosylation, effectuée par le système enzymatique DraT/DraG, empêche la coopération entre la dinitrogénase réductase et la dinitrogénase et par conséquent le transfert d'électrons essentiel à la fixation de l'azote (Murrell et al., 1988). Chez *Azospirillum brasilense* et *Rhodobacter capsulatus*, il y a un autre mécanisme de switch-off indépendant de l'ADP-ribosylation (Förster et al., 1999; Pierrard et al., 1993; Yakunin et Hallenbeck, 1998B; Zhang et al., 1996). En effet, malgré la substitution de l'arginine 101 de NifH d'*A. brasilense* par une tyrosine, l'ajout de NH_4^+ entraîne une réduction rapide de l'activité de la nitrogénase molybdène (Zhang et al., 1996). La même mutation chez *Rhodospirillum rubrum* abolit la répression de l'activité de la nitrogénase molybdène causée par l'azote fixé ou la noirceur. Malgré l'inactivation de *draT* d'*A. brasilense* ou de *draTdraG* de *R. capsulatus*, un effet switch-off incomplet est présent (Förster et al., 1999; Yakunin et Hallenbeck, 1998B; Zhang et al., 1996). Chez *A. brasilense draT*, le pourcentage d'activité de *NifHDK* après l'ajout de NH_4^+ est légèrement plus élevé que chez la souche sauvage. Lorsque DraT et DraG de *R. capsulatus* sont mutées, une plus grande concentration de NH_4^+ est nécessaire pour induire un effet switch-off et une activité résiduelle de la nitrogénase molybdène est observée. L'inhibition de l'activité de *NifHDK* pour une période de 40 minutes requiert $100 \mu\text{M}$ de NH_4Cl pour la souche sauvage et $800 \mu\text{M}$ pour le mutant *draTdraG* (Yakunin et Hallenbeck, 1998B). Outre l'effet switch-off, une autre forme de régulation posttraductionnelle de la nitrogénase molybdène indépendante de l'ADP-ribosylation

existe chez *R. capsulatus*: la réponse magnitude. Lorsque l' α -protéobactérie est cultivée dans un milieu contenant au préalable une quantité d'azote fixé moyennement limitante (7.6 mM de NH_4Cl), l'intensité de l'activité de NifHDK est réduite proportionnellement à la concentration de NH_4^+ supplémentaire ajoutée (Yakunin et Hallenbeck, 1998B). Dans le cadre d'un effet switch-off standard (milieu sans azote fixé), la quantité de NH_4^+ additionnée a un impact sur la durée de l'inhibition de NifHDK mais pas sur sa magnitude. L'exposition d'une culture de *R. capsulatus* à une atmosphère contenant 1% d'oxygène cause aussi l'inactivation totale et réversible de la nitrogénase molybdène (Yakunin et Hallenbeck, 2000). L'ADP-ribosylation de la dinitrogénase réductase n'est pas impliquée dans cette réponse posttraductionnelle à la présence d' O_2 . Chez *A. brasilense*, un diazotrophe fixant l'azote en microaérobie, l'anaérobiose provoque l'ADP-ribosylation de NifH et l'inactivation de la nitrogénase molybdène (Revue par Zhang et al., 1997). Davantage de travail est nécessaire pour bien caractériser la ou les voies de transduction signal couplant la pression partielle en O_2 et l'effet switch-off.

Deux autres modes de régulation posttraductionnelle de la fixation de l'azote ont été identifiés chez les diazotrophes. L'activité de la nitrogénase molybdène de l'archaea *Methanococcus maripaludis* est inhibée de façon réversible par l'attachement direct de NifI₁ et NifI₂ aux sous-unités NifD et NifK de la dinitrogénase (Dodsworth et Leigh, 2006). Les deux protéines NifI compétitionneraient avec NifH pour l'interaction avec NifDK et empêcheraient ainsi le transfert d'électrons (Dodsworth et Leigh 2007). Encodées par l'opéron *nifHI₁I₂DK*, ces deux protéines sont des membres de la famille PII se distinguant par la composition de leur boucle T (Revue par Merrick, 2004). Habituellement, la boucle T contient 18 résidus alors qu'elle de NifI₁ en contient 13 et celle de NifI₂, entre 27 et 32. De plus, il n'y a aucun site conservé pour l'uridylylation ou la phosphorylation de NifI₁ ou de NifI₂ (Les protéines PII des cyanobactéries et de *Clostridium longisporum* sont phosphorylées sur la sérine 49 au lieu d'être uridylylées sur la tyrosine 51) (Revue par Merrick, 2004; Revue par Ninfa et Atkinson, 2000). Ces protéines seraient sujettes à un autre type de modification ou encore elles ne seraient

jamais modifiées. L'attachement de NifI₁ et NifI₂ à NifDK est enrayé par une concentration élevée d' α CG (Dodsworth et Leigh, 2006). *In vivo*, NifI₁ et NifI₂ forment un hétérohexamère. L'ajout d' α CG à une solution contenant le complexe NifI₁I₂ purifié provoque une oligomérisation supplémentaire. Ce phénomène pourrait être à l'origine de la dissociation entre NifDK et NifI₁I₂ (Dodsworth et Leigh, 2006). Chez la cyanobactérie unicellulaire *Gloeotheca*, la dinitrogénase réductase n'est pas ADP-ribosylée mais subit une palmitoylation (Gallon et al., 2000). Cette modification inhibe possiblement l'activité de la nitrogénase molybdène et survient lorsque la culture de *Gloeotheca* est exposée à l'une des conditions suivantes: une forte concentration d'O₂, une haute température, une illumination après 12H de noirceur ou la présence d'une source d'azote fixé (Du et Gallon, 1993; Gallon et al., 2000).

1.2.2.10 DraT et DraG

Protéine monomérique de 30 kDa, DraT (Dinitrogenase Reductase ADP-ribosyl Transferase) catalyse le transfert d'un ADP-ribose provenant d'un NAD⁺ vers la dinitrogénase réductase (Revue par Ludden, 1994; Revue par Nordlund et Ludden, 2004). Cette réaction est inhibée par MgATP et nécessite l'attachement préalable à NifH de MgADP. Un changement conformationnel de la dinitrogénase réductase favorable à l'ADP-ribosylation résulterait de l'interaction entre NifH et MgADP (Revue par Nordlund et Ludden, 2004). Une étude de réticulation des protéines a révélée que NAD⁺ est indispensable pour l'attachement de DraT à NifH (Grunwald et al., 1997). Le résidu arginine 102 de la dinitrogénase réductase n'est pas requis pour la formation du complexe NAD⁺-DraT-NifH mais participerait au clivage du NAD⁺ en ADP-ribose et nicotinamide (Ma et Ludden, 2001). DraG (Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase) brise le lien N-glycosidique formé entre l'ADP-ribose et l'arginine en position 102 (Pope et al., 1986). DraG est une enzyme monomérique de 32 kDa possédant un site actif binucléaire à manganèse (Saari et al., 1984). Contrairement à DraT, DraG est fonctionnelle seulement en présence de MgATP et de Mn²⁺. De plus, le substrat de DraG est la forme réduite de la

dinitrogénase réductase alors que DraT modifie exclusivement la forme oxydée (Halbleib et al., 2000). DraG et DraT sont exprimées en très petite quantité de façon constitutive à partir de l'opéron *draTG* chez *Rhodobacter capsulatus* ou de l'opéron *draTGB* chez *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum brasilense* et *Azospirillum lipoferum* (Fitzmaurice et al., 1989; Masepohl et al., 1993; Triplett et al., 1982; revue par Zhang et al., 1997). Outre le fait que l'insertion d'une cassette kanamycine dans *draB* entraîne une légère réduction de l'activité de DraG, le rôle de ce cadre de lecture est inconnu (Liang et al., 1991).

L'ajout de 5mM de NAD^+ à une culture de *Rhodospirillum rubrum* sans source d'azote fixé provoque l'ADP-ribosylation par DraT de NifH (Norén et al., 1997; Soliman et Nordlund, 1992). Puisque le réservoir intracellulaire de NAD(P)^+ est oxydé suite à l'addition de NH_4^+ ou de glutamine, l'équipe de recherche de Nordlund a suggéré que l'activité de DraT est principalement régulée par la disponibilité du NAD^+ (Norén et Nordlund, 1994). Cette oxydation est causée en grande partie par la glutamate synthase qui, en présence de NH_4^+ , produit du glutamate et du NADP^+ à partir de la glutamine, de l' αCG et du NADPH . Ensuite, la transhydrogénase utilise le gradient transmembranaire de protons pour réduire le NADP^+ à partir du NADH , accentuant ainsi la concentration de NAD^+ (Williams et al., 1994). Chez *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* et *Azospirillum rubrum* la séquestration membranaire de DraG par l'entremise de protéines des familles PII et Amt serait le mode de régulation capitale de l'activité de cette enzyme (Huergo et al., 2006A; Wang et al., 2005). Dans un extrait cellulaire de *R. rubrum*, DraG est toujours retrouvée dans la fraction membranaire et est relâchée en ajoutant 0,5 M de NaCl ou 10 mM de MgGDP (Norén et Nordlund, 1997). L'hydrolyse du GTP jouerait un rôle dans la séquestration membranaire de DraG. Puisque l'association de DraG avec la membrane est indépendante de la présence de NH_4^+ dans le milieu, la noirceur après la lyse des cellules est probablement le signal responsable de cette localisation. Lorsque *glnJ* et/ou *amtB1* sont délétés, une fraction importante du pool de DraG se retrouve dans le cytoplasme (Wang et al., 2005). *R. rubrum* possède deux transporteurs de NH_4^+ et trois protéines PII encodées sur les

opérons *glnJamtB1*, *glnKamtB2* et *glnBA*. La délétion de GlnB et/ou GlnJ réduit considérablement l'effet switch-off déclenché par le NH_4^+ ou la noirceur (Zhang et al., 2001). L'absence d'AmtB1 altère aussi l'effet switch-off provoqué par les deux stimuli (Zhang et al., 2006). Autre argument en faveur de la formation d'un complexe régulateur DraG-GlnJ-AmtB1, des expériences de fractionnement cellulaire ont révélé que GlnJ est séquestrée par la membrane de manière AmtB1-dépendante préférentiellement à GlnB et GlnK après un choc NH_4^+ ou 60 minutes de noirceur (Wolfe et al., 2007; Zhang et al., 2006). Chez *Rhodobacter capsulatus*, l'inactivation d'*amtB*, de *glnB* ou de *glnK* abolit la régulation posttraductionnelle ADP-ribosylation-dépendante et -indépendante de la nitrogénase molybdène (Drepper et al., 2003; Tremblay et al., 2007; Yakunin et al., 2002). 15 minutes après l'ajout de 1 mM de NH_4Cl , GlnK et dans une moindre mesure, GlnB, sont capturées par la membrane de manière AmtB-dépendante (Tremblay et al., 2007). Contrairement à *R. rubrum*, AmtB n'est pas impliquée dans l'effet switch-off induit par la noirceur et GlnK/GlnB demeurent dans le cytoplasme 30 minutes après la privation de lumière (Tremblay et al., 2007; Yakunin et Hallenbeck, 2002).

La voie de transduction du signal impliquant les protéines PII, AmtB, DraG et DraT a été davantage caractérisée chez *Azospirillum brasilense* (voir figure 17). Dans ce cas, l'addition de 200 μM de NH_4Cl entraîne une augmentation rapide de la quantité de DraG, de GlnZ et de GlnB retrouvée dans la fraction membranaire (Huergo et al., 2006A). La séquestration de DraG est abolie dans des mutants *glnB*, *glnZ* ou *amtB*. Une expérience de «Pull-Down» a démontré une interaction forte entre GlnZ et HisDraG et une interaction plus faible entre GlnZ-UMP et HisDraG (Huergo et al., 2006B). Puisque chez un mutant *glnZ* la reprise de la fixation de l'azote après l'épuisement du NH_4^+ prend 8 fois plus de temps et ne représente que 20 à 40% de ce qui est observé chez la souche sauvage, l'attachement de GlnZ-UMP à DraG stimulerait la nitrogénase molybdène (Klassen et al., 2001). Récemment, la formation d'un complexe ternaire AmtB-GlnZ-DraG avec une stoechiométrie 1:1:1 a été démontrée *in vitro* (Huergo et al., 2007).

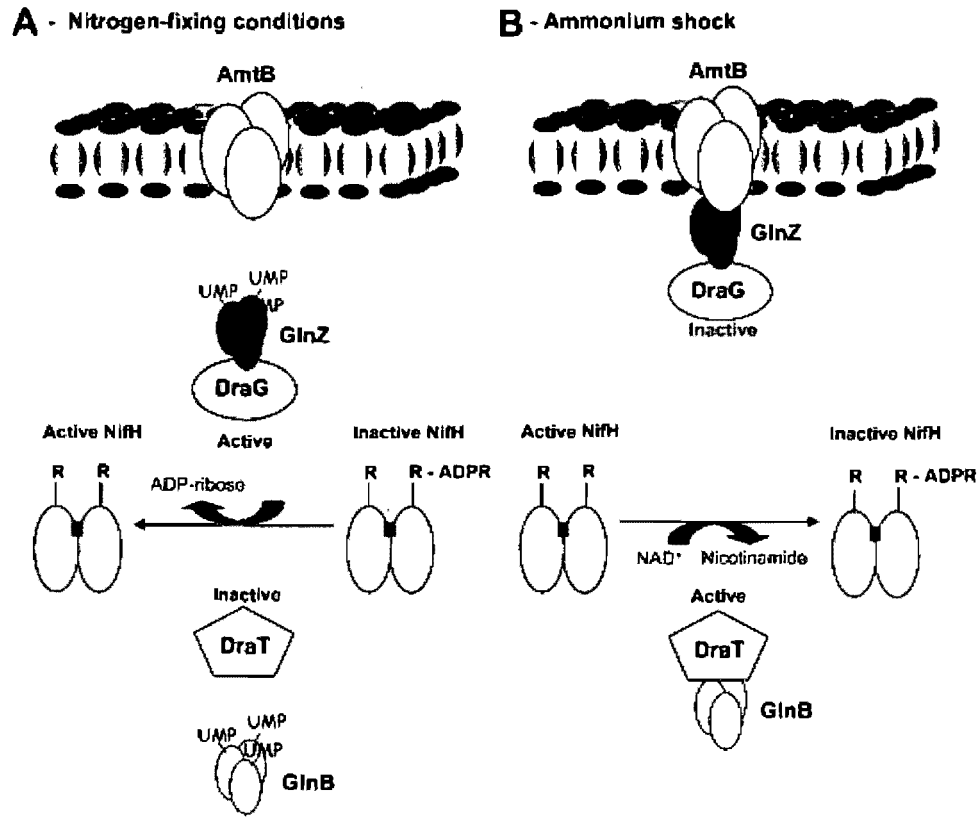


Figure 17. Modèle de la régulation de l'activité de DraT et de DraG d'*Azospirillum brasilense* en réponse à un choc NH_4^+ . (Figure tirée de Huergo et al., 2006B).

L'interaction entre GlnZ et DraG est favorisée par la présence de 3.5 mM d'ADP. Au contraire, l'ajout de 3.5 mM d'ATP ou de 2 mM d' α CG facilite la dissociation du complexe GlnZ-DraG. La combinaison de ces deux effecteurs entraîne une dissociation encore plus forte (Huergo et al., 2007). Sachant que l'ajout de NH_4^+ provoque une réduction rapide de 10 fois du réservoir intracellulaire d'ATP (Schutt et Holzer, 1972) et la consommation de l' α CG par la glutamine synthétase, l'ADP, l'ATP et l' α CG jouent probablement un rôle clé dans la régulation de la séquestration de DraG par AmtB-GlnZ. L'interaction entre les protéines PII et les protéines Amt est aussi influencée par les effecteurs mentionnés ci-haut. Ce phénomène fera l'objet de la section 2.4 dans la deuxième partie de cette revue de

littérature. Quant à HisDraT, il interagit avec la forme déuridylylée de GlnB (Huergo et al., 2006B). L'insertion d'une cassette kanamycine dans *glnB* atténue considérablement l'effet switch-off induit par l'ajout de 200 uM de NH_4Cl (Klassen et al., 2005). La formation du complexe GlnB/DraT résulterait en l'activation de DraT. Des expériences de systèmes levures à deux hybrides chez d'autres bactéries pourpres sulfureuses ont aussi illustré le lien étroit existant entre DraT et les protéines PII. GlnB de *R. rubrum* et GlnB/GlnK de *R. capsulatus* interagissent avec DraT (voir figure 16) (Pawlowski et al., 2003; Zhu et al., 2006). D'ailleurs, la réduction de cette interaction lorsque GlnB de *R. rubrum* est mutée de façon à imiter la forme uridylylée même en présence de NH_4^+ démontre la préférence de DraT pour la forme déuridylylée (Zhu et al., 2006).

1.2.2.11 Autres mécanismes d'ADP-ribosylation

La séquence en acides aminés de DraT présente des similarités avec une famille de toxines retrouvée chez différents pathogènes bactériens (voir tableau III) (Revue par Nordlund et Ludden, 2004). Toutes ces enzymes procèdent à l'ADP-ribosylation de protéines de l'hôte en hydrolysant une molécule de NAD^+ . Par exemple, CT de *Vibrio cholerae* ADP-ribosyle un résidu arginine de $\text{G}_{\text{S}\alpha}$, une protéine G stimulant l'adénylate cyclase (Revue par Holbourn et al., 2006). Ainsi, $\text{G}_{\text{S}\alpha}$ est maintenue dans sa forme active ($\text{G}_{\text{S}\alpha}\text{-GTP}$) et entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique (Galloway et al., 1987). Éventuellement, la quantité anormale d'AMPc provoque une perte de fluide et d'ions des cellules intestinales affectées. DT de *Corynebacterium diphtheriae* ADP-ribosyle un résidu diphtamide d'eEF2 (eukaryotic Elongation Factor 2) et inactive irréversiblement ce facteur d'élongation des protéines. Ce faisant, DT interfère avec la synthèse protéique et génère des changements physiologiques importants pouvant conduire à la mort cellulaire (Revue par Holbourne et al., 2006). La première étape du mécanisme catalytique de ces toxines consiste à l'attachement de NAD^+ au site actif dans une orientation qui facilitera l'hydrolyse du lien glycosidique entre l'ADP-ribose et le nicotinamide. En effet, un résidu glutamate conservé chez toutes les

toxines ADP-ribosylantes et chez DraT (position 259 dans DraT de *Rhodobacter capsulatus*) forme un lien hydrogène avec le 2'-OH du ribose et stabilise un cation oxocarbenium. Subséquemment, cet intermédiaire sera attaqué par un nucléophile; de l'eau dans le cas d'une auto-hydrolyse ou le substrat protéique lui-même. Une autre glutamate ou une glutamine conservées (glutamate 257 dans le cas de DraT de *R. capsulatus*) est retrouvée deux acides aminés en amont du glutamate catalytique. L'identité de ce résidu joue un rôle dans la spécificité du substrat. Chez les eucaryotes, il y a deux types d'ADP-ribosyltransférases présentant des homologies avec les toxines ADP-ribosylantes bactériennes: les poly-ADP-ribose polymérase catalysant une poly-ADP-ribosylation et les ecto-ADP-ribosyltransférases responsables d'une mono-ADP-ribosylation (Revue par Corda et Di Girolamo, 2003; Revue par Schreiber et al., 2006). En fait de structure, les ecto-ADP-ribosyltransférases ressemblent davantage au ADP-ribosyltransférases procaryotiques qu'aux poly-ADP-ribose polymérase. La poly-ADP-ribosylation est impliquée dans la réparation d'une cassure des brins d'ADN, dans la modulation de la structure de la chromatine et dans la division cellulaire. De son côté, la mono-ADP-ribosylation eucaryotique participe, entre autre, à la prolifération des lymphocytes T et à l'adhésion cellulaire (Revue par Corda et Di Girolamo, 2003; Revue par Schreiber et al., 2006).

Toxin	Organism	PDB ID	Class	Target	Effects
Pertussis toxin	<i>Bordetella pertussis</i>	1PRT	AB _s	Cysteine on G _i , G _t and G _s	- Uncoupling of effector from the adenylyate cyclase pathway
Cholera toxin	<i>Vibrio cholerae</i>	1XTC	AB _s	Arg on G _s	- Trapping of G-protein in GTP bound states and uncontrolled up-regulation of adenylyate cyclase
<i>E. coli</i> heat labile enterotoxin	<i>Escherichia coli</i>	1LTS	AB _s	Arg on G _s	- Trapping of G-protein in GTP bound states and uncontrolled up-regulation of adenylyate cyclase
Diphtheria toxin	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1TOX	AB three domain	Diphthamide on eEF2	- Inhibition of protein synthesis
<i>Pseudomonas</i> exotoxin A VIP2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1AER	AB three domain	Diphthamide on eEF2	- Inhibition of protein synthesis
	<i>Bacillus cereus</i>	1QS1	AB binary toxin	Arg177 on actin	- Prevent actin polymerization
Iota toxin	<i>Clostridium perfringens</i>	1GIQ	AB binary toxin	Arg177 on actin	- Prevent actin polymerization
C3bot	<i>Clostridium botulinum</i>	1G24	Single polypeptide	Asn41 on Rho A-C	- Trap Rho GTPase in GDP bound state and leads to disaggregation of actin cytoskeleton
C3stau	<i>Staphylococcus aureus</i>	1OJZ	Single polypeptide	Asn41 on Rho A-C, RhoE and Rnd3	- Trap Rho GTPase in GDP bound state and leads to disaggregation of actin cytoskeleton
Ecto-ART2	Rat	1OG1	Single polypeptide	Arg residue on integrins	- Cell regulation and role in apoptosis

Tableau III. Cibles et effets physiologiques de différentes toxines ADP-ribosylantes. (Tableau tiré de Holbourn et al., 2006).

2. La famille de protéines Amt/Mep/Rh

Les membranes biologiques sont perméables au NH₃ sous sa forme libre de gaz hydrophobe. À un pH physiologique de 7.5, 99% des molécules de NH₃ (pK_a = 9.25) deviennent des cations NH₄⁺. Puisque les membranes biologiques ne permettent pas la diffusion du NH₄⁺, la nature a mis au point un processus de transport

impliquant des protéines membranaires de la famille Amt/Mep/Rh (Ammonium transport/Methylammonium permease/Rhesus proteins) (Revue par Andrade et Einsle, 2007). Chez *Escherichia coli*, la diffusion passive est suffisante pour la croissance optimale à un pH de 7 lorsque la concentration en NH_4^+ est supérieure à 10 μM (Soupene et al., 1998). En bas de ce seuil, le transporteur de NH_4^+ AmtB est essentiel au maintien d'un temps de doublement normal. À un pH de 5, la concentration minimale de NH_4^+ requise pour la croissance optimale d'un mutant *amtB* passe à 5 mM. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la survie cellulaire est compromise à un pH de 6.1 et à une concentration en NH_4^+ inférieure à 5 mM lorsque les gènes codant pour les trois transporteurs de NH_4^+ , Mep1, Mep2 et Mep3 sont délétés (Marini et al., 1997). Généralement exprimées lorsque le NH_4^+ est faiblement concentré dans le milieu, les protéines Amt des bactéries sont aussi impliquées dans un phénomène appelé la rétention cyclique (Kleiner, 1985). Compte tenu du gradient de concentration, les cellules excrètent par diffusion passive du NH_3 . Chez les procaryotes fixateurs d'azote, cette fuite de NH_3 est synonyme d'une perte d'énergie importante puisque la production de la nitrogénase est gaspillée. Les protéines Amt servent donc à réimporter le NH_3 provenant à l'origine de l'intérieur de la bactérie (Revue par Andrade et Einsle, 2007; Kleiner, 1985; Yakunin et Hallenbeck, 2002).

Les protéines de la famille Amt/Mep/Rh sont présentes chez la plupart des eucaryotes et procaryotes dont le génome a été séquencé jusqu'à maintenant. Les quelques exceptions qui échappent à cette règle sont soit spécialisées dans l'utilisation d'une source d'azote spécifique tel que l'urée dans le cas d'*Helicobacter pylori*, soit obligées de croître dans un environnement riche en azote fixé comme les parasites eucaryotes *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei* (Revue par Ludewig et al., 2007). Chez les bactéries, archaea, plantes, champignons et invertébrés, les protéines responsables du transport du NH_4^+ sont généralement nommées Amt. Tel que mentionné précédemment, les mêmes protéines portent le nom de Mep chez les levures. Les homologues de cette famille chez les vertébrés et certains invertébrés s'appellent Rh. Dans le dernier cas, le substrat n'est pas

nécessairement le $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ et pourrait être le CO_2 (Revue par Peng et Huang, 2006). À travers les trois domaines de la vie, plusieurs organismes possèdent plus d'un homologue de la famille Amt/Mep/Rh: par exemple Amt1, Amt2 et Amt3 d'*Archaeoglobus fulgidus*, AmtB et AmtY de *Rhodobacter capsulatus*, LeAmt1;1, LeAmt1;2 et LeAmt1;3 de la tomate, ou encore, RhAG, RhBG et RhCG de l'humain. L'ancêtre commun des gènes *amt/mep* et *Rh* se trouverait chez les archaea. Les protéines Amt/Mep et Rh présentent entre 20% et 25% d'identité. Tôt dans l'histoire naturelle, *amt/mep* et *rh* ont été séparés et ont évolué indépendamment (Voir figure 18) (Huang et Peng, 2005; Revue par Peng et Huang, 2006). Des membres des sous-familles *amt/mep* et *rh* coexistent seulement chez certains protozoaires (Ex.: *amtA*, *amtB*, *amtC*, *rhAG* et *rhBG* de *Dictyostelium discoideum*) et chez certains invertébrés (Ex.: *Ci-AMT1a*, *Ci-AMT1b*, *rhAG*, *rhBG* et *rhCG* de *Ciona intestinalis*).

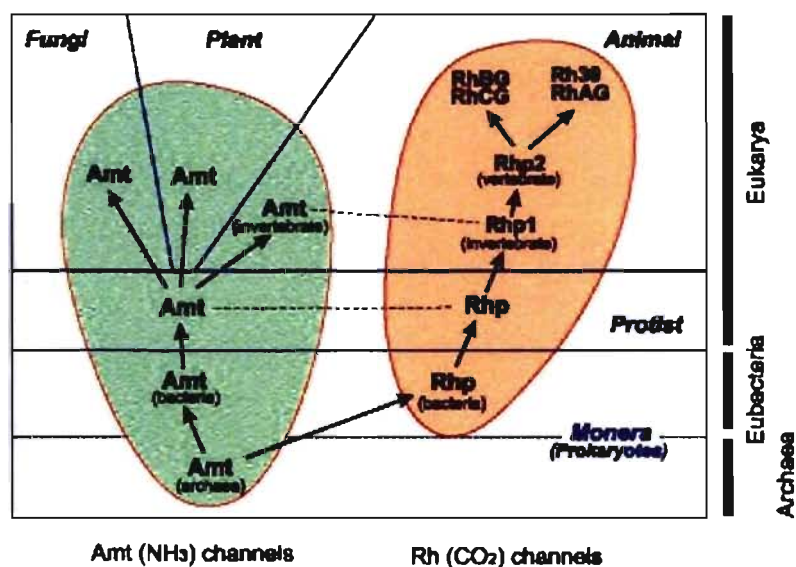


Figure 18. Évolution des protéines Amt et Rh et distribution des gènes codant pour celles-ci dans les trois royaumes de la vie. Légende: ligne hachurée = coexistence d'Amt et de Rh chez certains protozoaires et chez certains invertébrés. (Figure tirée de Peng et Huang, 2006).

2.1 Structure des protéines Amt/Mep

Les gènes *amt/mep* codent pour des polypeptides de 400 à 500 acides aminés possédant 11 ou 12 hélices α transmembranaires (Revue par Andrade et Einsle, 2007). Les protéines de cette famille sont organisées en homotrimères insérés dans la membrane plasmique (Blakey et al., 2002; Conroy et al., 2004). Par contre, l'hétérotrimérisation entre deux membres de la famille Amt/Mep a déjà été observée entre LeAmt1;1 et LeAmt1;2 de la tomate (Ludewig et al., 2003). Chez les bactéries Gram-, la localisation adéquate des protéines Amt nécessite un peptide signal qui sera clivé ultérieurement (Thornton et al., 2006). Ce peptide signal n'existe pas chez les bactéries Gram+. La structure tertiaire d'AmtB d'*Escherichia coli* et d'Amt-1 d'*Archeoglobus fulgidus* a été résolue par cristallographie (Andrade et al., 2005; Khademi et al., 2004; Zheng et al., 2004). Les deux protéines sont pourvues de 11 hélices transmembranaires (TM) avec une extrémité N-terminale orientée vers l'extérieur de la membrane plasmique et une extrémité C-terminale orientée vers l'intérieur. Le groupe d'hélices TM 1 à 5 et le groupe d'hélices TM 6 à 10 sont quasi-symétriques (Voir figure 19). Cet arrangement spatial serait le résultat d'une duplication du gène *amt* tôt dans l'évolution (Gruswitz et al., 2007). La onzième hélice, d'une longueur de 48 Å, traverse de part en part les deux clusters d'hélices.

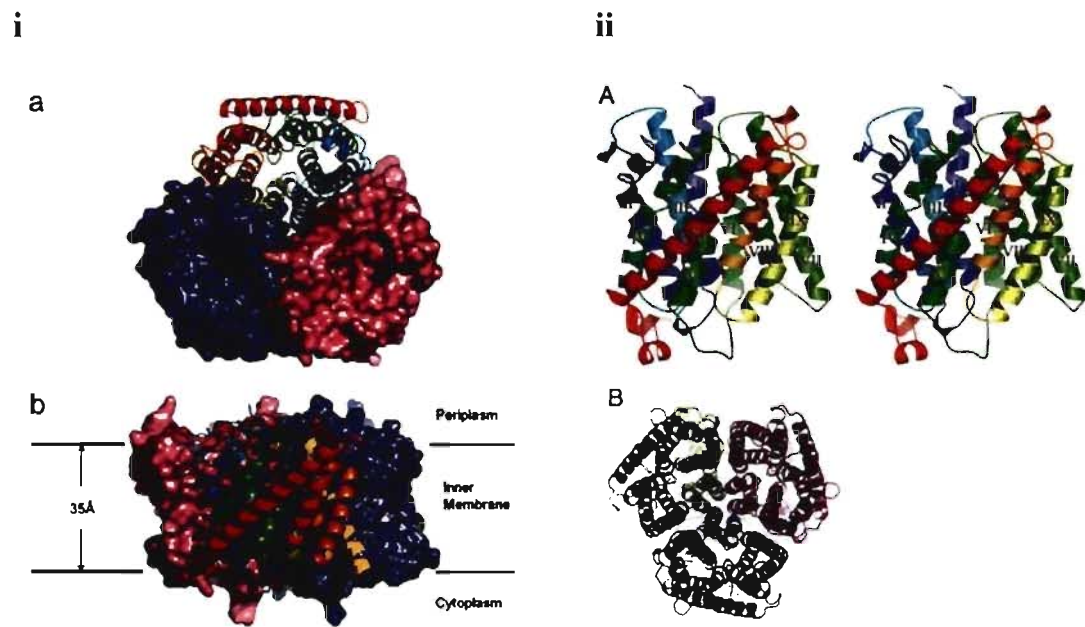


Figure 19. i. Structure de l'homotrimère AmtB d'*Escherichia coli*. **a.** vue de la surface périplasmique. **b.** Vue de profile. Légende: ruban bleu foncé = N-terminal; ruban rouge = C-terminal. **ii. Structure de l'homotrimère Amt-1 d'*Archeoglobus fulgidus*.** **a.** représentation stéréo du monomère Amt-1. Légende: ruban bleu-gris = N-terminal; ruban rouge = C-terminal **b.** Vue de la surface périplasmique de l'homotrimère Amt-1. (Figure modifiée à partir d'Andrade et al., 2005 et de Zheng et al., 2004).

Chaque sous-unité de l'homotrimère Amt possède un pore hydrophobe de 20 Å qui passe entre les groupes d'hélices TM 1 à 5 et TM 6 à 10 (voir figure 20). L'embouchure périplasmique de ce pore est bloquée par deux résidus phénylalanine conservés (F107 et F215 d'AmtB d'*Escherichia coli*; F131 et F240 d'AmtB de *Rhodobacter capsulatus*) (voir figure 20). Par conséquent, le transport du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ nécessite un réarrangement de la protéine (Revue par Andrade et Einsle, 2007). La substitution de F215 par une alanine dans AmtB d'*E. coli* abolit le transport du ^{14}C -méthylammonium alors que la mutation F107A l'augmente légèrement (Le ^{14}C -méthylammonium est un substrat non-physiologique des protéines Amt/Mep/Rh plus facile à quantifier, à détecter et à manipuler que le $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) (Javelle et al., 2008). Un site de recrutement potentiel pour le NH_4^+ constitué, entre autre, de trois résidus

aromatiques et d'une sérine (F103, F107, W148 et S219 d'AmtB d'*E. coli*; F127, F131, W172 et S244 d'AmtB de *R. capsulatus*) est situé au creux d'une dépression à la surface périplasmique d'Amt (voir figure 20). Le NH_4^+ formerait un lien hydrogène avec l'O γ de la sérine 219 et s'engagerait dans une interaction cation- π avec l'indole du tryptophane 148 (Revue par Andrade et Einsle, 2007; Liu et Hu, 2006; Khademi et al., 2004; Nygaard et al., 2006; Zheng et al., 2004). Récemment, Fong et al. (2007) ont démontré qu'un mutant AmtB W148L d'*E. coli* accumulent 10 à 20 fois plus de ^{14}C -méthylammonium qu'AmtB sauvage. Ce résultat remet en question le rôle de W148 dans le vestibule de recrutement sélectif pour le NH_4^+ et la pertinence de ce dernier. La mutation W148L élargirait l'entrée périplasmique du pore. Ce faisant, la pénétration du (méthyl)ammonium et des analogues plus larges, le diméthylammonium et l'éthylammonium, serait facilitée (Fong et al., 2007). La triple substitution de trois résidus du site de recrutement pour le NH_4^+ , F107A, W148A et S219A, entraîne une légère augmentation de l'activité transport du ^{14}C -méthylammonium (Javelle et al., 2008). Contrairement à AmtB sauvage, le transport du méthylammonium par ce variant n'est pratiquement pas inhibé par le thallium, une molécule qui compétitionne avec le NH_4^+ pour l'attachement aux sites protéiques le recrutant (Liaw et al., 1995). Javelle et al. (2008) en concluent, à l'inverse de Fong et al. (2007), que W148 en compagnie de F107 et S219 sont réellement des composantes d'un site de recrutement. Ils expliquent l'augmentation de l'activité transport causée par la triple substitution ou par la substitution simple de W148 par la possibilité que lorsque la concentration de méthylammonium est saturante pour AmtB, la dissociation entre le substrat et son site initial d'attachement est une étape limitante. Une simulation de dynamique moléculaire a mis en évidence d'autres résidus interagissant possiblement avec le NH_4^+ du côté périplasmique d'Amt (Nygaard et al., 2006). Un résidu alanine conservé (A162 d'AmtB d'*E. coli*; A187 d'AmtB de *R. capsulatus*) guiderait la translocation du NH_4^+ dans le lumen du pore. L'aspartate conservé en position 160 dans AmtB d'*E. coli* (D185 d'AmtB de *R. capsulatus*) jouerait soit un rôle structurel dans le vestibule de recrutement (Khademi et al., 2004; Zheng et al., 2004) ou encore, suite à un réarrangement de ce vestibule

induit par l'entrée du NH_4^+ , deviendrait l'accepteur final d'un proton provenant du substrat (Nygaard et al., 2006).

À l'intérieur du pore hydrophobe, l'on retrouve deux résidus histidines conservés (H168 et H318 d'AmtB d'*E. coli*; H193 et H342 d'AmtB de *R. capsulatus*) attachés par un lien hydrogène entre les atomes N_δ de leur anneau imidazole (voir figure 20). La substitution de l'un de ces deux résidus histidines abolit le transport de 14C-méthylammonium par AmtB d'*E. coli* (Javelle et al., 2006). Ces histidines pourrait être des accepteurs de protons ou des agents de faible stabilisation entre le substrat et le transporteur par l'entremise de liens hydrogène (Bostick et Brooks, 2007; Javelle et al., 2006; Khademi et al., 2004; Zheng et al., 2004). Au niveau de l'entrée cytoplasmique du pore hydrophobe, le groupe carboxylate de l'aspartate 313 d'AmtB d'*E. coli* (D338 d'AmtB de *Rhodobacter capsulatus*) pourraient participer au don d'un proton au substrat après son passage à travers la membrane (Khademi et al., 2004; Nygaard et al., 2006).

De longueur variable, la queue C-terminale cytoplasmique est constituée d'une région de 22 acides aminés conservés à travers la famille Amt/Mep/Rh. La délétion complète de la queue C-terminale d'AmtB d'*E. coli* réduit de 70% l'accumulation du 14C-méthylammonium et prévient l'interaction entre AmtB et GlnK (Coutts et al., 2002). De plus, la délétion des deux derniers acides aminés est suffisante pour diminuer radicalement l'activité transport d'AmtB et pour abolir la séquestration de GlnK (Severi et al., 2007). La résolution par cristallographie du complexe GlnK-AmtB a permis d'identifier le rôle structural de la queue C-terminale puisque celle-ci est désordonnée lorsque la structure d'AmtB seule est étudiée (Conroy et al., 2007; Khademi et al., 2004; Zheng et al., 2004). Les boucles cytoplasmiques situées entre les hélices TM 1-2, 3-4 et 5-6 interagissent avec la queue C-terminale (voir figure 21) (Conroy et al., 2007). De plus, les 6 derniers acides aminés de la queue C-terminale forment une partie de la paroi de la sortie cytoplasmique du pore de la sous-unité AmtB adjacente en interagissant avec l'hélice TM 1 et les boucles M5-M6 et M7-M8.

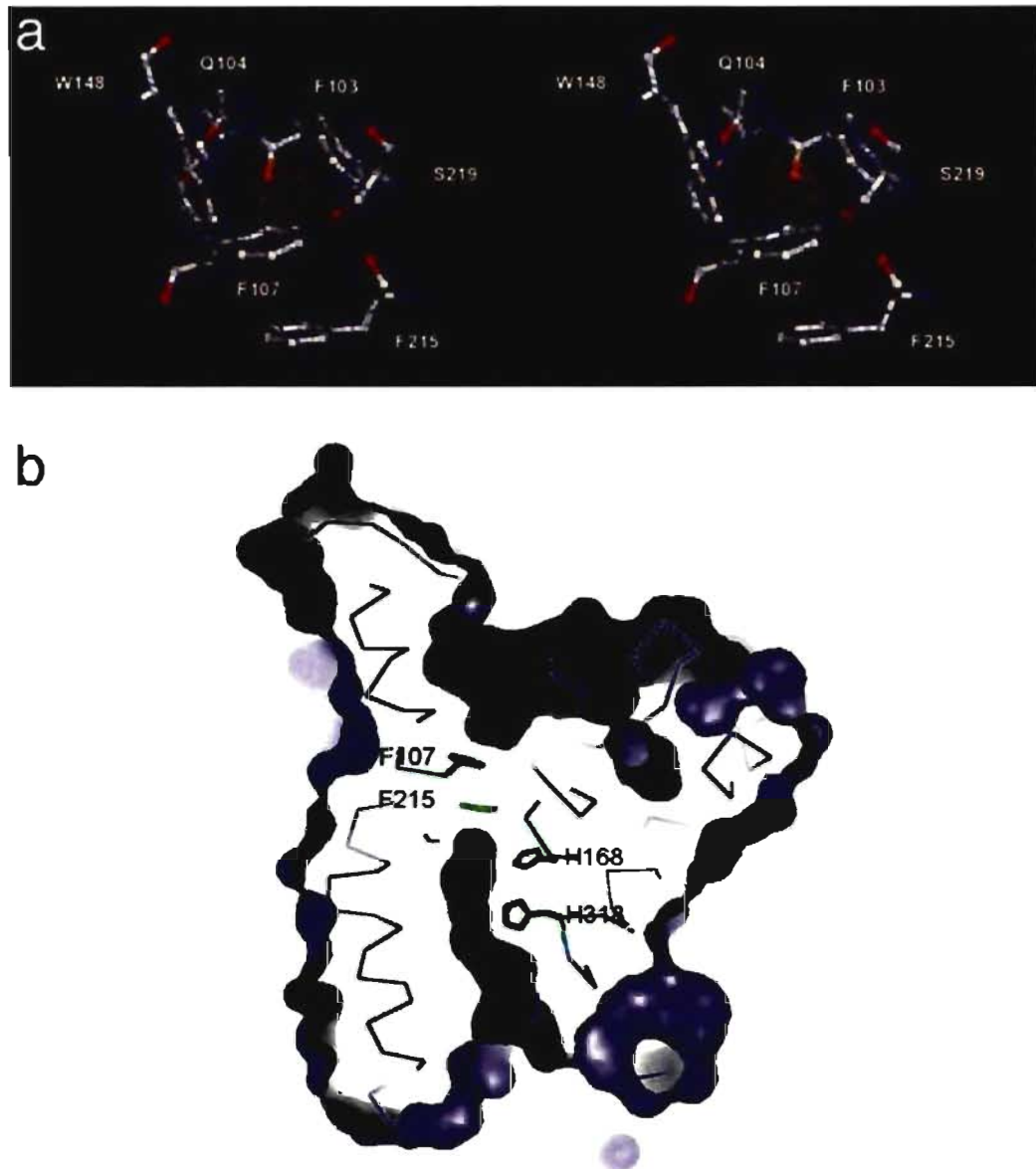


Figure 20. Structure du site de recrutement périplasmique du NH_4^+ et du pore hydrophobe d'AmtB d'*Escherichia coli*. a. représentation stéréo du site de recrutement périplasmique du NH_4^+ . b. coupe du monomère AmtB dans le plan de la membrane plasmique. Légende: forme noire allongée au centre = pore hydrophobe. (Figure tirée de Zheng et al., 2004).

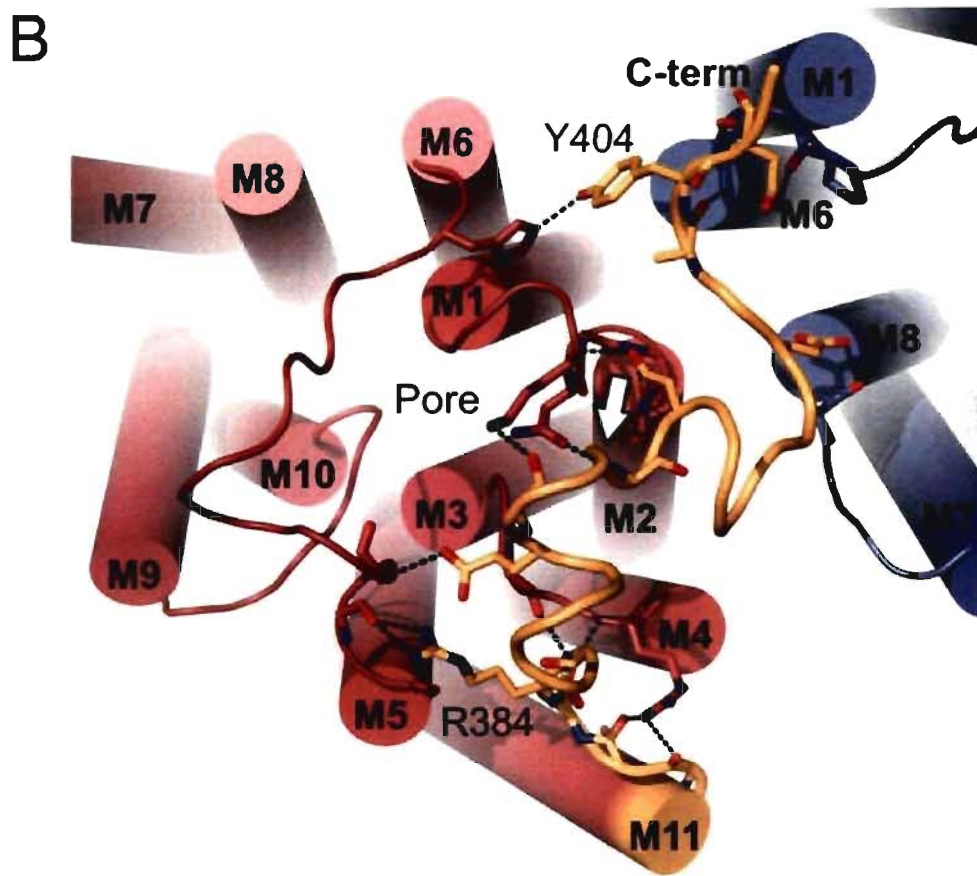


Figure 21. Interactions de la queue C-terminale cytoplasmique d'un monomère AmtB d'*Escherichia coli* avec la sous-unité adjacente. Légende: jaune = queue C-terminale cytoplasmique. (Figure tirée de Conroy et al., 2007).

2.2 Identité du substrat: le NH_3 ou le NH_4^+ ?

Les fonctions potentielles d'éléments structuraux d'Amt évoquées dans la section précédente sont basées sur un modèle de transport où le NH_4^+ est déprotoné avant de pénétrer dans le pore (par D160?) ou à l'intérieur de celui-ci (par H168 et/ou H318? ou par la région autour de F215?). Subséquemment, le NH_3 chemine à travers le pore jusqu'à la sortie cytoplasmique où il serait reproté (par D313?) (voir figure 22). Outre la nature hydrophobique du pore et le peu de variabilité de la structure d'Amt en présence ou non du substrat, d'autres arguments supportent ce modèle dans lequel les protéines Amt sont considérées comme des canaux NH_3 (Revue par

Andrade et Einsle, 2007; Revue par Winkler, 2006). L'ajout de NH_4^+ à un milieu contenant AmtB purifiée d'*E. coli* reconstituée en protéoliposomes entraîne l'augmentation du pH à l'intérieur de ces structures (Khademi et al., 2004). Il est possible que la reprotonation du NH_3 après son entrée dans le protéoliposome soit responsable de l'élévation du pH. Des expériences d'accumulation de ^{14}C -méthylammonium effectuées par Javelle et al. (2005) ont révélées qu'AmtB d'*E. coli* nécessite une énergie d'activation (E_a) de $1.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ caractéristique des canaux comme les aquaporines (E_a de $<5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour les canaux comparativement à une E_a entre 11 et $27 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour les transporteurs). Quoique appuyé par une littérature abondante, ce modèle exclusif aux protéines Amt des bactéries est loin de faire l'unanimité. En effet, un groupe de chercheurs pensent que le NH_4^+ passe directement à travers le pore hydrophobe. L'argument massue en faveur de ce mécanisme de transport est l'abolition par l'ajout du protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) de l'accumulation du ^{14}C -méthylammonium par AmtB W148L d'*E. coli* (Fong et al., 2007). Un résultat similaire a été obtenu avec AmtA sauvage de *Corynebacterium glutamicum*, une bactérie Gram + du sol (Meier-Wagner et al., 2001; Siewe et al. 1996; Walter et al., 2008). Par conséquent, l'activité d'Amt serait dépendante de la force proton motrice. Quant aux protéines Amt des plantes, elles transporteraient l'espèce chargée puisque l'ajout de NH_4^+ à des concentrations de l'ordre du μM à une solution contenant des oocytes de *Xenopus* exprimant LeAMT1;1 de la tomate résulte en l'apparition d'un courant ionique dirigé vers l'intérieur de la cellule (voir figure 22) (Ludewig et al., 2002). Une autre étude a révélée qu'il y a acidification intracellulaire de ces oocytes exprimant LeAMT1;1 lorsque le ^{14}C -méthylammonium est importé (Mayer et al., 2006).

L'hypothèse de la conductance passive du NH_3 pose un problème bioénergétique fondamental. À cause de la reprotonation du NH_3 à l'intérieur de la cellule, il y a un phénomène d'alcalinisation et d'exportation nette d'un H^+ à travers la membrane plasmique contre le gradient de proton nécessaire pour la conservation d'énergie (voir figure 23) (Revue par Andrade et Einsle, 2007; Revue par Khademi et Stroud, 2006). Ainsi, la conductance passive du NH_3 prend des allures de système

antiport NH_4^+/H^+ . Dans ces conditions, la direction du transport s'inverserait et le gradient de proton entraînerait la sortie du NH_3 de la cellule. Dans une revue de littérature publiée en 2007, Andrade et Einsle ont proposé une alternative pour expliquer les contradictions dans les résultats proposés par diverses équipes de recherche: le transport du NH_3 combiné à un symport de H^+ (voir figure 23). Si tel est le cas, en absence d'une force proton motrice (Ex.: protéoliposome exprimant AmtB d'*E. coli* décrit par Khademi et al. (2004)), une conductance passive du NH_3 serait observée. Au contraire, en présence d'une force proton motrice, un transport électrogénique secondaire serait détecté (Ex.: présence d'un courant ionique après l'ajout de NH_4^+ à une solution contenant des oocytes de *Xenopus* exprimant LeAmt1;1 de la tomate tel que décrit par Ludewig et al. (2002)).

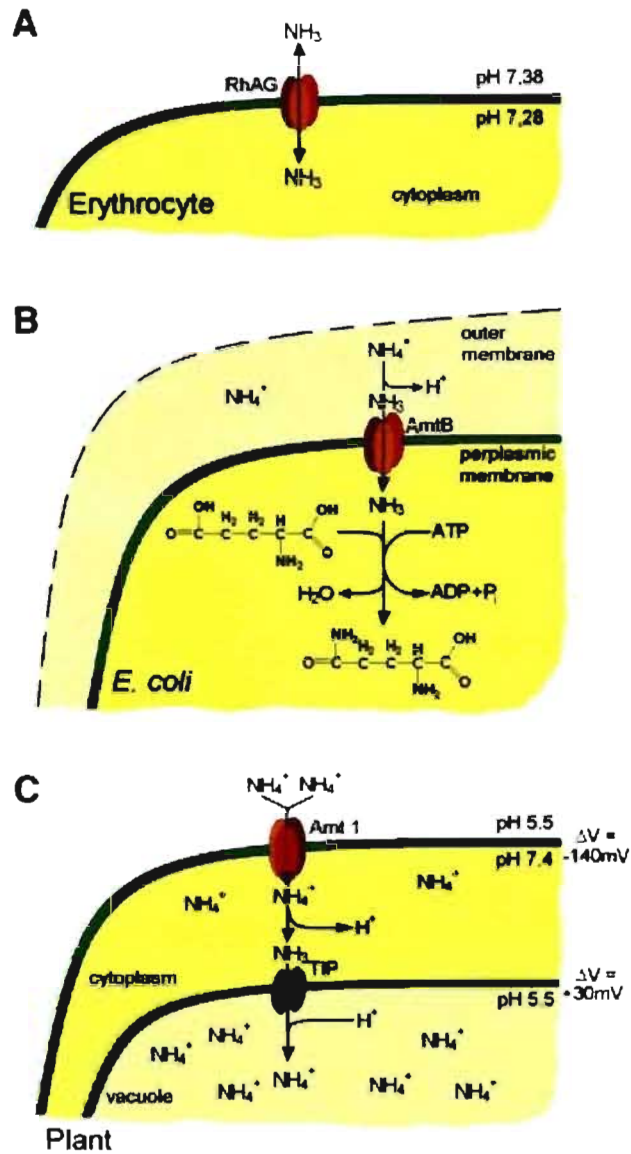


Figure 22. Mécanismes de transport associés aux protéines Amt/Rh. **a.** facilitation bidirectionnelle du passage du NH₃ par RhAG des érythrocytes humains. **b.** facilitation du passage du NH₃ par AmtB d'*Escherichia coli* et capture métabolique subséquente. **c.** transport du NH₄⁺ par Amt1 d'*Arabidopsis thaliana* suivi du transfert du NH₃ à travers le tonoplaste probablement effectué par les aquaporines TIP2. (Figure tirée de Ludewig et al., 2007).

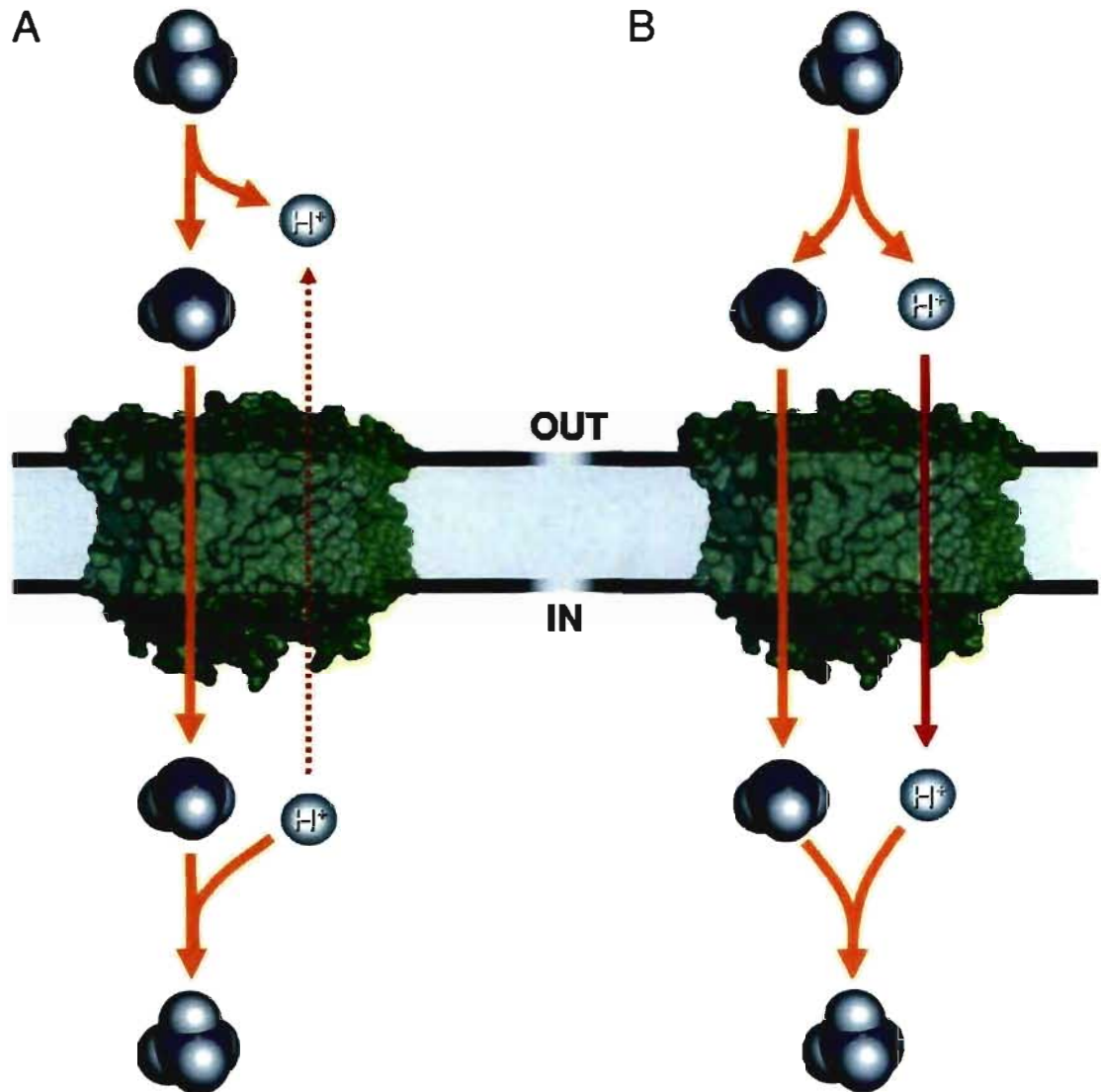


Figure 23. Transport du NH_4^+ par AmtB d'*Escherichia coli*. **a.** Le mécanisme de déprotonation extracytoplasmique/reprotonation cytoplasmique du NH_4^+ est *de facto* un système antiport NH_4^+/H^+ . **b.** Un système symport NH_3/H^+ est l'alternative proposée par Andrade et Einsle (2007) pour expliquer les contradictions expérimentales. (Figure tirée d'Andrade et Einsle, 2007).

2.3 Les protéines Rhesus (Rh)

Les protéines Rh de l'humain ont d'abord été étudiées à cause de leur importance dans la transfusion du sang puisqu'elles définissent la négativité ou la positivité du groupe sanguin. Les antigènes Rh présents à la surface des globules rouges sont portés par deux protéines membranaires de 30 kDa, RhD et RhCE (sous-famille Rh30). Les érythrocytes possèdent aussi une glycoprotéine membranaire de 50 kDa de la famille Rh, RhAG (Rhesus Associated Glycoprotein; sous-famille Rh50). Deux homologues de RhAG, RhBG et RhCG, sont exprimés dans les reins, le foie, le cerveau et la peau (Huang et Liu, 2001). La fonction exacte de ces glycoprotéines est l'objet de discussions intensives. Outre leur homologie avec les protéines Amt/Mep, le fait que l'expression hétérologue de RhAG chez un triple mutant *mep1-3Δ* permet la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* à une faible concentration de NH_4^+ et à un pH acide laisse penser que les glycoprotéines Rh transportent du NH_4^+ ou du NH_3 (Westhoff et al., 2004). Marini et al. (2000) ont démontré que RhAG et RhCG exprimées chez *S. cerevisiae* importent du 14C-méthylammonium et, à des concentrations toxiques, en exportent. Exprimée chez des oocytes de *Xenopus*, RhAG effectue le transport du 14C-méthylammonium indépendamment de la force proton motrice (Westhoff et al., 2004). Le même type d'expériences mené avec RhBG et RhCG suggère que le transport est dépendant (Bakouh et al., 2004; Nakhoul et al., 2006) ou non de la force proton motrice (Ludewig, 2004). Contrairement aux glycoprotéines, RhD et RhCE ne semblent pas charrier de substrat et sont dépourvues des deux résidus histidines situés à l'intérieur du pore hydrophobe retrouvés chez les protéines Amt/Mep (Revue par Ludewig et al., 2007). Le modèle de transport qui prédomine actuellement concernant RhAG, la glycoprotéine Rh la plus étudiée, est celui de la déprotonation du NH_4^+ , suivi du passage du NH_3 à travers le pore et de la reprotonation dans le cytoplasme (Revue par Ludewig, 2006; Mayer et al., 2006). Le rôle physiologique de RhAG serait donc de faciliter l'équilibration rapide du NH_3 à travers la membrane plasmique des globules rouges et de permettre le transit de cette molécule jusqu'aux organes «détoxifiants» (voir figure 22) (Ripoche et al., 2004). Quant au transporteur Rh1 de l'algue verte

Chlamydomonas reinhardtii, son substrat serait le CO₂. Deux observations sont à l'origine de cette conclusion: Rh1 est davantage exprimée durant la croissance CO₂-dépendante de *C. reinhardtii* (Soupene et al., 2002); l'interférence ARN de l'ARNm de Rh1 réduit le taux de croissance en présence d'une forte concentration de CO₂ et n'a pas d'effet sur l'import de 14C-méthylammonium (Soupene et al., 2004). RhAG de l'humain contribuerait aussi à la grande perméabilité des érythrocytes pour le CO₂. En effet, la spectrométrie de masse a révélé que le taux de transport du CO₂ est plus bas dans un globule rouge Rh_{null} que dans une cellule sauvage (Endeward et al., 2006).

Quatre homologues de la sous-famille Rh50 ont été identifiés par analyse phylogénétique chez les bactéries (Huang et al., 2005). Récemment, la structure de NeRh50 du chimiolithoautotrophe obligatoire *Nitrosomonas europaea* a été résolue par cristallographie à un mois d'intervalle par deux équipes de recherche (voir figure 24) (Li et al., 2007 ;Lupo et al., 2007). NeRh50 est organisée en homotrimère et une quasi-symétrie est observée entre les groupes d'hélices TM 1 à 5 et 6 à 10. Les seules différences majeures au niveau de la structure globale entre NeRh50 et les protéines Amt/Mep sont la présence d'une hélice α cytoplasmique en C-terminale (CT) et de deux hélices α cytoplasmiques situées respectivement entre les hélices TM 2-3 et les hélices TM 11-CT. Li et al. (2007) émettent l'hypothèse qu'une protéine inconnue régulerait l'ouverture du pore hydrophobe en s'attachant à l'hélice CT. Les deux équipes de recherche n'ont pas trouvé de vestibules de recrutement extracellulaire pour le NH₄⁺. Suite à des expériences de pressurisation avec du CO₂, Li et al. (2007) ont identifié un site d'attachement pour ce gaz à proximité de l'embouchure cytoplasmique du pore. À cause de cela, ils concluent que le substrat de NeRh50 est le CO₂. De leur côté, Lupo et al. (2007) affirment que NeRh50 est un canal qui conduit le NH₄⁺ de façon bidirectionnelle avec moins d'affinité pour son substrat que les protéines Mep/Amt. Le fait que l'expression hétérologue de NeRh50 chez *Saccharomyces cerevisiae* restaure la croissance à une faible concentration de NH₄⁺ est un argument de plus en faveur de leur hypothèse (Cherif-Zahar et al., 2007; Weidinger et al., 2007).

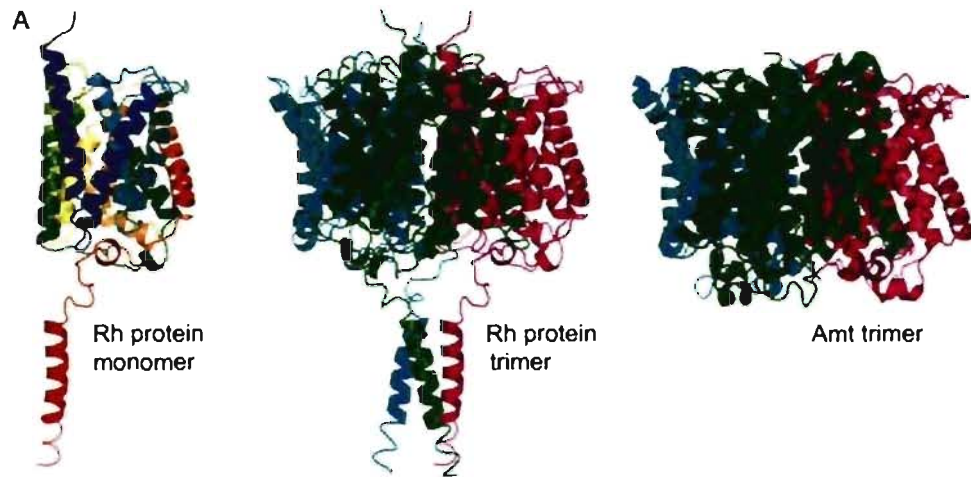


Figure 24. Structure de la protéine NeRh50 de *Nitrosomonas europaea*. Légende (monomère Rh): ruban bleu foncé = N-terminal; ruban rouge = C-terminal. (Figure tirée de Li et al., 2007).

2.4 Interaction entre Amt et les protéines PII

En plus d'être au cœur de la régulation posttraductionnelle de la nitrogénase tel que décrit dans les sections 1.2.2.9 et 1.2.2.10, l'interaction rapide, sensible et réversible entre les protéines PII et Amt joue un rôle dans la régulation du transport du NH_4^+ par Amt. Lorsque la concentration de NH_4^+ est élevée dans le milieu, les protéines PII bloquent le pore hydrophobe d'Amt. Chez la majorité des procaryotes, *glnK*, un gène codant pour une protéine PII, forme un opéron avec *amt* (Thomas et al., 2000). Cette organisation génétique conservée est le premier indice d'une relation fonctionnelle entre les deux protéines. Des expériences de fractionnement cellulaire et de «Pull-down» chez *Escherichia coli* ont révélé la formation d'un complexe GlnK-AmtB dépendant de la déuridylylation préalable de GlnK et donc de l'augmentation du ratio Gln/ α CG (Coutts et al., 2002; Javelle et al., 2004). L'analyse *in vitro* de cette interaction a établi qu'aucune autre protéine n'est nécessaire, que le ratio GlnK-AmtB est de 1:1 et que seule la forme complètement déuridylylée de GlnK peut s'attacher à AmtB (Durand et Merrick, 2006). Sachant que l' α CG

(Atkinson et Ninfa, 1999; Jiang et al., 1998A; Jiang et al., 1998B; Jiang et Ninfa, 1999; Kamberov et al., 1995) et l'ATP (Xu et al., 1998) se lie à GlnB et à GlnK d'*E. coli*, Durand et Merrick (2006) ont testé l'effet de ces molécules sur le complexe GlnK-AmtB. 3.5 mM d'ATP est indispensable à la formation du complexe. Au contraire, l'ajout de 1mM d' α CG en présence de MgCl₂ et d'ATP provoque la dissociation. Ces résultats permettent de conclure que l'interaction entre GlnK et AmtB n'est pas exclusivement tributaire de l'état d'uridylylation de la protéine PII et que les réservoirs intracellulaires d'ATP et d' α CG ont un rôle à jouer. Des observations similaires ont été effectuées chez *Azospirillum brasilense* (Huergo et al., 2007). Dans ce cas, 3.5mM d'ADP ou d'ATP permettent la formation du complexe GlnZ-AmtB. L'ajout de 10 μ M d' α CG entraîne la dissociation en présence de MgCl₂/ATP mais pas de MgCl₂/ADP. Le modèle physiologique suggéré par Huergo et al. (2007) est le suivant: le complexe GlnZ-AmtB serait stable seulement lorsque des molécules d'ADP y sont attachées et l'augmentation du ratio ATP:ADP serait un prérequis pour que l' α CG exerce son effet dissociatif. Chez *Rhodospirillum rubrum*, la constante de dissociation (K_d) de l' α CG pour le complexe GlnJ-AmtB1 est de 340 μ M alors que la concentration nécessaire pour l'uridylylation de GlnJ est de 5 μ M (Wolfe et al., 2007). Par conséquent, plusieurs molécules d' α CG doivent s'attacher à GlnJ pour stimuler son relâchement dans le cytoplasme et l'uridylylation n'est pas le mécanisme en jeu.

Le complexe formé entre GlnK et AmtB d'*Escherichia coli* (Conroy et al., 2007; Gruswitz et al., 2007) a été résolu par cristallographie (voir figure 25). Cette étude démontre que les protéines PII s'ancrent par l'intermédiaire de leur boucle T dans l'embouchure cytoplasmique du pore hydrophobe d'Amt. Le groupe guanidinium de l'arginine 47 situé à l'apex de la boucle T de GlnK d'*E. coli* forme des liens hydrogène avec le groupe carbonyle de C312 d'AmtB, le groupe hydroxyl de S263 et un pont salin avec D313 (voir figure 26) (Conroy et al., 2007). Ce réseau d'interactions obstrue la sortie du pore et empêche le passage du NH₄⁺. La présence d'un résidu UMP sur la tyrosine 51 de la boucle T paraît stériquement impossible. De plus, l'uridylyltransférase (GlnD) ne peut pas avoir accès à cette région de GlnK une

fois le complexe formé. Il s'agit d'un argument supplémentaire en faveur d'un mécanisme autre que l'uridylylation de GlnK pour expliquer la dissociation du complexe. Dans le cas de GlnK-AmtB d'*E. coli*, la présence d'une molécule d'ADP attachée à chaque GlnK a été détectée (Conroy et al., 2007; Gruswitz et al., 2007). Ce résultat et le fait que la protéine PII de *Thermotoga maritima* est co-purifiée avec de l'ADP (Scwarzenbacher et al., 2004) indiquent qu'en plus de l'ATP et de l' α CG, l'ADP interagit *in vivo* avec les protéines PII. Ces trois effecteurs s'attachent à la base de la boucle T. Ils pourraient altérer la conformation de cette partie de GlnK et réduire ou augmenter la stabilité du complexe (Conroy et al., 2007; Gruswitz et al., 2007).

Outre AmtB-GlnZ-DraG d'*Azospirillum brasilense*, un autre complexe régulateur auquel participe PII-Amt a été identifié jusqu'à maintenant. Chez *Bacillus subtilis*, GlnK-AmtB séquestrent TnrA à la membrane lorsque la concentration intracellulaire d'ATP est faible (Heinrich et al., 2006). TnrA est un régulateur transcriptionnel de la famille MerR (Schreier et al., 1989). Lorsque l'azote fixé est déficient dans le milieu, TnrA active l'expression des opérons *amtBglnK*, *nasDEF* (réduction assimilatrice du nitrate), *tnrA*, *ureABC* et de d'autres gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote (Yoshida et al., 2003). Dans les mêmes conditions, TnrA réprime la transcription de *gltAB* (Belitsky et al., 2000). L'ajout de 4 mM d'ATP et de 1 mM d' α CG provoque le retour de GlnK et de TnrA dans la fraction cytoplasmique (Heinrich et al., 2006). GlnK de *Bacillus subtilis* ne possède pas de tyrosine 51 ou de sérine 49 dans sa boucle T et ne peut probablement pas être modifiée de façon covalente. Par conséquent, l'attachement d'effecteurs à GlnK semble être suffisant pour assurer une gestion adéquate de l'association/dissociation de GlnK-AmtB.

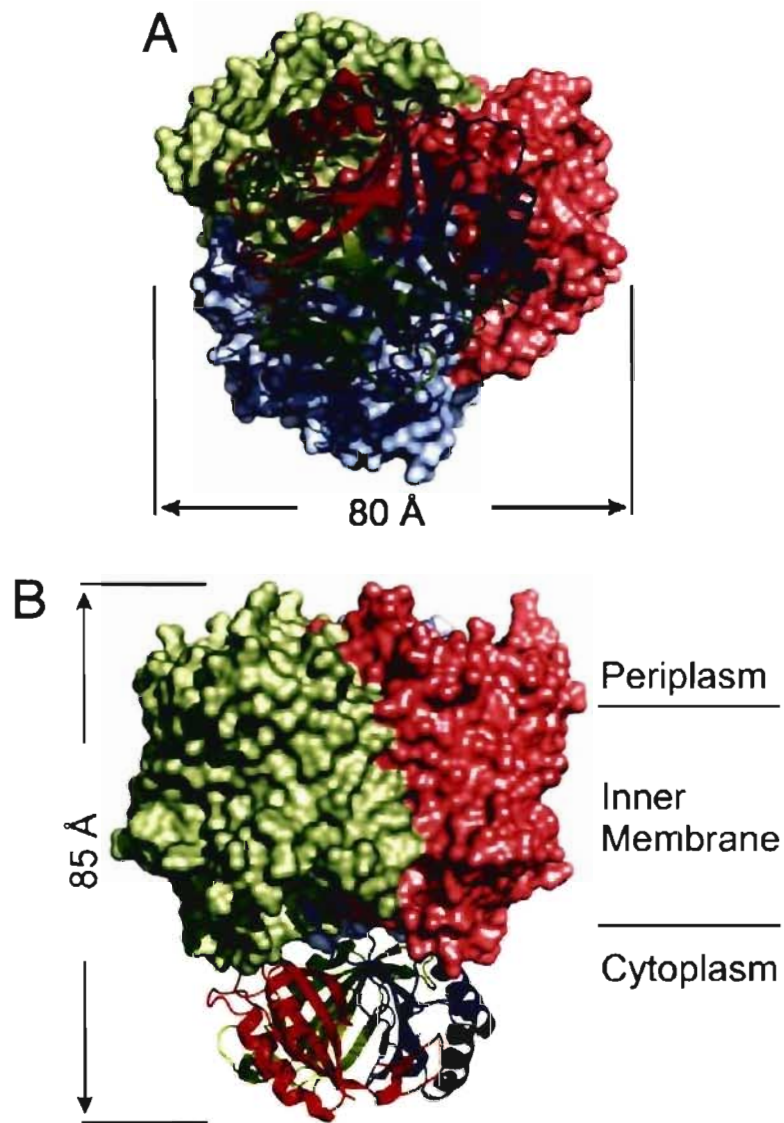


Figure 25. Structure du complexe GlnK-AmtB d'*Escherichia coli*. **a.** vue à partir du cytoplasme. **b.** vue dans le plan de la membrane. (Figure tirée de Conroy et al., 2007).

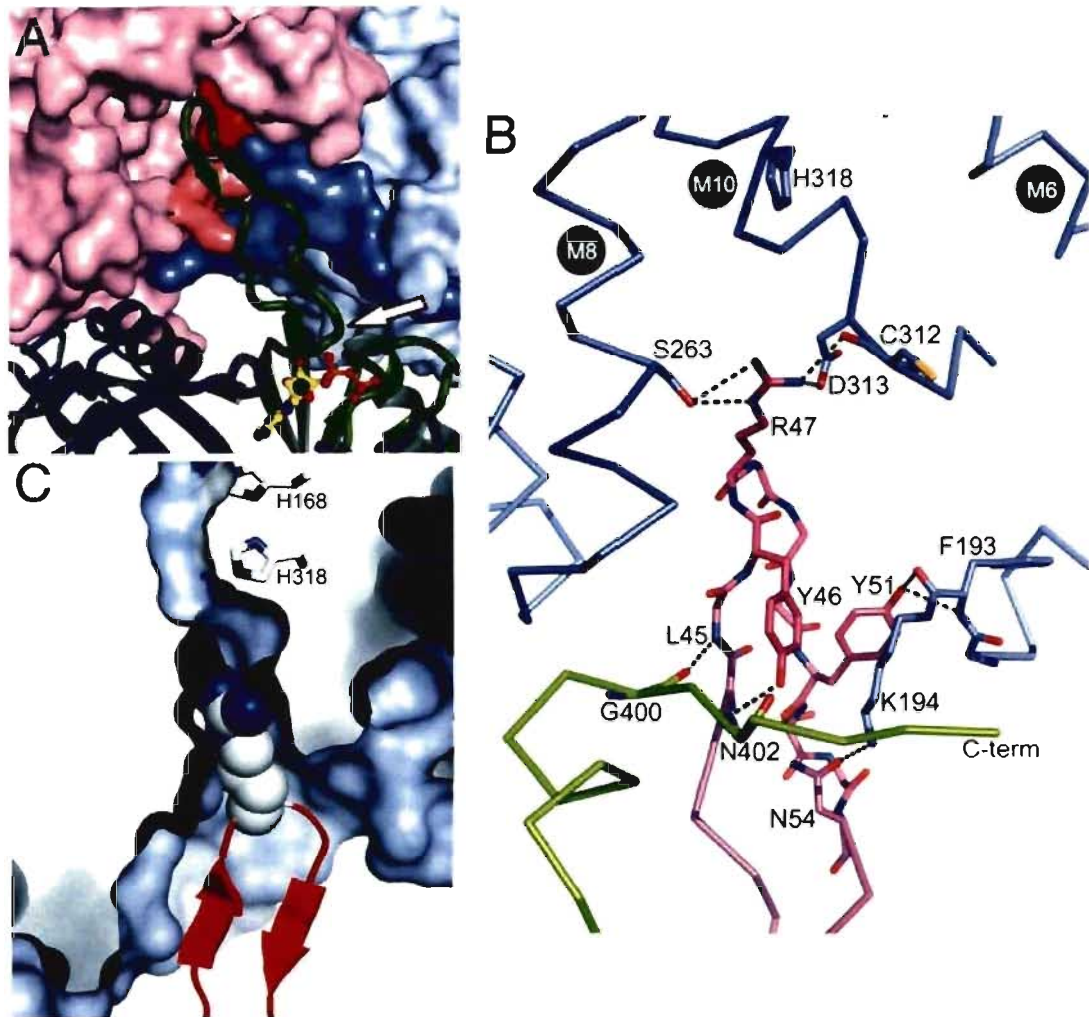


Figure 26. Blocage du pore hydrophobe d'AmtB d'*Escherichia coli* par la boucle T de GlnK. **a.** Représentation générale de l'interaction de la boucle T de GlnK avec AmtB. Légende: vert = boucle T de GlnK; saumon et rouge = surface des boucles cytoplasmiques (saumon = boucle 5-6 et rouge = boucle 7-8) d'AmtB en contact avec la boucle T. **b.** Liens hydrogènes formés entre la boucle T de GlnK et l'embouchure cytoplasmique du pore hydrophobe d'AmtB. Légende: rose = boucle T de GlnK; bleu = sous-unité AmtB; vert = queue C-terminale cytoplasmique d'une sous-unité AmtB adjacente. **c.** Insertion de l'arginine 47 de GlnK dans le pore hydrophobe d'AmtB. (Figure tirée de Conroy et al., 2007).

2.5 Conclusion

Plusieurs observations consignées dans la littérature indiquent que les protéines Amt/Mep jouent un rôle de senseur du niveau d'azote fixé. Les mécanismes associés à cette fonction régulatrice sont encore mal compris et seront discutés dans la troisième section de cette thèse. De notre côté, nous émettons l'hypothèse qu'AmtB de *R. capsulatus* est aussi un senseur du niveau d'azote fixé faisant partie d'une voie de régulation impliquant les protéines PII. De plus, nous pensons que le transport du substrat par AmtB participe directement à la transduction du signal. Pour apporter notre contribution à la caractérisation du rôle des protéines Amt dans la régulation de l'activité de la nitrogénase chez les bactéries pourpres non-sulfureuses, nous avons effectué des travaux de biologie moléculaire et de biochimie sur le système AmtB-GlnB, GlnK de *Rhodobacter capsulatus*. Nos buts étaient les suivants: 1- décrire la séquestration des protéines PII par AmtB de *R. capsulatus*, 2- examiner l'impact de l'uridylylation des protéines PII sur cette relation, 3- définir le rôle de résidus hautement conservés dans la famille Amt/Mep ou de la queue C-terminale d'AmtB dans ses fonctions régulation et transport, 4- évaluer l'importance respective de la séquestration de GlnK/GlnB et du transport du NH_4^+ par AmtB dans la régulation de l'activité de la nitrogénase molybdène. Avec les mêmes objectifs, nous avons aussi étudié AmtY, un homologue d'AmtB sans fonction identifiée. Pour ce faire, plusieurs techniques ont été utilisées: la construction de souches mutantes, la mutagenèse dirigée, la purification de protéine par chromatographie d'affinité, la production d'anticorps, la chromatographie en phase gazeuse, le fractionnement cellulaire, le native-PAGE, le SDS-PAGE, le Western Blot, la PCR quantitative, le dosage du transport de méthylammonium, etc. Les résultats de la somme de ces expériences sont présentés à travers deux articles dans la section suivante.

CHAPITRE II

RÉSULTATS

Membrane sequestration of PII proteins and nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*

Dans cet article, nous démontrons que les deux homologues des protéines PII de *Rhodobacter capsulatus*, GlnB et GlnK, sont nécessaires pour la régulation posttraductionnelle de la nitrogénase molybdène et l'ADP-ribosylation de NifH en réponse à un choc NH_4^+ . Tel que décrit précédemment chez d'autres bactéries, l'addition de NH_4^+ provoque la séquestration membranaire AmtB-dépendante de GlnK. En absence de l'autre homologue, l'uridylylation/déuridylylation d'une protéine PII est aberrante. Dans un mutant *glnK*, une plus grande fraction du réservoir de GlnB se retrouve associée à la membrane. Dans un mutant *glnB*, GlnK n'est pas séquestrée par AmtB et ce même si la protéine semble être complètement déuridylylée. À l'instar de GlnK sauvage, la relocalisation membranaire d'un variant GlnK-Y51F, une protéine PII qui ne peut être uridylylée, est dépendante du choc NH_4^+ . Avant l'ajout de NH_4^+ , GlnK-Y51F est davantage présente dans la fraction cytoplasmique, alors qu'après, le niveau de GlnK dans la fraction membranaire augmente. Ces résultats suggèrent que l'uridylylation/déuridylylation des protéines PII n'est pas le principal facteur gouvernant leur association avec AmtB à la membrane plasmique de *R. capsulatus*. Le travail présenté dans cet article a été effectué en partie par nos collaborateurs, Thomas Drepper et Bernd Masepohl. Voici un compte-rendu de leur participation: la production d'anticorps polyclonaux de lapin contre GlnB_{His6} et GlnK_{His6}, la construction des mutants Δ *glnK* (BSRUB13) et *glnB51* (TR3) et l'obtention des résultats présentés dans le tableau 2.

Publié dans Journal of Bacteriology, août 2007.


**Membrane Sequestration of PII Proteins and Nitrogenase
Regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus***

Pier-Luc Tremblay¹, Thomas Drepper², Bernd Masepohl³, and Patrick C.
Hallenbeck^{*1}

¹ Département de microbiologie et
immunologie, Université de Montréal,
Montréal, Québec H3C 3J7 Canada, ²
Institut für Molekulare Enzymtechnologie,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Forschungszentrum Jülich, 52426 Jülich,
Germany, ³ Ruhr-Universität Bochum,
Lehrstuhl für Biologie der
Mikroorganismen, D-44780 Bochum,
Germany

Running title: *R. capsulatus* GlnB, GlnK, and AmtB

Byline: PL Tremblay, T Drepper, B Masepohl, PC Hallenbeck

*Corresponding author. Mailing address: Département de microbiologie et
immunologie, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre-ville, Montréal,
Québec, H3C 3J7, Canada. Phone : (514) 343-6278. Fax : (514) 343-5701. E-mail:


Abstract

Both *Rhodobacter capsulatus* PII homologs, GlnB and GlnK were found to be necessary for the proper regulation of nitrogenase activity and modification in response to an ammonium shock. As previously reported for several other bacteria, ammonium addition triggered the AmtB-dependent association of GlnK with the *R. capsulatus* membrane. Native PAGE analysis indicates that the modification/demodification of one PII homolog is aberrant in the absence of the other. In a *glnK* mutant, more GlnB was found to be membrane associated under these conditions. In a *glnB* mutant, GlnK fails to be significantly sequestered by AmtB even though it appears to be fully deuridylylated. Additionally, the ammonium-induced enhanced sequestration by AmtB of the unmodifiable GlnK variant GlnK-Y51F follows the wild-type GlnK pattern with a high level in the cytoplasm without the addition of ammonium and an increased level in the membrane fraction after ammonium treatment. These results suggest that factors other than PII modification are driving its association with AmtB in the membrane in *R. capsulatus*.

Introduction

In *Rhodobacter capsulatus*, a non-sulfur purple phototrophic bacterium, molybdenum-containing nitrogenase is one of two enzymatic complexes capable of reducing dinitrogen to ammonium. Mo-nitrogenase is constituted of two proteins: a dinitrogenase (MoFe protein), containing the active site for N₂ fixation, and a dinitrogenase reductase (Fe protein) responsible for providing electrons to the MoFe protein. The reduction of 1 mol of N₂ requires the transfer of 8 mol electrons and the hydrolysis of 20 to 30 mol of MgATP. This highly energy-demanding process is tightly regulated by fixed nitrogen (ammonium) availability. (In an aqueous solution at neutral pHs, both ammonia (NH₃) and ammonium (NH₄⁺) are present. For simplification, the term ammonium is used throughout for both ammonia and ammonium). Regulation of nitrogenase in *R. capsulatus* occurs on three levels (11, 41). At the transcriptional level, the NtrB/NtrC two component system controls *nifA* transcription. In turn, NifA induces the expression of the other *nif* genes including the Mo-nitrogenase structural genes (34, 39). Apparently, NtrY, through cross talk, can substitute for NtrB in this process (12). At the posttranslational level, NifA activity is regulated, being active only in the absence of fixed nitrogen. As well, at a third level, Mo-nitrogenase activity is regulated, being switched-off within 5 minutes after an ammonium shock by either a dinitrogenase reductase ADP-ribosylation dependent, or independent mechanism (17, 27, 28, 40, 45, 59). Two proteins, DraT and DraG, are implicated in the regulation of Fe protein through covalent modification; DraT mediates ADP-ribosylation, whereas DraG removes the ADP-ribosyl residue (37, 48).

GlnB and GlnK, the two PII homologs of *R. capsulatus*, play central roles in the transcriptional and posttranslational regulation of Mo-nitrogenase (11, 41). GlnB plays a predominate role in regulation at the transcriptional level, and GlnK can not fully substitute for GlnB (11). In the presence of ammonium, GlnB prevents expression from Ntr promoters by binding to NtrB (44) and regulating its activity by inhibiting its activation of NtrC (41). Both GlnB and GlnK may be involved in *R.*

capsulatus in the post-translational control of NifA activity. Previously it has been shown that the presence of GlnK is sufficient to mediate the ammonium-induced inhibition of NifA activity; it was not possible to evaluate the potential role of GlnB (11). However, it is likely that both GlnB and GlnK are capable of binding to NifA and inhibiting its activity since both proteins have been shown, by yeast two-hybrid studies, to interact directly with the transcriptional activator, NifA (44).

In *Escherichia coli*, GlnB and GlnK are key regulatory proteins for various pathways of fixed-nitrogen assimilation. The uridylylation state of these trimeric proteins reflects the intracellular concentration of glutamine (26), with GlnB and GlnK becoming uridylylated on tyrosine 51 in the T-loop when the concentration of fixed nitrogen is low (3, 51). GlnK of *E. coli*, as in *R. capsulatus*, is encoded on the same operon as AmtB, a homotrimeric ammonium channel protein of the Mep/Amt family (4, 52, 53). AmtB is presumed to act as a channel for NH₃ in a mechanism, whereby NH₄⁺ is first bound and deprotonated to allow passage of NH₃. In addition to AmtB, *R. capsulatus* has the capacity to synthesize a second Amt-like protein, AmtY (62). In contrast to *amtB*, the *amtY* gene is not associated with a PII-encoding gene. Ammonium shock initiates the sequestration of GlnK, and to a lesser extent of GlnB by AmtB (9, 13, 25). Deuridylylation of GlnK is thought to be necessary for its capture by AmtB. The GlnK-AmtB interaction regulates ammonium transport by AmtB (9), and prevents titration of GlnB (6).

AmtB (62), and GlnB and GlnK (11) of *R. capsulatus* have previously been implicated in the posttranslational regulation of Mo-nitrogenase. Indeed, in either an *amtB* or a *glnB glnK* mutant, nitrogenase activity is not switched off by ammonium addition, and dinitrogenase reductase is not ADP-ribosylated (11, 62). Also, an interaction between GlnB/GlnK and DraT has been demonstrated by analysis with the yeast two-hybrid system (44). PII proteins and members of the Mep/Amt family play important roles in nitrogenase activity regulation in other bacteria such as *Azospirillum brasilense* and *Rhodospirillum rubrum* (30, 63, 64). In these organisms, addition of ammonium triggers a membrane sequestration of DraG dependent on

AmtB and PII homologs (23, 56). Moreover, in *A. brasilense*, pull-down assays have shown binding between deuridylylated GlnB and DraT, and between uridylylated/deuridylylated GlnZ and DraG (24).

Here we report the effect of *amtB*, *amtY*, *glnB*, *glnK*, and *glnK51* (encoding GlnK-Y51F) mutations on membrane sequestration of PII homologs in *R. capsulatus*. Our results suggest that in this organism the modification states of GlnB and GlnK are of limited importance for their interaction with AmtB. We have also observed that GlnB and GlnK may be involved in regulating the uridylylation/deuridylylation state of each other.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used are listed in table 1. Appropriate antibiotics were added when necessary. *E. coli* strains were cultivated in LB medium. *R. capsulatus* strains were maintained in YPS medium (57). For nitrogenase-derepressing conditions for β -galactosidase assays, the RCV medium contained 20mM serine as nitrogen source. For all other experiments, cultures were grown anaerobically to early stationary phase at 30°C under light in RCV medium without fixed nitrogen (60). Conjugal transfer of plasmid from *E. coli* S17.1 to *R. capsulatus* was achieved by filter mating (39). Standard methods for DNA isolation and manipulation were performed as described by Sambrook et al. (49).

Construction of plasmids. pAP2 contains *glnK* with a Y51F substitution and 300 bp of upstream sequence. Mutagenesis was performed by overlap extension PCR using pAY98 as a template. The forward primer was 5'-CGCCTGCAGTGATGCGTAGC-3', and the reverse primer was 5'-CCCTGGATCCCCTGTGGTTCCT-3' (PstI and BamHI sites underlined). Mutagenic primers were 5'-ATTCACCGCGAATTCGGCGCC-3'/5'-CGCGGCGCCGAATTCGCGG-3'

(EcoRI site underlined; mutagenic bases in boldface). PCR product was cloned into pJB3TC20 resulting in pAP2.

pSV5 and pSV6 contain respectively *glnB*_{his6} and *glnK*_{his6}. PCR products were obtained by using chromosomal DNA as a template with primer pairs 5'-CATATGAAGAAGGTCGAGGCGATC-3'/5'-CTCGAGCGCGTCCTCGCCGGTCTC-3' for *glnB* (NdeI and XhoI sites underlined) and 5'-CATATGGTGAAACTCATCATTGCAGCG-3'/5'-GCGGCCGCAGCGCTTCGTCGCCAGCTTC-3' for *glnK* (NdeI and NotI sites underlined). Fragments were blunt-end cloned into the SmaI site of pK18. A 0.35-kb NdeI-XhoI fragment carrying *glnB* and a 0.35-kb NdeI-NotI fragment carrying *glnK* were subsequently cloned into pET-22b(+) (Novagen, Darmstadt, Germany) resulting in pSV5 and pSV6, respectively.

pBSRUB21-I contains *amtB* under the control of the constitutive promoter of *aphII* (Km^r gene). A 2-kb PCR product encompassing *glnK* and *amtB* was obtained by using chromosomal DNA as a template with primer pair 5'-TCGGCTGGAATCGGTTTTGACTG-3'/5'-TGATTTCGAGGCGCTGATGTGGAT-3'. The PCR product was blunt-end cloned into the SmaI site of pSVB10 resulting in pSGJN1. Subsequently, a 1.9-kb XhoI-EcoRI fragment from pSGJN1 carrying *amtB* and a part of *glnK* was cloned into pPHU231 resulting in pBSRUB19. A 1.9-kb *BamHI* fragment bearing *aphII* gene from pNIRUB60-I was cloned into pBSRUB19 resulting in pBSRUB21-I.

Construction of *R. capsulatus* Δ *glnK* mutant BSRUB13. A 1.2-kb Sali-XhoI fragment from pSG18 carrying most of *amtB* was cloned into pSUP202 resulting in pNIRUB143. A 4.7-kb Sali fragment from pSG5IIa carrying the rest of *amtB* and *glnK* was cloned into pNIRUB143, resulting in pNIRUB144. Plasmid pNIRUB144 was cut with XhoI-BglII (both sites are within *glnK*). Sticky ends were filled-in by treatment with Klenow fragment and blunt ends were ligated leading to the deletion of 228 bp in the *glnK* coding region resulting in pNIRUB145. A 12.6-kb *BamHI* fragment carrying *E. coli lacZ* constitutively expressed from the Km cassette from

pNIRUB142 was cloned into pNIRUB145 resulting in pBSRUB13. Plasmid pBSRUB13 was introduced by conjugation into *R. capsulatus* strain SG21, in which the *glnK* gene is interrupted by a gentamicin resistance cassette (*glnK::Gm*). Selection for Km^r resulted in a strain carrying pBSRUB13 integrated in the chromosome via a single-crossover event. One Km^r exconjugant was grown in the absence of antibiotics prior to plating on non-selective X-Gal containing plates. Double-crossover recombination events were identified by loss of a LacZ⁺ phenotype and subsequently, Lac⁻ strains were checked for sensitivity towards kanamycin and gentamicin. Deletion in *glnK* in BSRUB13 was verified by Southern hybridization.

Construction of *R. capsulatus* mutant TR3 (GlnB-Y51F). Mutant strain TR3 contains a *glnB51* mutant allele (GlnB-Y51F) in the chromosome instead of the *glnB* wild-type gene and a Gm cassette in *orf3528*, located upstream of *glnB*. A 0.6-kb DNA fragment encompassing the 3' end of *glnB* and portion of *glnA*, located downstream of *glnB*, was PCR amplified using chromosomal DNA as the template and primer pair 5'-TATCGCGGGGCCGAATTCGTCGTCGA-3'/5'-TGATTACGAATTAAGCTTCCGGCCCG-3' (EcoRI and HindIII sites underlined). The amplification product was cut with EcoRI and HindIII and cloned into pUC18, resulting in pTR10. An 8.5-kb HindIII fragment carrying a Tc^r gene and the *mob* site from pWKR56-I was cloned into pTR10, resulting in pTR12. In parallel, a 1.5-kb DNA fragment encompassing the 5' end of *glnB* and *orf3528*, located upstream of *glnB*, was PCR-amplified using chromosomal DNA as template and primer pair 5'-GGTACCGAGCTCGAATTCGGCCCTGAT-3'/5'-GAAGTCGACGACGAATTCGGCCCGC-3' (EcoRI sites underlined). The amplification product was cut with EcoRI and cloned into pK18, resulting in pTR9. A 45-bp XhoI fragment from the *orf3528* coding region was exchanged against the 2.6-kb XhoI Gm cassette from pWKR440, resulting in pTR11. Next, the 4.1 kb EcoRI fragment from pTR11 was cloned into pTR12, resulting in pTR14-I, thereby combining the two parts of the *glnB* gene. The *glnB* allele in pTR14-I differs from the wild-type gene in two nucleotides (generating an EcoRI site) and thus codes for a GlnB-Y51F mutant protein. After conjugational transfer of pTR14-I into *R.*

capsulatus, selection for Gm^f and loss of the vector-encoded Tc^r identified double-crossover events leading to *orf3528::Gm* mutants. Depending on the individual crossover sites some of the *orf3528::Gm* mutant strains additionally carried the GlnB-Y51F substitution (caused by the introduction of the EcoRI site within *glnB*). These GlnB-Y51F substitution strains were identified by Southern blot analysis using genomic DNA cut with EcoRI and a *glnB*-specific probe. One *glnB51* mutant strain selected for further studies was designated TR3.

GlnB_{His6} and GlnK_{His6} overexpression, purification, and antibody production. *E. coli* strain BL21 (DE3) carrying either plasmid pSV5 (*glnB_{his6}*) or pSV6 (*glnK_{his6}*), respectively, was grown at 30°C in 1 liter of selective LB medium until an OD₅₈₀ of 0.5 was reached. Synthesis of the recombinant proteins was induced by the addition of IPTG at a final concentration of 1mM. After further incubation at 30°C for 3 hours, cells were harvested, washed with 50 ml buffer A (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 8) containing 20mM imidazole, and resuspended in 20 ml buffer A (with 20 mM imidazole). Cells were disrupted in a French press cell (at 2000 lb/in²). The lysate was centrifuged at 22548 X g for 10 min at 4°C to remove cell debris. The recombinant proteins from the supernatant were purified using Ni-NTA columns (Qiagen, Hilden, Germany) preequilibrated with buffer A containing 50mM imidazole. Recombinant proteins were eluted from the column using buffer A containing 500mM imidazole. GlnB_{His6} and GlnK_{His6} were sent to Eurogentec (Köln, Germany) to immunize rabbits. Specificity of the antibodies was verified with the appropriate *R. capsulatus* mutants.

***In vivo* nitrogenase activity, dinitrogenase reductase ADP-ribosylation, and β-galactosidase assay.** *In vivo* nitrogenase activity was measured by the acetylene reduction method as described previously (62). For the dinitrogenase reductase ADP-ribosylation results shown in Fig. 1G, 50 μl of culture samples were removed at the indicated time, treated, loaded on low-cross-linker gels, immunoblotted, and detected by chemiluminescence, all as described previously (62). β-Galactosidase activity was measured as previously described (22, 42).

Ammonium treatment and cellular fractionation. Two separate cultures of the same strain were grown photoheterotrophically in the absence of oxygen to early stationary phase in 320 ml of RCV. NH_4Cl was added to 1 mM to one of the duplicate cultures 15 min prior to harvest. The cells were harvested (10000 X g, 30 min, 4°C), resuspended in 10 ml of SP buffer (23), and frozen. After thawing, the cells were sonicated and cellular debris was removed by centrifugation (10000 X g, 30 min, 4°C). The supernatant was processed accordingly to Coutts et al. (9), with the exceptions that 10ml of clarified lysate was ultracentrifuged using a Beckman L8-60M with a Beckman 70.1Ti rotor, and that the 1ml at the top of the ultracentrifuge tube after the first ultracentrifugation was considered as the cytoplasmic fraction. The pellet containing the membrane fraction obtained after two washes was resuspended in 1ml of SP Buffer. Fractionation experiments were repeated at least twice for each strain.

Western blot analysis. For all PAGE, 5 μg of total protein was loaded per well. Protein concentration was measured by the Bradford reaction (7). SDS-PAGE was conducted with 15% polyacrylamide gels and native PAGE with 10% polyacrylamide gels. After transfer to PVDF membranes (Roche, Mississauga, Ontario, Canada), immunoblots were probed with either anti-GlnB or anti-GlnK antibody. Signals were detected with the ECL system of Amersham (Oakville, Ontario, Canada).

RNA extraction and quantitative PCR. Total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). cDNA was synthesized with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada). QuantiTect Sybr Green PCR Kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada) and Rotor-Gene 6000 cycler were used to amplify and quantify PCR products from *glnB* and *glnK* by quantitative PCR (qPCR). Expression of PII homologs was normalized with *rpoZ* expression, a gene encoding the ω -subunit of RNA polymerase. Relative expression of *glnB* and *glnK* were calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (36). The

following primers were used for gene amplification: *glnB*, 5'-AGCCGTTCAAGCTCGATGAAGTGA-3'/5'-AACCATCTCGATCTTCACCTTGGG-3'; *glnK*, 5'-TGATGGTGACGGAAATCAAGGGCT-3'/5'-CAAGCTTCACCTTCGGCACGAAAT-3'; and *rpoZ*, 5'-TGACAATGACAAGAACCCGGTGGT-3'/5'-TCTGGGTCTGGTTGCTTTCGATCA-3'. Experiments were done in triplicate.

Results

Effects of *glnB* and *glnK* mutations on the posttranslational regulation of Mo-nitrogenase activity and Fe protein ADP-ribosylation

A previous study showed the abolition of Mo-nitrogenase post-translational regulation and of ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase (NifH) in a *glnB glnK* strain (11). However, AmtB is required for these processes (62), and the *glnB glnK* mutant used in the previous study was probably polar on *amtB* expression, compromising the interpretation of these results. To further pursue the characterization of the roles of PII homologs in *R. capsulatus*, the effects of individual mutations in either *glnB* or *glnK* were examined. The *glnB* mutant contained a *glnB* gene interrupted by an antibiotic cassette (Table 1). To generate a *glnK* mutant that was not polar on the downstream *amtB*, a markerless in-frame deletion of *glnK* was constructed (Materials and Methods). Southern and Western blot analyses demonstrated the inactivation of *glnK* (not shown). As expected, this mutation was not polar on *amtB*, as methylammonium transport requires the presence of AmtB, which can not be replaced by AmtY (62), and the *glnK* strain showed high levels of [¹⁴C]methylammonium transport (not shown).

R. capsulatus possesses two different systems implicated in the regulation of nitrogenase activity; one that is linked to ADP-ribosylation of the Fe protein, and one that is independent of this covalent modification (59). Both responses can be provoked by the addition of ammonium to the medium and the relative importance of

the two responses varies with growth conditions (59). However, AmtB plays a key role since AmtB⁻ strains are deficient in both responses (62). The potential ammonium-induced switch-off of nitrogenase activity and ADP-ribosylation of the Fe protein were examined in these *glnB* and *glnK* mutant strains (Fig. 1). There was no nitrogenase switch-off in the *glnB* strain when subjected to the addition of 200 μ M NH₄⁺ (Fig. 1B), and this strain was even insensitive to 50 mM NH₄⁺ (Fig. 1E). When ADP-ribosylation of the Fe protein in response to a 50mM NH₄⁺ addition was examined, only a moderate response after 80 min was noted for the *glnB* strain whereas the wild-type strain showed appreciable Fe-protein modification after 40 min, and even more substantial modification after 80 min (Fig. 1G). Under these conditions apparent modification was less than 100%; hence both responses, ADP-ribosylation-dependent and -independent, appeared to be operative. (Only one subunit per dimer is modified, therefore 100% modification should result in two Fe protein bands of equal intensity). Therefore GlnB appears necessary for both nitrogenase switch-off and Fe protein modification in *R. capsulatus*. Surprisingly, like GlnB, GlnK is also necessary for the NH₄⁺-induced switch-off of Mo-nitrogenase activity and ADP-ribosylation of Fe protein. Thus, in the *glnK* strain, the addition of 200 μ M ammonium does not suppress acetylene reduction by the Mo-nitrogenase (Fig. 1C). Even a 50 mM ammonium shock has no effect on Mo-nitrogenase activity or on the ADP-ribosylation state of NifH in a *glnK* mutant (Fig. 1F and G).

To explore the potential need for GlnK modification in the regulation of these processes, a mutant strain carrying *glnK51* (encoding GlnK-Y51F) was examined. This analysis is potentially complicated by the fact that the *glnK51* allele was expressed from a plasmid and therefore might have different expression levels which could affect protein-protein interactions important to its functioning. To address this issue, we performed qPCR analysis of the relative expression levels of GlnK-Y51F (from the plasmid pAP2) and wild-type GlnK (from the chromosome) under the nitrogen-limited growth conditions used here. Expression levels of the two alleles were nearly the same since *glnK51* (GlnK-Y51F) is expressed 1.2 (\pm 0.3)-fold higher

than *glnK*; thus, the results obtained with GlnK and GlnK-Y51F strains can be directly compared. In the strain carrying the GlnK-Y51F allele, BSRUB13/pAP2, which lacks the wild-type GlnK, the mutant GlnK cannot be modified by uridylylation due to the replacement of the amino acid at the site of modification, tyrosine 51, with phenylalanine. However, the regulation of nitrogenase activity (switch-off) (Fig. 1D) and nitrogenase modification (Fig. 1G) are nearly normal in this strain. At lower doses of ammonium, normal demodification was shown to occur in this strain (not shown). This strongly argues that the modification status of GlnK is irrelevant to its function in regulating these processes.

AmtB-dependent membrane sequestration of GlnB and GlnK

The interaction of PII homologs with the membrane, dependent on proteins of the Amt family, has previously been demonstrated in both gram-positive and gram-negative bacteria (9, 10, 25). For example, in *R. rubrum*, a non-sulfur purple bacterium, GlnJ is sequestered by the membrane in an AmtB-dependent manner (AmtB₁) 30 minutes after the addition of 10mM ammonium (56). Here, cell fractionation experiments were carried out to study the possible sequestration of the two *R. capsulatus* PII homologs, GlnB and GlnK, by the two Amt family members of *R. capsulatus*, AmtB and AmtY. Western blot analysis was performed on the cytoplasmic and membrane fractions obtained from parallel cultures, one harvested with no treatment, the other harvested 15 minutes after the addition of ammonium to 1mM (Fig. 2). Antisera to GlnB and GlnK showed no cross-reactivity to the heterologous PII proteins when extracts of deletion strains were examined (data not shown). Before the addition of NH₄⁺, the membrane fraction was devoid of GlnB whereas with the culture to which ammonium had been added, there was relatively more GlnB in the membrane fraction (Fig. 2A). Cell fractionation analysis also showed greatly increased membrane association of GlnK in the ammonium-treated culture. Comparing the relative intensities of the membrane fraction with the cytoplasmic fraction suggests that there is a greater fraction of the GlnK pool associated with the membrane in the ammonium-treated cells than is the case with GlnB (Fig. 2B). Previously, the two *E coli* PII paralogues, GlnB and GlnK have been

shown to form heterotrimers (14, 54). As well, yeast two-hybrid studies have demonstrated an interaction between *R. capsulatus* GlnB and GlnK (44). Therefore possible heterotrimer formation is of potential concern in interpreting the results presented here. However, qPCR analysis shows that in the wild-type there is 100 (± 30)-fold greater expression of GlnK than GlnB under the nitrogen-limiting conditions used here. Therefore, potential GlnB-2GlnK heterotrimers would represent an insignificant fraction of the total GlnK population and can be ignored in the analysis of the GlnK results. However, as the resolution of native gel electrophoresis of the *R. capsulatus* PII paralogs (see below) is insufficient to differentiate between potential heterotrimers and different modified forms of GlnB, we can not rule out the possibility of heterotrimers influencing the results observed with anti-GlnB antisera (figure 2A for example). Indeed, GlnB-GlnK heterotrimers may be responsible for some of the membrane-associated GlnB observed here.

In a *R. capsulatus amtB* mutant, there is no capture of either of the two PII homologs by the membrane, indicating that membrane sequestration is necessarily dependent upon AmtB (Fig. 2A and B). This suggests that AmtY, an *R. capsulatus* homolog of AmtB, is incapable of participating in the ammonium-induced membrane sequestration of the PII proteins. Indeed, whether GlnB (Fig. 2A) or GlnK is examined (Fig. 2B), an *amtY* strain presents the same phenotype as the wild-type strain. This is not surprising since a mutation in *amtY* does not affect methylammonium uptake, a hall mark of bona fide AmtB proteins and, AmtY, as shown previously, is not implicated in the posttranslational regulation of the Mo-nitrogenase (62).

In addition to ammonium shock, darkness triggers Mo-nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *R. capsulatus* (61). Knowing that darkness still induces this phenomenon in an *amtB* mutant (62), we checked if this stimulus has an impact on the membrane sequestration of the *R. capsulatus* PII homologs. As expected, after 30 min of darkness, the relative distribution of GlnB

and GlnK appears unchanged: i.e., there seems to be no darkness-induced sequestration (Fig. 2C).

GlnB is necessary for the membrane sequestration of GlnK

In an *A. brasilense glnB* mutant, GlnK is always uridylylated and does not interact with the membrane even upon addition of ammonium (23). We show here that in *R. capsulatus*, GlnB is also necessary for the membrane sequestration of GlnK (Fig. 3B). As noted before, there is relatively more GlnK in the membrane fraction, and less in the cytoplasmic fraction, in the wild-type strain receiving an ammonium shock compared to no treatment. However, in a *glnB* strain, there appears to be no change of the localization of GlnK upon ammonium shock (Fig. 3B). On the other hand, contrary to what has been reported for the *A. brasilense glnB* mutant (23), the *R. capsulatus glnB* mutant, after 15 minutes exposition to 1mM of ammonium, displays an almost complete deuridylylation of GlnK as revealed by native PAGE (Fig. 3E). In fact, GlnB appears to be necessary for the efficient uridylylation of GlnK since intermediary forms of the protein (GlnK-1UMP, GlnK-2UMP, GlnK-3UMP) are observed in absence of NH_4^+ . In contrast, in the wild-type, only GlnK-3UMP, the fully uridylylated form, is present in the absence of ammonium. Since the ammonium-treated culture possesses a large fraction of completely deuridylylated GlnK, but the membrane fraction is almost devoid of GlnK, it would appear that the absence of UMP is not sufficient for membrane localization.

GlnK prevents efficient AmtB-dependent membrane sequestration of GlnB

One of the roles of GlnK of *E. coli* appears to be to prevent the titration of GlnB by AmtB. In an *E. coli glnK* mutant, Ntr-promoted genes are not downregulated by the addition of ammonium, whereas in a *glnK amtB* double mutant, the inhibition efficiency is comparable to that of the wild-type (6). Since in an *E. coli glnK* background, GlnB is the only PII homolog present to control NtrB activity, the absence of inhibition of Ntr-promoted gene expression is explained by the fact that GlnB is not present in the cytoplasm to assume its normal regulatory function with respect to fixed nitrogen (43).

In *R. capsulatus*, one function of GlnB is to control the synthesis of the nitrogen-fixation regulatory protein NifA. GlnK does not participated in the regulation of NifA synthesis, but appears to be capable of the posttranslational modulation of NifA activity. Therefore, GlnB⁻ strains, which constitutively express NifA, can still regulate nitrogenase synthesis in response to fixed nitrogen (11). Two lines of evidence establish that GlnK of *R. capsulatus* also acts to prevent significant sequestration of GlnB by AmtB. First, cell fractionation experiments were performed to explore the impact of a *glnK* mutation on the relationship between AmtB and GlnB. An examination of the relative intensities of GlnB in the membrane fraction compared to the cytoplasmic fraction of the culture without ammonium treatment shows that in a *glnK* strain there is a relatively greater amount of the GlnB pool found in the membrane fraction compared to the wild-type (Fig. 3A). The relative intensity of the membrane-associated GlnB to the cytoplasmic pool of GlnB was even greater in the culture that had received an ammonium shock (Fig. 3A).

Second, the constitutive expression of *amtB* (driven by the *aphII* promoter) in a *glnK* strain grown in RCV medium containing 20 mM NH₄⁺ allows the synthesis of an active Mo-nitrogenase (Table 2). At this ammonium concentration, there is no Mo-nitrogenase expression in the wild-type or in a *glnK* mutant since AmtB is expressed only at a very low level and GlnB, free in the cytoplasm, can suppress the NtrB-mediated phosphorylation of NtrC (41). NtrC-P induces the expression of *nifA* coding for the activator of Mo-nitrogenase structural genes (15, 21). Thus, in agreement with the results of the cell fractionation study, it would seem that in a *glnK* mutant *Paphii::amtB* strain growing in an ammonium rich medium, AmtB probably sequesters GlnB, preventing it from interacting with NtrB and NifA.

The uridylylation/deuridylylation status of the PII homologs and its impact on PII homolog localization

In *E. coli*, deuridylylation of GlnK is thought to trigger its binding to AmtB (25). Purification of an *E. coli* GlnK-AmtB complex (GlnK-AmtB_{Ec}) reveals that only

completely deuridylylated GlnK is copurified with AmtB_{Ec} (13). A previous study has also shown that GlnK-Y51F_{Ec}, a GlnK variant that cannot be uridylylated, is sequestered by AmtB_{Ec} even before ammonium shock (25). In accordance with this, ammonium conduction through AmtB in *E. coli* is blocked in a strain carrying GlnK-Y51F even under nitrogen-deficient conditions (25). Thus, it has been suggested that membrane sequestration of GlnK is governed by its uridylylation status (25).

The importance of the uridylylation state of GlnK and GlnB of *R. capsulatus* for their AmtB-dependent membrane sequestration was examined further. A number of observations suggest that factors other than uridylylation status drive PII membrane association in *R. capsulatus*. For one thing, as noted above, in a *glnB* strain, native PAGE analysis shows that GlnK, although apparently almost entirely in the fully deuridylylated form after an ammonium shock (Fig 3E), is not appreciably membrane associated (Fig 3B). (The primary purpose of Fig. 3C, D, and E is to show the modification status of the PII proteins, The apparently greater amount of the uridylylated form may be due to the antibody giving a more intense signal with this form than with the deuridylylated form. When the experiment show in Fig. 3E was performed by splitting the same culture in two and treating one-half with ammonium, the uridylylated form seen in the untreated sample was again more intense than the deuridylylated form found in the ammonium-treated sample). We next examined the effect of introducing a Y51F mutant allele of GlnK by using plasmid pAP2 carrying *glnK51* (coding for a GlnK-Y51F variant) to complement the *glnK* strain BSRUB13. As noted before, qPCR showed that this allele was expressed at approximately the same level as the wild-type allele. As to be expected, replacement of tyrosine 51 by phenylalanine prevents the uridylylation of GlnK-Y51F in the absence of ammonium, and its migration on native PAGE gels was the same whether or not the culture had been treated with ammonium (Fig. 3E). A variety of the physiological properties of the *R. capsulatus GlnK-Y51F-containing* strain were examined. The PII variant strain was found to present many of the same characteristics as the wild type strain. As already noted, the pattern of Mo-nitrogenase activity switch-off in response to the addition of 200 μ M ammonium in the GlnK-Y51F strain was nearly identical to that

of the wild-type GlnK strain, and nearly normal dinitrogenase reductase ADP-ribosylation was restored in to a *glnK* strain (Fig. 1). The pattern of the modification status of GlnB with and without the addition of ammonium was found to be the same in the GlnK-Y51F-containing strain as in the wild-type (Fig. 3D); thus, in this regard GlnK Y51F restores normal GlnK function in a *glnK* background. In addition, methylammonium uptake activity was within the range found for wild-type strain B10S (not shown). This was surprising since, based on previous studies with *E. coli*, it might be expected that GlnK-Y51F, unable to be modified, would bind to AmtB under all conditions, rendering it inactive as an ammonium (methylammonium) channel.

The localization of GlnK-Y51F in cultures without, and with, the addition of ammonium was examined. Indeed, although traces of the PII homolog variant were present in the membrane of cultures to which ammonium had not been added, the relative intensity of GlnK-Y51F in the cytoplasmic fraction was high, and appears to be almost of the same relative intensity with respect to the membrane fraction as the wild-type (Fig. 3B). In the culture to which ammonium had been added there was appreciable localization of the GlnK-Y51F pool in the membrane fraction. The relative intensity of the membrane fraction compared to the cytoplasmic does not seem to be as great as for the wild-type GlnK suggesting that the mutant protein may have a lower affinity for the membrane than the wild-type protein. Nevertheless, the ammonium-induced change in the membrane localization of GlnK-Y51F strongly argues that deuridylylation of GlnK is not the main signal that provokes the AmtB-dependent membrane sequestration of GlnK in *R. capsulatus*.

Binding of GlnB to the membrane after an ammonium shock may be of little physiological relevance since in the presence of GlnK most of the PII binding sites of AmtB would be occupied by GlnK. Nevertheless, it was of mechanistic interest to further examine the influence of the modification status of GlnB on its membrane sequestration in a *glnK* strain. Interestingly, in this mutant background the modification status of GlnB appears to be deregulated. Without the addition of

ammonium, the range of GlnB isoforms goes from deuridylylated to fully uridylylated, whereas in the culture to which ammonium was added, apparent full uridylylation is the only modification pattern observed (Fig. 3D). Since in a *glnK* background GlnB interacts strongly with the membrane, we checked the uridylylation state of the different fractions, cytoplasmic and membrane, by native PAGE. (Native PAGE has previously been used to examine the uridylylation status of the membrane-associated GlnK in *E. coli* [9] and *Klebsiella pneumoniae* [33].) Without ammonium addition, all the GlnB isoforms, except the completely deuridylylated one, are present in the cytoplasmic fraction (Fig. 3C). However, in the culture with an ammonium shock, partially uridylylated GlnB is found in the membrane fraction. Since these isoforms are located in the cytoplasm before the stimulus, this suggests that a signal other than uridylylation state must induce its membrane sequestration.

To further pursue this, it would be interesting to examine the localization of an unmodifiable GlnB in a *glnK* background. However, this is not possible with the strains presently on hand. In a *glnB51* (wild type for *glnK*) in which wild-type GlnB has been replaced with a GlnB-Y51F substitution, expression of a plasmid-encoded *glnK-lacZ* fusion is only at 3% of the wild-type level with serine as the fixed nitrogen source. Also, in this strain, *nifH-lacZ* and *nifA-lacZ* expression is lower, and GlnK is not detectable by Western blot (unpublished data). These results support the notion that fully deuridylylated GlnB shuts down expression from NtrC-activated promoters by binding to NtrB, thus favoring the dephosphorylation and deactivation of NtrC-P. Therefore, since *glnB*, and especially *glnK-amtB* are transcribed from Ntr promoters, it is futile to attempt fractionation experiments with the *glnB-Y51F* strain.

Discussion

PII proteins serve a variety of functions in the regulation of cellular nitrogen metabolism. In many bacteria there are at least two PII homologs present, usually GlnB and GlnK. Within the same species they appear in some cases to be functionally redundant, in others they have been shown to be functionally distinct.

For example, in the nitrogen-fixing enteric bacterium *K. pneumoniae*, GlnK can replace GlnB in most of its role in regulating nitrogen metabolism (18, 20) but GlnB cannot replace GlnK in modulating the activity of NifL (1). As well, the same PII homolog, GlnB, for example, may vary in its mode of action from species to species. For example, under nitrogen-limited conditions GlnB is required for NifA activity in the purple non-sulfur bacterium *R. rubrum* (65), whereas it is dispensable under the same conditions in the purple non-sulfur bacterium *R. capsulatus* (11).

The gene for the PII homolog GlnK is usually found in an operon with the gene encoding an AmtB protein of the Amt/MEP family. Crystal structures have recently shown that trimeric *E. coli* GlnK forms a complex with trimer AmtB largely through interactions mediated by the GlnK T-loop (8, 16). Different bacteria have been found to have different complements of PII and AmtB homologs, and in some cases evidence is accumulating that they are involved in the posttranslational regulation by ADP-ribosylation of Mo-nitrogenase following an ammonium shock. In the nitrogen-fixing betaproteobacterium *Azoarcus sp.* strain BH72, there are three PII homologs, GlnB, GlnK and GlnY and a single AmtB. Regulation of nitrogenase is complex, with nitrogenase modification in response to ammonium requiring both GlnB and GlnK, as well as AmtB, whereas nitrogenase activity switch-off appears to require only GlnK and AmtB (38). In *A. brasilense*, two PII homologs are present (GlnB, and GlnZ), as well as a single AmtB. GlnB is required for ammonium-induced Fe protein ADP-ribosylation (30), and GlnZ is needed for Fe protein demodification (31). Regulation may be through the formation of specific protein-protein complexes between GlnB and DraT and GlnZ and DraG (24). In *R. rubrum*, which contains two AmtB homologs (AmtB₁ and AmtB₂) and three PII homologs (GlnB, GlnK, and GlnJ), it has been shown that proper regulation of nitrogenase modification requires only AmtB₁, and either GlnB or GlnJ (56, 64). In other words, the functioning of these two *R. rubrum* PII homologs appears to be redundant in this case. Thus, in general, there is a participation of PII homologs and AmtB in regulating nitrogenase switch-off and the modification of the Fe-protein, but specific details in the number and types of PII homologs involved appear to be different

depending upon the organism. The mechanistic particulars behind these differences are as yet unclear.

Previously, it has been shown that, in *R. capsulatus*, AmtB is required for nitrogenase switch-off and covalent modification (62) and that a strain doubly mutated in *glnB* and *glnK* was also defective in this regard (11). Here we have shown that both GlnB and GlnK are necessary for the proper regulation of both nitrogenase activity switch-off and Fe protein modification. How they function together is unclear at present. Heterotrimer formation might be a factor, but this is somewhat unlikely as we have shown here that *glnK* expression is 100-fold higher than that of *glnB*. One reasonable hypothesis is that the absence of one protein might perturb metabolite pools, which in turn could affect the behaviour of the other PII homolog. As well, the modification state of one or both of the PII homologs may be important in the regulation of nitrogenase activity and ADP-ribosylation and our results strongly suggest that one PII homolog might participate in the proper regulation of the modification state of the other.

Here we have shown that the PII homologs of *R. capsulatus*, GlnB and GlnK are sequestered by the membrane in an AmtB-dependent way upon addition of ammonium, with significant binding of GlnB in response to an ammonium shock only in the absence of GlnK. Not surprisingly, this stimulus also provokes deuridylylation of GlnB and GlnK in the wild-type background. In *E. coli* it has been shown that it is the completely deuridylylated GlnK that binds to the membrane in an AmtB-dependent manner, and it has been thought that it is the PII modification state that governs its localization (25). In accordance with this, the *E. coli* PII variant GlnK-Y51F is always membrane associated independent of the nitrogen status of the cell (25). Here, contrary to what has been observed in *E. coli*, cell fractionation analysis of a *R. capsulatus glnK51* mutant shows that GlnK-Y51F localization is nonetheless dependent upon the cellular nitrogen status. As well, in a *glnB* strain GlnK is deuridylylated in response to an ammonium shock, but is not significantly sequestered by the AmtB in the membrane. These results strongly suggest that in *R.*

capsulatus it is something other than the deuridylylation of GlnK that triggers its capture by AmtB in the membrane.

Therefore, how the level of fixed nitrogen influences PII membrane sequestration in *R. capsulatus* is uncertain. It is known that in some cases PII protein activity may also be controlled by noncovalent binding of ATP and 2-oxoglutarate (29, 58) and in fact binding of GlnK with some protein effectors, for example *K. pneumoniae* GlnK with NifL (18), and *A. brasilense* GlnZ with DraG (24), appears to be indifferent to modification state. A recent in vitro study has shown that the presence of ATP is necessary for the constitution and dissociation of a GlnK-AmtB complex in *E. coli*, whereas 2-oxoglutarate is essential for its dissociation (13). Indeed, this explains why GlnK-AmtB membrane bound complexes can be isolated and studied, as we have done here with electrophoretic analysis. Essentially, since dissociation requires the presence of both ATP and 2-oxoglutarate, and these are drastically diluted during processing, the complexes remain “locked in”. The notion that membrane localization may be in part driven by interaction with metabolites is supported by a recent crystallographic study of an AmtB-GlnK complex where it was suggested that there are three sites on GlnK where 2-oxoglutarate could bind and affect the ability of GlnK to interact with AmtB (16). As well, GlnK in *Bacillus subtilis* is differentially membrane associated depending upon the cellular nitrogen status, and its localization appears to be independent of modification and possibly influenced by ATP levels (19). It is possible that metabolite concentrations, and changes in their levels, are the major driving forces for PII localization in *R. capsulatus*. Further investigation is required to verify this hypothesis. As well, evidence is mounting for key roles for AmtB and PII proteins in the control of the activities of the enzymes involved in NifH modification, DraG and DraT, with AmtB and a PII protein being required for the ammonium-induced membrane sequestration of DraG in both *A. brasilense* (23) and *R. rubrum* (56). Additional work is necessary to further decipher the exact roles of these players in the regulation of nitrogenase in *R. capsulatus*.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Council (PCH). We thank the following persons for plasmid and strain construction: Silke Groß (pSG plasmids), Nazila Isakovic (pNIRUB plasmids), Amélie Pelletier (pAP2), Tanja Rehmann (pTR plasmids), Britta Schubert (pBSRUB13; *R. capsulatus* BSRUB13), and Sven Vermöhlen (pSV5, pSV6). We thank Rita Simo-Guemfing for the result concerning the *glnB* mutant present in Fig. 3B.

References

1. **Arcondéguy, T., W.C. Van Heeswijk, and M. Merrick.** 1999. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**:263-270.
2. **Arnold, W., and A. Pühler.** 1988. A family of high-copy-number plasmid vectors with single end-label sites for rapid nucleotide sequencing. *Gene* **70**: 171-179.
3. **Atkinson, M.R., and A.J. Ninfa.** 1999. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32**:301-313.
4. **Blakey, D., A. Leetch, G.H. Thomas, G. Coutts, K. Findlay, and M. Merrick.** 2002. Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. *Biochem. J.* **364**:527-535.
5. **Blatny, J.M., T. Brautaset, H.C. Winther-Larsen, K. Haugan, and S. Valla.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range

- cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:370-379.
6. **Blauwkamp, T.A., and A.J. Ninfa.** 2003. Antagonism of PII signalling by the AmtB protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**:1017-1028.
 7. **Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
 8. **Conroy, M. J., A. Durand, D. Lupo, X.-D Li, P. A. Bullough, F. K. Winkler, and M. Merrick.** 2007. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:1213-1218.
 9. **Coutts, G., G. Thomas, D. Blakey, and M. Merrick.** 2002. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J.* **21**:536-545.
 10. **Detsch, C., and J. Stülke.** 2003. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology.* **149**:3289-3297.
 11. **Drepper, T., S. Groß, A.F. Yakunin, P.C. Hallenbeck, B. Masepohl, and W. Klipp.** 2003. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiol.* **149**:2203-2212.
 12. **Drepper, T., J. Wiethaus, D. Giaourakis, S. Groß, B. Schubert, M. Vogt, Y. Wienczek, A.G. McEwan, and B. Masepohl.** 2006. Cross-talk towards

the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. FEMS Microbiol. Lett. **258**:250-256.

13. **Durand, A., and M. Merrick.** 2006. In vitro analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. J. Biol. Chem. **281**:29558-29567.
14. **Forchhammer, K., A. Hedler, H. Strobel, and V. Weiss.** 1999. Heterotrimerization of PII-like signalling proteins: implications for P-II-mediated signal transduction systems. Mol. Microbiol. **33**: 338-349.
15. **Foster-Hartnett, D., and R.G. Kranz.** 1992. Analysis of the promoters and upstream sequences of *nifA1* and *nifA2* in *Rhodobacter capsulatus*; activation requires *ntrC* but not *rpoN*. Mol. Microbiol. **6**:1049-1060.
16. **Gruswitz, F., J. O'connell III, and R.M. Stroud.** 2007. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **104**:42-47.
17. **Hallenbeck, P.C., C.M. Meyer, and P.M. Vignais.** 1982. Nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: purification and molecular properties. J. Bacteriol. **149**: 708-717.
18. **He, L., E. Soupene, A. Ninfa, and S. Kustu.** 1998. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. J. Bacteriol. **180**:6661-6667.
19. **Heinrich, A., K. Woyda, K. Brauburger, G. Meiss, C. Detsch, J. Stülke, and K. Forchhammer.** 2006. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. **281**:34909-34917.

20. **Holtel, A., and M. Merrick.** 1989. The *Klebsiella pneumoniae* P_{II} protein (*glnB* gene product) is not absolutely required for nitrogen regulation and is not involved in NifL-mediated *nif* gene regulation. *Mol. Gen. Genet.* **217**:474–480.
21. **Hübner, P., B. Masepohl, W. Klipp, and T. A. Bickle.** 1993. *nif* gene expression studies in *Rhodobacter capsulatus*: *ntrC*-independent repression by high ammonium concentration. *Mol. Microbiol.* **10**:123-132.
22. **Hübner, P., J. C. Willison, P. M. Vignais, and T. A. Bickle.** 1991. Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **173**:2993-2999.
23. **Huergo, L.F., E.M. Souza, M.S. Araujo, F.O. Pedrosa, L.S. Chubatsu, M.B. Steffens, and M. Merrick.** 2006. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. *Mol. Microbiol.* **59**:326-337.
24. **Huergo, L.F., L.S. Chubatsu, E.M. Souza, F.O. Pedrosa, M.B. Steffens, and M. Merrick.** 2006. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. *Febs Lett.* **580**:5232-5236.
25. **Javelle, A., E. Severi, J. Thornton, and M. Merrick.** 2004. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. *J. Biol. Chem.* **279**:8530-8538.
26. **Jiang, P., J.A. Peliska, and A.J. Ninfa.** 1998. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**:12795-12801.

27. **Jouanneau, Y., C.M. Meyer, and P.M. Vignais.** 1983. Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion into an active and inactive form in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta* **749**:318-328.
28. **Jouanneau, Y., C. Roby, C.M. Meyer, and P.M. Vignais.** 1989. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem.* **267**:780-787.
29. **Kamberov, E.S., M.R. Atkinson, and A.J. Ninfa.** 1995. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J. Biol. Chem.* **270**:17797-17807.
30. **Klassen, G., E.M. Souza, M.G. Yates, L.U. Rigo, R.M. Costa, J. Inaba, and F.O. Pedrosa.** 2005. Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the GlnB nitrogen signal-transducing protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5637-5641.
31. **Klassen, G., E.M. de Souza, M.G. Yates, L.U. Rigo, J. Inaba, and F.O. Pedrosa.** 2001. Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **183**:6710-6713.
32. **Klipp, W., B. Masepohl, and A. Pühler.** 1988. Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. *J. Bacteriol.* **170**:693-699.
33. **Klopprogge, K., R. Grabbe, M. Hoppert, and R. A. Schmitz.** 2002. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. *Arch. Microbiol.* **177**: 223-234.

34. **Kranz, R. G., and D. Foster-Hartnett.** 1990. Transcriptional regulatory cascade of nitrogen-fixation genes in anoxygenic photosynthetic bacteria: oxygen- and nitrogen-responsive factors. *Mol. Microbiol.* **4**:1793-1800.
35. **Labes, M., A. Pühler, and R. Simon.** 1990. A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for Gram-negative bacteria. *Gene* **89**: 37-46.
36. **Livak K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* **25**:402-408
37. **Lowery, R.G., and P.W. Ludden.** 1988. Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **15**:16714-16719.
38. **Martin, D.E., and B. Reinhold-Hurek.** 2002. Distinct roles of P(II)-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. *J. Bacteriol.* **184**:2251-2259.
39. **Masepohl, B., W. Klipp, and A. Pühler.** 1988. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **212**:27-37.
40. **Masepohl, B., R. Krey, and W. Klipp.** 1993. The *draTG* gene region of *Rhodobacter capsulatus* is required for posttranslational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2667-2675.

41. **Masepohl, B., T. Drepper, A. Paschen, S. Groß, A. Pawlowski, K. Raabe, K.-U. Riedel, and W. Klipp.** 2002. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 243-248.
42. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics, p. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
43. **Ninfa, A.J., and M.R. Atkinson.** 2000. PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol.* **8**:172-179.
44. **Pawlowski A., K.-U. Riedel, W. Klipp, P. Dreiskemper, S. Groß, H. Bierhof, T. Drepper and B. Masepohl.** 2003. Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **185**: 5240-5247.
45. **Pierrard, J., P. W. Ludden, and G. P. Roberts.** 1993. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: existence of two independent regulatory effects of ammonium. *J. Bacteriol.* **175**:1358-1366.
46. **Pridmore, R.D.** 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**:309-312.
47. **Reyes, F., M.D. Roldan, W. Klipp, F. Castillo, and C. Moreno-Vivian.** 1996. Isolation of periplasmic nitrate reductase genes from *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: structural and functional differences among prokaryotic nitrate reductases. *Mol. Microbiol.* **19**:1307-1318.
48. **Saari, L.L., E.W. Triplett, and P.W. Ludden.** 1984. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the

- photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. J. Biol. Chem. **25**:15502-15508.
49. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
50. **Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad-host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Bio/technology **1**:784-791.
51. **Son, H.S., and S.G. Rhee.** 1987. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. J. Biol. Chem. **262**:8690-8695.
52. **Thomas, G., G. Coutts, and M. Merrick.** 2000. The *glnKamtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes. Trends Genet. **16**:11-14.
53. **Van Heeswijk, W.C., S. Hoving, D. Molenaar, B. Stegeman, D. Kahn, and H.V. Westerhoff.** 1996. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **21**:133-146.
54. **Van Heeswijk, W. C., D. Wen, P. Clancy, R. Jaggi, D. L. Ollis, H. V. Westerhoff, and S. G. Vasudevan.** 2000. The *Escherichia coli* Signal Transducers PII (GlnB) and GlnK form Heterotrimers in vivo: Fine Tuning the Nitrogen Signal Cascade. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 3942-3947.
55. **Vieira, J., and J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**:259-268.

56. **Wang, H., C.C. Franke, S. Nordlund, and A. Noren.** 2005. Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**:273-279.
57. **Weaver, P.F., J.D. Wall, and H. Gest.** 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **105**:207-216.
58. **Xu, Y., E. Cheach, P.D. Carr, W.C. Van Heeswijk, H.V. Westerhoff, S.G. Vasudevan, and D.L. Ollis.** 1998. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J. Mol. Biol.* **282**:149-165.
59. **Yakunin, A. F., and P. C. Hallenbeck.** 1998. Short-term regulation of nitrogenase activity by NH_4^+ in *Rhodobacter capsulatus*: multiple in vivo nitrogenase responses to NH_4^+ addition. *J. Bacteriol.* **180**:6392-6395.
60. **Yakunin, A. F., T. V. Laurinavichene, A. A. Tsygankov, and P. C. Hallenbeck.** 1999. The presence of ADP-ribosylated Fe-protein of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is correlated with cellular nitrogen status. *J. Bacteriol.* **181**:1994-2000.
61. **Yakunin, A.F., and P.C. Hallenbeck.** 2000. Regulation of nitrogenase activity in *Rhodobacter capsulatus* under dark microoxic conditions. *Arch. Microbiol.* **173**:366-372.
62. **Yakunin, A.F., and P.C. Hallenbeck.** 2002. AmtB is necessary for NH_4^+ -induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **182**: 4081-4088.

63. **Zhang, Y., E.L. Pohlmann, P.W. Ludden, and G.P. Roberts.** 2001. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. *J. Bacteriol.* **183**:6159-6168.
64. **Zhang, Y., D.M. Wolfe, E.L. Pohlmann, M.C. Conrad, and G.P. Roberts.** 2006. Effect of AmtB homologues on the post-translational regulation of nitrogenase activity in response to ammonium and energy signals in *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiol.* **152**: 2075-2089.
65. **Zhang, Y., E.L. Pohlmann, P.W. Ludden, and G.P. Roberts.** 2000. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **182**:983-992.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
S17.1	RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7	(50)
BL21 (DE3)	Host for overexpression of GlnB _{His6} and GlnK _{His6}	Novagen
<i>R. capsulatus</i>		
B10S	wild-type Sm ^r	(32)
BSRUB13	Δ <i>glnK</i>	This work
PHU332	<i>glnB</i> ::Km ^r	P. Hübner, Basel
RCAY22	<i>amtY</i> ::Gm ^r	(62)
RCAY63	<i>amtB</i> ::Km ^r	(62)
SG21	<i>glnK</i> ::Gm ^r	This work
TR3	<i>glnB</i> -Y51F <i>orf3528</i> ::Gm ^r	This work
Plasmids		
pAP2	pJB3TC20 derivative carrying <i>glnK</i> -Y51F and 300 bp of upstream sequence	This work
pAY98	pMECA derivative carrying <i>glnKamtB</i> ; Ap ^r	A. Yakunin
pBSRUB13	pNIRUB145 derivative carrying <i>lacZ</i> ^c expressed from a Km cassette; Gm ^r	This work
pBSRUB19	pPHU231 derivative carrying <i>amtB</i> and most of <i>glnK</i>	This work
pBSRUB21-I	pBSRUB19 derivative carrying <i>amtB</i> ^c expressed from a Km cassette	This work
pET-22b(+)	T7 expression vector; Ap ^r	Novagen
pJB3TC20	Broad-host range vector; mob Ap ^r Tc ^r	(5)
pK18	Cloning vector; Km ^r	(46)
pML5	Broad-host-range <i>lacZ</i> -fusion vector; mob Tc ^r	(35)
pNIRUB60-I	pUC18 derivative carrying <i>aphII</i> (Km ^r) of transposon Tn5	This work
pNIRUB142	pML5 derivative carrying <i>lacZ</i> ^c expressed from a Km cassette	
pNIRUB143	pSUP202 derivative carrying most of <i>amtB</i>	This work
pNIRUB144	pNIRUB143 derivative carrying <i>glnK</i> ::Gm ^r <i>amtB</i>	This work
pNIRUB145	pNIRUB144 derivative with a 228 bp deletion in <i>glnK</i>	This work
pPHU231	Broad-host range vector; mob Tc ^r	(47)
pSG5IIa	pUC18 derivative carrying <i>glnK</i> ::Gm ^r ; Ap ^r	This work
pSG18	pK18 derivative carrying most of <i>amtB</i>	This work
pSGNJ1	pSVB10 derivative carrying <i>glnK-amtB</i> ; Ap ^r	This work
pSUP202	Mobilizable cloning vector; mob Tc ^r Ap ^r Cm ^r	(50)
pSV5	pET-22b(+) derivative carrying <i>glnB</i> _{his6}	This work
pSV6	pET-22b(+) derivative carrying <i>glnK</i> _{his6}	This work
pSVB10	Cloning vector; Ap ^r	(2)
pTR9	pK18 derivative carrying 5' part of <i>glnB</i> and <i>orf3528</i>	This work
pTR10	pUC18 derivative carrying 3' part of <i>glnB</i>	This work
pTR11	pTR9 derivative carrying Gm ^r from pWKR440 inserted into <i>orf3528</i>	This work
pTR12	pTR10 derivative; mob Tc ^r	This work
pTR14-I	pTR12 derivative carrying <i>glnB</i> -Y51F and <i>orf3528</i> ::Gm ^r	This work
pUC18	Cloning vector, Ap ^r	(55)
pWKR56-I	Mobilizable cloning vector; mob Tc ^r	(32)
pWKR440	pACYC derivative carrying Gm ^r Tc ^r	(11)

Table 2. Activity of Mo-nitrogenase in presence of a constitutively expressed AmtB

Strain	Relevant genotype	Nitrogenase activity ^a	
		+ NH ₄ ^{+b}	- NH ₄ ^{+c}
B10S	wild-type	3.0 ± 1.6	619 ± 80.5
PHU332	<i>glnB</i>	0.7 ± 0.1	725 ± 13.0
BSRUB13	<i>glnK</i>	1.9 ± 0.3	599 ± 20.7
B10S (pBSRUB21-I)	<i>PaphII::amtB</i>	0.8 ± 0.1	657 ± 55.5
PHU332 (pBSRUB21-I)	<i>glnB PaphII::amtB</i>	1.2 ± 0.1	572 ± 20.1
BSRUB13 (pBSRUB21-I)	<i>glnK PaphII::amtB</i>	70 ± 4.6	718 ± 13.0

^a Activities are given in nmol of produced ethylene/h/mg protein. Values are means of at least three independent experiments ± standard deviations

^b Strains were cultivated in RCV medium plus 20 mM NH₄⁺.

^c Strains were cultivated in RCV medium plus 9.5 mM serine.

Figure legends

Fig. 1. Nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation of NifH in *glnB* and *glnK* mutants. *R. capsulatus* cells were grown under N₂-fixing conditions. Gas samples were withdrawn at the indicated times and assayed for in vivo nitrogenase activity by the acetylene reduction method. Acetylene was added at time 0. For panels A to D, NH₄Cl was added to 200 μM at 25 min. (A) Wild-type (B10S). (B) *glnB* (PHU332). (C) *glnK* (BSRUB13). (D) *glnK51* (GlnK-Y51F; BSRUB13/pAP2). For panel E and F, NH₄Cl was added to 50 mM at 25 min. (E) *glnB* (PHU332). (F) *glnK* (BSRUB13). The ADP ribosylation state of NifH was monitored for wild-type (B10S), *glnB* (PHU332), *glnK* (BSRUB13) and *glnK51* (GlnK-Y51F; BSRUB13/pAP2) mutants (G). Where indicated, NH₄Cl was added to 50 mM at 25 min.

Fig. 2. Role of AmtB and AmtY in the membrane sequestration of GlnB and GlnK. Two parallel cultures of *R. capsulatus* wild type (B10S) and *amtB* (RCAY63) and *amtY* (RCAY22) mutants were grown under N₂ fixing conditions. NH₄Cl (1 mM) was added to one of the parallel cultures 15 min prior to harvest. Cytoplasmic (C) and membrane (M) fractions were subjected to SDS-PAGE (5 μg of total protein loaded per well) followed by Western blotting with anti-GlnB (A) or anti-GlnK antibody (B). Wild-type (B10S) cells grown in N₂-fixing conditions was collected 30 minutes after being exposed to darkness. Cytoplasmic and membrane fractions were subjected to SDS-PAGE (5 μg of total protein loaded per well) and Western blotting with anti-GlnB or anti-GlnK antibody (C).

Fig. 3. Interaction of PII homologs with the membrane in *glnK* and *glnB* mutants. Two parallel cultures of *R. capsulatus* wild type (B10S) and *glnB* (PHU332), *glnK* (BSRUB13), and *glnK51* (GlnK-Y51F; BSRUB13/pAP2) mutants were grown under N₂ fixing conditions. NH₄Cl (1 mM) was added to one of the parallel cultures 15 min prior to harvest. Cytoplasmic (C) and membrane (M) fractions were subjected to SDS-PAGE (5 μg of total protein loaded per well) and Western immunoblotting with anti-GlnB (A) or anti-GlnK (B) antibody. Cytoplasmic (C) and membrane (M) fractions of wild-type (B10S) and *glnK* mutant

(BSRUB13) were subjected to native PAGE (5 μ g of total protein loaded per well) followed by Western immunoblotting with anti-GlnB antibody (C). Whole-cell extracts from culture of wild-type (B10S) and *glnB* (PHU332), *glnK* (BSRUB13), and *glnK51* (GlnK-Y51F; BSRUB13/pAP2) mutants exposed or not for 15 min to 1 mM NH₄Cl were analysed by native PAGE (5 μ g of total protein loaded per well) and Western blotting with anti-GlnB (D) or anti-GlnK (E) antibody.

Figure 1

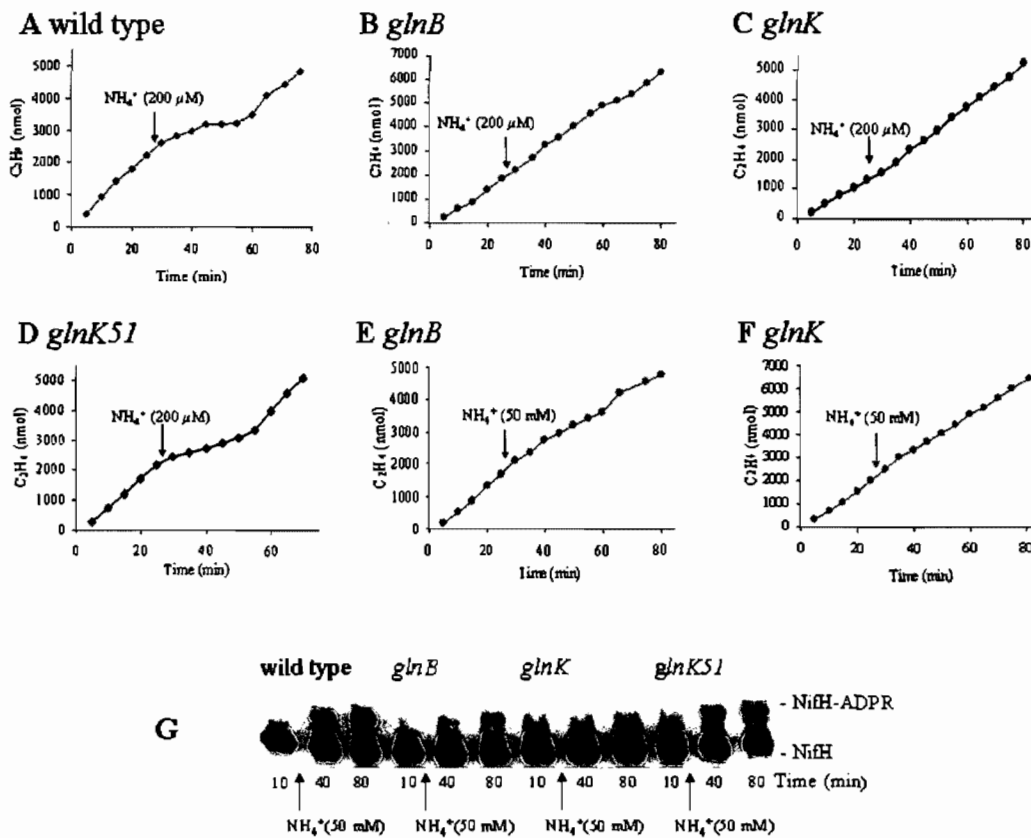


Figure 2

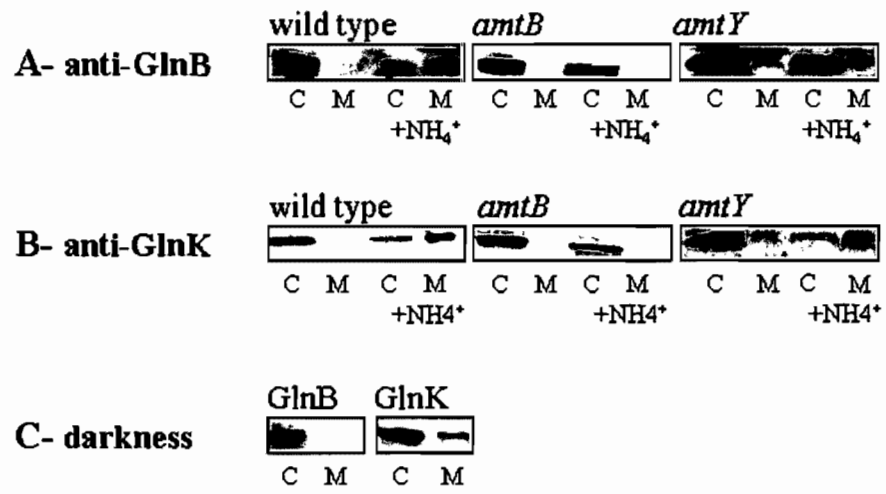
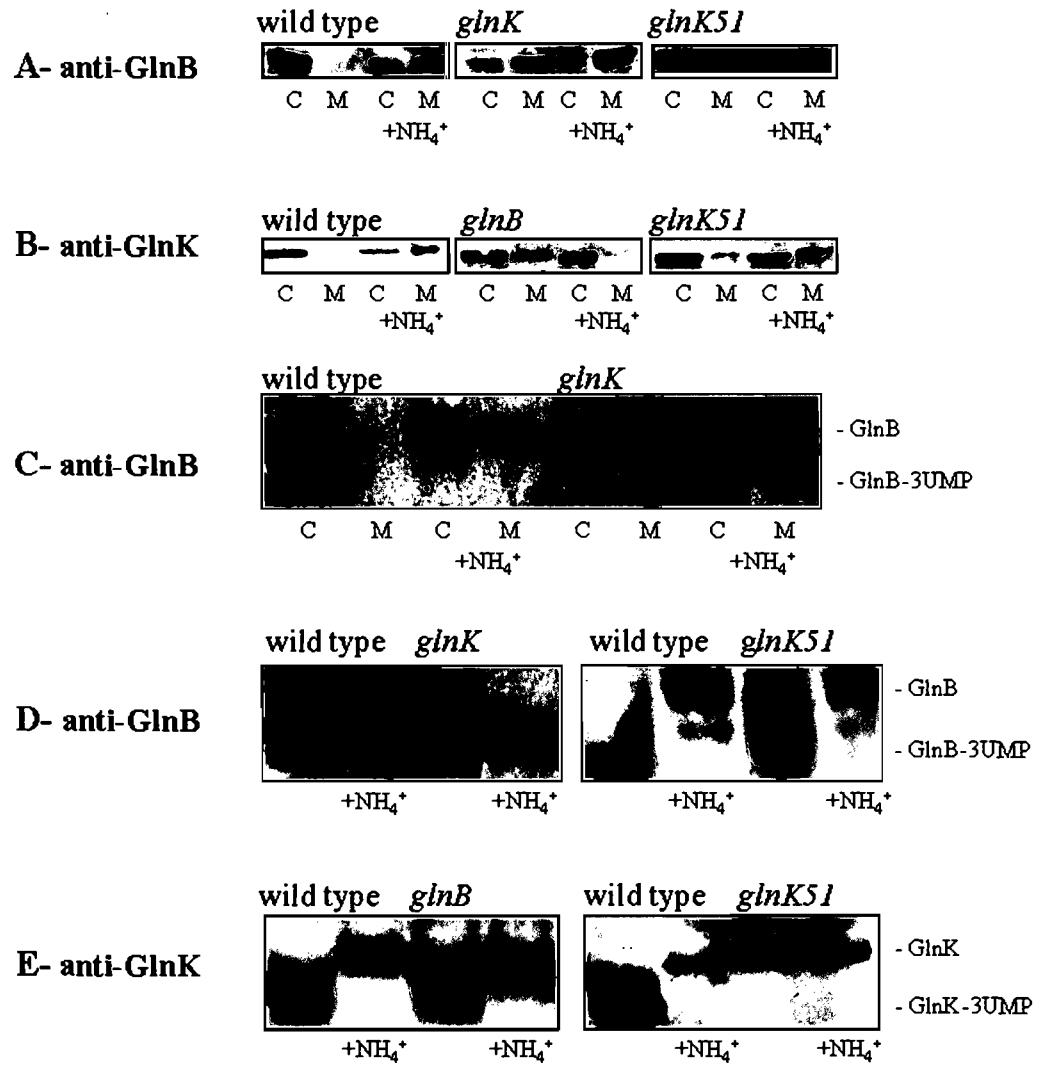


Figure 3



Ammonia-induced formation of an AmtB-GlnK complex is not sufficient for nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*.

Une série de variants AmtB de *Rhodobacter capsulatus* a été construite et étudiée pour vérifier les effets de différentes mutations sur le transport du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, sur la formation du complexe AmtB-GlnK, sur la régulation de l'activité de la nitrogénase molybdène et sur l'ADP-ribosylation de NifH. Confirmant les résultats obtenus avec AmtB d'*Escherichia coli*, les résidus H193 et H342 sont essentiels pour le transport du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ alors que la substitution de l'aspartate 185 pour un glutamate réduit cette activité. Dans cet article nous démontrons pour la première fois que quelques acides aminés (F131, D334 et D335) pressentis pour être critique dans diverses fonctions d'AmtB, sont essentiels au transport du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. La délétion complète ou partielle de la queue C-terminale réduit le transport du méthylammonium, prévient la formation du complexe AmtB-GlnK, abolit la régulation posttraductionnelle de la nitrogénase molybdène et l'ADP-ribosylation de NifH. Au contraire, le variant D185E, avec un taux de transport réduit, est capable de participer à l'association avec GlnK et à la régulation de la nitrogénase molybdène. Ces observations renforcent la notion selon laquelle le transport du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ par AmtB est insuffisant pour permettre la régulation de la nitrogénase molybdène et qu'il doit y avoir formation d'un complexe GlnK-AmtB. Quelques variants incompetents pour le transport, i.e. F131A, H193A et H342A, séquestrent GlnK après un choc NH_4^+ mais sont incapable d'assurer une régulation standard de la nitrogénase molybdène. Ces résultats montrent que la formation du complexe AmtB-GlnK est en soi insuffisante pour la régulation de la nitrogénase et suggèrent que le transport partiel du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ et/ou l'occupation du pore par le NH_3 sont essentiels à cette fonction d'AmtB.

Publié dans Journal of Bacteriology, mars 2008.


Ammonia-induced Formation of an AmtB-GlnK Complex is not sufficient for Nitrogenase Regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*

Pier-Luc Tremblay, and Patrick C. Hallenbeck*

Département de microbiologie et
immunologie, Université de Montréal,
Montréal, Québec H3C 3J7 Canada

Running title: *R. capsulatus* AmtB variants and nitrogenase regulation

Byline: PL Tremblay, PC Hallenbeck

*Corresponding author. Mailing address: Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada. Phone : (514) 343-6278. Fax : (514) 343-5701. E-mail:


Abstract

A series of *Rhodobacter capsulatus* AmtB variants were created and assessed for effects on ammonia transport, formation of AmtB-GlnK complexes, and regulation of nitrogenase activity and NifH ADP-ribosylation. Confirming previous reports, H193 and H342 were essential for ammonia transport, and the replacement of aspartate 185 with glutamate reduced ammonia transport. Several amino acid residues, F131, D334 and D335, predicted to be critical for AmtB activity, are shown here for the first time by mutational analysis to be essential for transport. Alterations to the C-terminal tail reduced methylamine transport, prevented AmtB-GlnK complex formation, and abolished nitrogenase switch-off and NifH ADP-ribosylation. On the other hand, D185E, with a reduced level of transport, was capable of forming an ammonium-induced complex with GlnK, and regulating nitrogenase. This reinforces the notion that ammonia transport is not sufficient for nitrogenase regulation and that formation of an AmtB-GlnK complex is necessary for these processes. However, some transport incompetent AmtB variants, F131A, H193A and H342A, form ammonium-induced complexes with GlnK but fail to properly regulate nitrogenase. These results show that formation of an AmtB-GlnK complex is insufficient in itself for nitrogenase regulation, and suggest that partial ammonia transport, or occupation of the pore by ammonia is essential for this function.

Introduction

AmtB of the purple non-sulfur bacterium, *Rhodobacter capsulatus*, is a member of the ammonium transporters (Amt)/methylamine permeases (MEP) family. Present in bacteria, archaea and eukaryotes (29), proteins of this family are homotrimers that transport ammonium through the cytoplasmic membrane. The crystal structures of AmtB of *Escherichia coli* and of Amt-1 of *Archaeoglobus fulgidus* reveal a cluster of 11 transmembrane helices organized around a hydrophobic pore (1, 18, 42) which has been proposed to act as a channel that allows transport of NH_3 (18, 21, 36, 41, 42). In this model, NH_4^+ binds to residues located inside a periplasmic vestibule, is deprotonated and is subsequently reprotonated on the cytoplasmic side. However, details of this transport process, including the nature of the transported species (NH_4^+ or NH_3), are still subject to debate (4, 5, 12, 20, 22). Our previous study, showing that nitrogen-fixing cultures of a *R. capsulatus amtB* strain accumulated extracellular ammonium whereas wild-type cultures did not, supports a role for AmtB in active ammonium uptake (38), and likewise, many studies have shown that a proton gradient seems essential, implying some type of active transport process.

In some organisms, Amt proteins have also been implicated in the posttranslational regulation of nitrogenase (15, 34, 38). Inactivation of *amtB* of *R. capsulatus* results in the abolition of NifH ADP-ribosylation-dependent and – independent nitrogenase switch-off (38). A similar effect is obtained when either of the PII proteins, GlnB or GlnK, two soluble trimeric proteins playing a central regulatory role in the regulation of nitrogen metabolism, is inactivated (10, 33). Membrane fractionation and pull-down experiments reveal the sequestration of PII proteins by AmtB after the addition of ammonium (9, 15, 17, 33, 34). The crystal structure of the *E. coli* GlnK-AmtB complex shows the docking of the PII protein via its T-loop into the cytoplasmic pore exit of AmtB (7, 13). In *Azospirillum brasilense* and *Rhodospirillum rubrum*, sequestration of PII proteins by AmtB is also directly linked to ADP-ribosylation-dependent switch-off of nitrogenase since complex formation is necessary for the capture of DraG, the enzyme responsible for removing

the ADP-ribosyl residue from NifH, and reactivating nitrogenase (15, 28, 34). To further characterize the role of *R. capsulatus* AmtB in ammonia transport and the posttranslational regulation of nitrogenase, variants of AmtB with amino acid substitutions for some highly conserved residues, or alterations to its C-terminus, were created and studied. Correlating the results of the analysis of ammonia transport, formation of complexes with GlnK, and nitrogenase regulation by these variant AmtB proteins reveals that formation of a GlnK-AmtB complex is not sufficient to trigger nitrogenase regulation. Moreover, there is a correspondence between the capacity of AmtB to conduct ammonia and its ability to properly regulate nitrogenase.

Materials and Methods

Bacterial strains, growth conditions and DNA manipulation

Except where mentioned otherwise, *E. coli* strains were cultivated in LB medium with the appropriate antibiotics. *Rhodobacter capsulatus* strains were maintained in YPS medium (35). For all the experiments with *R. capsulatus*, cultures were grown photoheterotrophically to early stationary phase at 30 °C in RCV-lactate medium without fixed nitrogen (40). Conjugal transfer of plasmids from *E. coli* S17.1 to *R. capsulatus amtB* strain (RCAY63) was achieved by filter mating (24). DNA manipulation followed previously described standard procedures (30).

Mutagenesis and construction of plasmids

C-terminal deletions in *R. capsulatus* AmtB were obtained by PCR. The complete *glnKamtB* operon with its *ntr*-dependent promoter and a deletion of either 81 or 21 nucleotides at the 3' end of *amtB* was amplified using pAY98 as a template with the appropriate forward and reverse primers containing PstI and EcoRI sites, and cloned as approximately 2-kb PstI-EcoRI fragments in the conjugational vector pJB3TC20 resulting in pPLT2 (81 nt. deletion) or pPLT28 (21 nt. deletion).

Site-directed mutagenesis was achieved by overlap extension PCR. The 5' part of *amtB*, a complete copy of *glnK* and the *ntr* promoter of the *glnKamtB* operon

were cloned as a 0.8-kb PstI-SalI fragment from pAY98 into pMECA resulting in pPLT2III. For each site-directed mutation, *amtB* without its 5' part was amplified and modified by using pAY98 as a template and the appropriate forward and reverse primers carrying SalI and EcoRI sites. Following overlap extension PCR, the resulting 1.4-kb SalI-EcoRI fragments were cloned into pPLT2III. Then, the complete *glnKamtB* operon for each variant was cloned as a 2.4-kb PstI-EcoRI into conjugational vector pJB3TC20 resulting in pPLT6 (D334A, D335A), pPLT9 (R146A), pPLT31 (D185E), pPLT41 (H193A), pPLT47 (F131A) and pPLT49 (H342K). The presence of the correct sequence change was verified by sequencing.

pPLT26 contains *amtB* with a thrombin cleavage site and a histidine tag at its C-terminal end under the control of the T7 promoter. The appropriate PCR product was obtained using pAY98 as a template and primers containing NdeI and HindIII sites, a histidine tag, and thrombin cleavage site. The resulting 1.4-kb NdeI-HindIII fragment was cloned into pT7-7. The validity of the construction was verified by sequencing. For expression in *R. capsulatus*, a 1.38-kb SalI-HindIII of pPLT26 encompassing the histidine tagged *amtB* was cloned into pBluescript KS- resulting in pPLT30. Then, the same fragment with EcoRI as the 3' restriction site instead of HindIII was cloned from pPLT30 into pPLT2III. A 2.3-kb PstI-EcoRI fragment bearing the complete *glnKamtB* operon with the *ntr* promoter and the C-terminally histidine-tagged variant of *amtB* was cloned in pJB3TC20 resulting in pPLT33.

AmtBHis overexpression, purification, and antibody production

pPLT26 was transformed into C43 and for AmtBHis overexpression, cells were grown as described by Blakey et al., 2002 (3). Collection of cells, fractionation, membrane solubilization and purification (with dodecyl maltoside as nonionic detergent) of AmtBHis with Talon resin (Clontech, Mississauga, Ontario, Canada) was carried out as previously described (25). The specificity of antibody raised in rabbits against purified AmtBHis was confirmed by the absence of a signal in a Western blot of an *amtB* strain cell extract.

Gel electrophoresis analyses

Ammonium treatment and subsequent cellular fractionation were carried out as previously described (33). Protein concentration was measured by the Bradford reaction (6). A 5- μ g sample of total protein was loaded per well for all SDS-PAGE experiments. SDS-PAGE and then probing of immunoblots with anti-GlnK antibody (33) were done with 15% polyacrylamide gels, whereas 10% polyacrylamide gels were used when the protein studied was AmtB. After SDS-PAGE, proteins were electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Roche, Mississauga, Ontario, Canada) and signals were detected with the ECL enhanced chemiluminescence system (Amersham, Oakville, Ontario, Canada) by using Kodak Biomax XAR film. For quantification, signals were digitized with a Chemi Imager 5500 (Alpha Innotech, San Leandro, CA) and quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). This method was used for quantification of various AmtB proteins and GlnK with reference to a standard curve of signal intensities generated by applying different quantities of purified proteins.

Methylammonium transport, in vivo nitrogenase activity, and NifH ADP-ribosylation

[¹⁴C]methylamine uptake was measured as described previously (27). Radioactivity of the samples was counted with a Beckman LS 6000SC scintillation counter. Procedures for in vivo nitrogenase activity assay by gas chromatography and determination of NifH ADP-ribosylation status by Western blots were previously described (38).

Results

AmtB variants studied

A number of regions or amino acid residues of AmtB potentially associated with ammonium recruitment and transport, or with interaction with GlnK, were

targeted by mutagenesis (Table 1). The roles proposed for the various amino acid residues indicated in Table 1 were derived from crystallographic studies, mutational analysis, or computational modeling of *E. coli* AmtB as indicated. Here we use the numbering of *R. capsulatus* AmtB, the corresponding *E. coli* residues are indicated in Table 1. The recently published three-dimensional structure of an *E. coli* AmtB-GlnK complex shows that in this complex the cytoplasmic C-terminal tail serves several structural roles, with contacts with the cytoplasmic faces of several helices of the same monomer and with the neighboring subunit such that the last 6 residues of the C-terminal tail of *E. coli* AmtB are part of the cytoplasmic pore exit of the adjacent subunit (7). Minor changes in this region of *E. coli* AmtB reduce methylamine transport rates (31). Both the entire C-terminal cytoplasmic tail ($\Delta 403-430$), and the last seven amino acid residues ($\Delta 423-430$) of *R. capsulatus* AmtB were targeted by deletion mutagenesis. H193 and H342 are located inside the pore and presumably serve as proton acceptors or agents of weak stabilization between the substrate and the protein (4, 16, 18, 42). Mutation of these residues abolishes ammonia transport by *E. coli* AmtB (16). Possible functions of F131 identified by a combination of crystallographic and computational studies are to structurally block the periplasmic side of the pore, rotating to allow passage of ammonia, and to prevent hydration of the pore after ammonium deprotonation (4, 18, 42). Analysis of X-ray crystallographic structures suggest that D185 plays a structural role in the periplasmic site that recruits ammonium (18, 42). Moreover, molecular dynamics simulations show that D185 could become, upon a switch in the structure of the recruitment vestibule induced by the entrance of ammonium, the ultimate proton acceptor for ammonium (21, 26). The structure of AmtB shows a quasi-twofold symmetry caused by a presumed ancient gene duplication (16); thus the counterpart of D185 is the highly conserved D335. Because of similarities in terms of structural roles between D185 and D335, Khademi and Stroud (2006) (19) suggest that D335 could also become available for interaction with substrate after a structural change, and thus could participate in the reprotonation of ammonia in the cytoplasmic vestibule. R146, highly conserved in the Amt/Mep family, but with no assigned putative function as yet, was also targeted.

Methylamine transport by AmtB variants

Since GlnK and AmtB form complexes under some conditions, their relative proportion in the cell may be critical. Therefore the different AmtB variants were expressed as plasmid-borne *glnKamtB* operons in an *amtB* strain of *R. capsulatus* (RCAY63). Quantitative analysis showed that this strategy was successful, with the same relative ratio of GlnK/AmtB in cells expressing these proteins from plasmid-borne *glnKamtB* (4.15 ± 0.7) as the wild-type strain expressing these proteins from *glnKamtB* on the chromosome (4.2 ± 0.6). Moreover, the total AmtB accumulated when expressed from a plasmid was not much greater (1.5 ± 0.4 fold) than that of the wild-type strain with a chromosomally located operon, suggesting that the results obtained could reasonably be extrapolated to the wild type physiology. Levels of accumulation of AmtB variants were checked by Western blotting of SDS-PAGE gels (Fig. 1A) and membrane localization was determined by fractionation experiments. All of the variants studied, except R146A, were shown to be correctly localized to the membrane (not shown) and appeared to accumulate at significant (50% or greater) levels compared to the wild-type protein (plasmid-borne wild-type *glnKamtB*) (Fig. 1). The relative level of accumulation of the AmtB R146A variant is only $25\% \pm 5\%$ (Fig. 1A and B). Apparently, this conserved residue located in the M3-M4 cytoplasmic loop is essential for protein stability. AmtB proteins with C-terminal deletions ($\Delta 403-430$, $\Delta 423-430$) apparently accumulated at somewhat reduced levels (approximately 50%) (Fig. 1A and B), similar results have been noted in *E. coli* (9, 31). Except for D334A and D335A ($57\% \pm 8\%$) all the other variants (D185E, AmtBHis, H193A, F131A, H342K) were present at nearly wild-type levels, varying between $\sim 75\%$ and $\sim 90\%$ (Fig. 1A-B).

The transport capabilities of the AmtB variants were assessed by using a methylamine transport assay (38). Complete ($\Delta 403-430$) and partial ($\Delta 423-430$) C-terminal deletion AmtB proteins are still functional for methylamine transport with, respectively, 26% and 57% of the transport capability of the wild type protein (Table 2). Addition of a histidine tag at the C-terminal end of *R. capsulatus* AmtB appears to deregulate methylamine transport with a 1.9-fold greater rate than wild type AmtB

(Table 2). In agreement with results obtained with *E. coli* AmtB and yeast Mep2 (17, 23), replacement of aspartate 185 with glutamate reduces the methylamine transport rate of *R. capsulatus* AmtB by ~ 50% (Table 2). As in *E. coli* (16), substitution at either residue H193 or H342 of *R. capsulatus* AmtB abolishes methylamine transport (Table 2). Here we report the first mutational analysis of F131. In agreement with its predicted critical role, replacement of F131 by alanine abolishes methylamine transport (Table 2). Introducing a double D334A D335A substitution in *R. capsulatus* AmtB also abolishes methylamine transport (Table 2), suggesting that these two residues, which are highly conserved in the Amt/Mep protein family, are functionally important.

Formation of AmtB-GlnK complexes

The question arose as to whether AmtB variants showing some transport activity were capable of forming ammonium-induced complexes with GlnK. As well, recent results suggest that AmtB-GlnK interactions are governed by metabolite pools and the modification status of the PII protein (11, 14, 37). In an *R. capsulatus* *amtB* mutant strain that is incapable of nitrogenase regulation, sufficient ammonium enters the cell upon its addition to 1mM to trigger the proper regulation of glutamine synthetase (38) and is sufficient to cause the efficient deuridylylation of GlnK (Tremblay and Hallenbeck, unpublished results). This suggested that AmtB-GlnK complex formation could possibly occur upon ammonium addition to cultures of transport incompetent AmtB variant strains. Therefore, the ability of the various AmtB variants to form complexes with GlnK upon addition of ammonium was tested by membrane fractionation experiments.

These analyses show that, similar to *E. coli* (9, 31), complete (Δ 403-430), or partial (Δ 423-430), deletions of the C-terminal tail completely abolished the membrane sequestration of GlnK (Fig. 2D). Models based on crystallographic studies reveal that the C-terminal region of one subunit of the AmtB homotrimer forms part of the docking bay of the next subunit in which the T loop of the PII protein anchors itself (1, 7, 13). Fractionation experiments with AmtB^{His}, possessing a C-terminal

histidine tag, shows that GlnK is not sequestered to membranes containing this variant after an ammonium shock (Fig. 2D). Since docking of GlnK to AmtB blocks the ammonium transport pore, thereby downregulating ammonia transport, addition of a histidine tag probably physically blocked the formation of a GlnK-AmtB complex (7, 13). As well, GlnK interaction with AmtB D334A D335A was also completely absent (Fig. 2D). Crystallographic studies of free *E. coli* AmtB versus the AmtB-GlnK complex show a significant change in the conformation of the transporter's cytoplasmic face (7, 18, 42). D334 participates in this rearrangement by forming salt-bridge interactions with other conserved residues (7). This could explain the lack of interaction of GlnK with AmtB D334A D335A.

Four of the AmtB variants, H193A, D185E, F131A, and H342K, were capable of forming complexes with GlnK (Fig. 2A and C). The level of GlnK present in the cell was similar in all of these variants (Fig. 2B). Densitometric analysis showed that, although in all cases substantial amounts were bound, the relative amounts of GlnK in the complexes varied somewhat between the variants. Relative to wild type AmtB (100%), membrane-bound GlnK in H193A, D185E, F131A and H342K AmtB variants was, respectively, $103\% \pm 12\%$, $61\% \pm 6\%$, $59\% \pm 3\%$ and $50\% \pm 4\%$ (Fig. 2A and C). Interestingly, there did not seem to be a correlation between AmtB transport activity and complex formation with GlnK. H193A, F131A and H342K, which were negative for transport, all formed complexes with GlnK, as did D185E, which retains substantial transport activity (Table 2).

Nitrogenase switch-off and NifH ADP-ribosylation in AmtB

R. capsulatus possesses two different systems implicated in the regulation of nitrogenase activity, one that is linked to ADP-ribosylation of NifH and one that is independent of this covalent modification (39). Both responses can be provoked by the addition of ammonium to the medium, and the relative importance of the two responses varies with the growth conditions (39). However, the formation of an AmtB-GlnK complex plays a key role since an AmtB⁻ strain (38), or a GlnK⁻ strain where deuridylylated GlnK is not sequestered by the membrane (33), are deficient in

both responses even though, as previously shown (38), ammonia is entering the cell. Therefore, formation of an AmtB-GlnK complex is necessary for nitrogenase regulation. Thus, it was of interest to examine ammonium-induced switch-off of nitrogenase activity and ADP-ribosylation of NifH in the AmtB variants studied here. Nitrogenase activity was measured by the acetylene reduction method, switch-off was triggered by the addition of 200 μM NH_4Cl , and ADP-ribosylation of NifH was monitored electrophoretically (38). With the exception of AmtB D185E, all the mutants are negative for Mo-nitrogenase switch-off (Table 2) and NifH ADP-ribosylation (Fig.3). Similar ADP-ribosylation results were obtained with 1 mM ammonium (not shown) and are typical for what is observed with a wild type strain with *glnKamtB* on the chromosome (38, 39). Thus the only AmtB variant capable of forming a complex with GlnK that is competent for proper regulation of nitrogenase switch-off and NifH-ADP ribosylation, D185E, is the variant that retains substantial transport activity.

Discussion

Here we have investigated the role of some key residues in ammonium transport by *R. capsulatus* AmtB, in AmtB-GlnK complex formation, and in nitrogenase regulation. The different *R. capsulatus* AmtB variants created and studied here corroborate previous studies with *E. coli* AmtB and shed new light on the role(s) of some amino acid residues highly conserved in the Amt/Mep family. Since we wished to examine nitrogenase regulation in these variants, it was important to verify experimentally that changing the homologous residues of *R. capsulatus* AmtB produced similar effects on methylamine transport and GlnK complex formation to what has been observed with the *E. coli* protein. Absolutely conserved residues H193 and H342, critical for ammonia transport in *E. coli* (16), are also required for ammonia transport by *R. capsulatus* AmtB. As previously reported for *E. coli* (17), changing highly conserved aspartate 185 to glutamate residue reduces methylamine uptake. Several studies have shown the importance of the C-terminal cytoplasmic tail of *E. coli* AmtB in optimal ammonia transport (7, 9, 31), and similar results are seen with either a full or a partial deletion of this region in *R. capsulatus*

AmtB. Highly conserved AmtB amino acid residues not previously studied by mutational analysis, F131, D334 et D335 have also been examined here, and have now been shown to be indispensable for ammonia transport.

Evidence is accumulating that AmtB-GlnK complexes play a critical role in the posttranslational regulation of nitrogenase in some organisms. A model is emerging in which the AmtB and PII proteins control the activities of the enzymes involved in NifH modification, DraG and DraT, with AmtB and a PII protein being required for the ammonium-induced membrane sequestration of DraG in both *A. brasilense* (14, 15) and *R. rubrum* (34). Similar events are likely to occur in *R. capsulatus* since AmtB is absolutely required for proper nitrogenase regulation (38), and its ammonium-induced membrane sequestration of GlnK appears to be critical in this process (33).

The results obtained with AmtB variants with the C-terminal tail partially or completely deleted or AmtBHis clearly demonstrate that, in spite of various levels of methylamine uptake, without GlnK-AmtB complex formation, there is no posttranslational regulation of nitrogenase. On the other hand, examination of the AmtB F131A, H193A, and H342A variants show that GlnK sequestration after ammonium shock is not sufficient to ensure nitrogenase switch-off and NifH ADP-ribosylation. The absolute amount of GlnK sequestered to the membrane seems to be relatively unimportant. AmtB D185E appears to have a lower level of membrane bound GlnK than the wild type, yet it is fully capable of regulating nitrogenase, while AmtB H193A, which has wild type levels of GlnK sequestration after ammonium shock, is completely incapable of nitrogenase switch-off or NifH ADP-ribosylation.

These results strongly suggest that, in addition to its complex formation with GlnK, partial ammonia transport by AmtB is absolutely required for the posttranslational regulation of nitrogenase in response to an ammonium shock. This raises the questions; how much ammonia progression through the channel is necessary, and what the signal transduction pathway is. The results obtained with

D185E AmtB suggest that the events in ammonia transport by AmtB associated with nitrogenase regulatory processes occur downstream of NH_4^+ binding inside the periplasmic vestibule. Regardless of what the details may ultimately prove to be, here we have shown that ammonia transport by AmtB appears to be required for its role as an ammonium sensor in triggering nitrogenase switch-off and NifH ADP-ribosylation in *R. capsulatus*.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Council.

References

1. **Andrade, S. L., A. Dickmanns, R. Ficner, and O. Einsle.** 2005. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**:14994-9.
2. **Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol. Biol. **340**:783-95.
3. **Blakey, D., A. Leech, G. H. Thomas, G. Coutts, K. Findlay, and M. Merrick.** 2002. Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. Biochem. J. **364**:527-35.
4. **Bostick, D. L., and C. L. Brooks, 3rd.** 2007. Deprotonation by dehydration: the origin of ammonium sensing in the AmtB channel. PLoS Comput. Biol. **3**:e22.
5. **Bostick, D. L., and C. L. Brooks, 3rd.** 2007. On the equivalence point for ammonium (de)protonation during its transport through the AmtB channel. Biophys. J. **92**:L103-5.

6. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-54.
7. **Conroy, M. J., A. Durand, D. Lupo, X. D. Li, P. A. Bullough, F. K. Winkler, and M. Merrick.** 2007. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:1213-8.
8. **Conroy, M. J., S. J. Jamieson, D. Blakey, T. Kaufmann, A. Engel, D. Fotiadis, M. Merrick, and P. A. Bullough.** 2004. Electron and atomic force microscopy of the trimeric ammonium transporter AmtB. *EMBO Rep.* **5**:1153-8.
9. **Coutts, G., G. Thomas, D. Blakey, and M. Merrick.** 2002. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J.* **21**:536-45.
10. **Drepper, T., S. Gross, A. F. Yakunin, P. C. Hallenbeck, B. Masepohl, and W. Klipp.** 2003. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiol.* **149**:2203-12.
11. **Durand, A., and M. Merrick.** 2006. In vitro analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. *J. Biol. Chem.* **281**:29558-67.
12. **Fong, R. N., K. S. Kim, C. Yoshihara, W. B. Inwood, and S. Kustu.** 2007. The W148L substitution in the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB increases flux and indicates that the substrate is an ion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:18706-11.

13. **Gruswitz, F., J. O'Connell, 3rd, and R. M. Stroud.** 2007. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:42-7.
14. **Huergo, L. F., M. Merrick, F. O. Pedrosa, L. S. Chubatsu, L. M. Araujo, and E. M. Souza.** 2007. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **66**:1523-35.
15. **Huergo, L. F., E. M. Souza, M. S. Araujo, F. O. Pedrosa, L. S. Chubatsu, M. B. Steffens, and M. Merrick.** 2006. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. *Mol. Microbiol.* **59**:326-37.
16. **Javelle, A., D. Lupo, L. Zheng, X. D. Li, F. K. Winkler, and M. Merrick.** 2006. An unusual twin-his arrangement in the pore of ammonia channels is essential for substrate conductance. *J. Biol. Chem.* **281**:39492-8.
17. **Javelle, A., E. Severi, J. Thornton, and M. Merrick.** 2004. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. *J. Biol. Chem.* **279**:8530-8.
18. **Khademi, S., J. O'Connell, 3rd, J. Remis, Y. Robles-Colmenares, L. J. Miercke, and R. M. Stroud.** 2004. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* **305**:1587-94.
19. **Khademi, S., and R. M. Stroud.** 2006. The Amt/MEP/Rh family: structure of AmtB and the mechanism of ammonia gas conduction. *Physiology (Bethesda)* **21**:419-29.
20. **Lamoureux, G., M. L. Klein, and S. Berneche.** 2007. A stable water chain in the hydrophobic pore of the AmtB ammonium transporter. *Biophys. J.* **92**:L82-4.

21. **Lin, Y., Z. Cao, and Y. Mo.** 2006. Molecular dynamics simulations on the *Escherichia coli* ammonia channel protein AmtB: mechanism of ammonia/ammonium transport. *J. Am. Chem. Soc.* **128**:10876-84.
22. **Luzhkov, V. B., M. Almlöf, M. Nervall, and J. Aqvist.** 2006. Computational study of the binding affinity and selectivity of the bacterial ammonium transporter AmtB. *Biochemistry US* **45**:10807-14.
23. **Marini, A. M., M. Boeckstaens, F. Benjelloun, B. Cherif-Zahar, and B. Andre.** 2006. Structural involvement in substrate recognition of an essential aspartate residue conserved in Mep/Amt and Rh-type ammonium transporters. *Curr. Genet.* **49**:364-74.
24. **Masepohl, B., W. Klipp, and A. Puhler.** 1988. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **212**:27-37.
25. **Niegowski, D., M. Hedren, P. Nordlund, and S. Eshaghi.** 2006. A simple strategy towards membrane protein purification and crystallization. *Int. J. Biol. Macromol.* **39**:83-7.
26. **Nygaard, T. P., C. Rovira, G. H. Peters, and M. O. Jensen.** 2006. Ammonium recruitment and ammonia transport by *E. coli* ammonia channel AmtB. *Biophys. J.* **91**:4401-12.
27. **Rapp, B. J., D. C. Landrum, and J. D. Wall.** 1986. Methylammonium uptake by *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* **146**:134-141.
28. **Saari, L. L., E. W. Triplett, and P. W. Ludden.** 1984. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **259**:15502-8.
29. **Saier, M. H., Jr., B. H. Eng, S. Fard, J. Garg, D. A. Haggerty, W. J. Hutchinson, D. L. Jack, E. C. Lai, H. J. Liu, D. P. Nusinew, A. M. Omar,**

- S. S. Pao, I. T. Paulsen, J. A. Quan, M. Sliwinski, T. T. Tseng, S. Wachi, and G. B. Young.** 1999. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**:1-56.
30. **Sambrook, J., E. F. Frisch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
31. **Severi, E., A. Javelle, and M. Merrick.** 2007. The conserved carboxy-terminal region of the ammonia channel AmtB plays a critical role in channel function. *Mol. Membr. Biol.* **24**:161-71.
32. **Thornton, J., D. Blakey, E. Scanlon, and M. Merrick.** 2006. The ammonia channel protein AmtB from *Escherichia coli* is a polytopic membrane protein with a cleavable signal peptide. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**:114-20.
33. **Tremblay, P. L., T. Drepper, B. Masepohl, and P. C. Hallenbeck.** 2007. Membrane sequestration of PII proteins and nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **189**:5850-9.
34. **Wang, H., C. C. Franke, S. Nordlund, and A. Noren.** 2005. Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**:273-9.
35. **Weaver, P. F., J. D. Wall, and H. Gest.** 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **105**:207-16.
36. **Winkler, F. K.** 2006. Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia. *Pflugers Arch.* **451**:701-7.
37. **Wolfe, D. M., Y. Zhang, and G. P. Roberts.** 2007. Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **189**:6861-9.

38. **Yakunin, A. F., and P. C. Hallenbeck.** 2002. AmtB is necessary for NH₄⁽⁺⁾-induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **184**:4081-8.
39. **Yakunin, A. F., and P. C. Hallenbeck.** 1998. Short-term regulation of nitrogenase activity by NH₄⁺ in *Rhodobacter capsulatus*: multiple in vivo nitrogenase responses to NH₄⁺ addition. *J. Bacteriol.* **180**:6392-5.
40. **Yakunin, A. F., T. V. Laurinavichene, A. A. Tsygankov, and P. C. Hallenbeck.** 1999. The presence of ADP-ribosylated Fe protein of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is correlated with cellular nitrogen status. *J. Bacteriol.* **181**:1994-2000.
41. **Yang, H., Y. Xu, W. Zhu, K. Chen, and H. Jiang.** 2007. Detailed mechanism for AmtB conducting NH₄⁺/NH₃: molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **92**:877-85.
42. **Zheng, L., D. Kostrewa, S. Berneche, F. K. Winkler, and X. D. Li.** 2004. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:17090-5.

Figure legends

Fig. 1. Accumulation of AmtB variants. Cultures of an *R. capsulatus amtB* strain (RCAY63) alone (-), or complemented with a plasmid carrying a *glnKamtB* operon encoding wild-type AmtB (WT), or various AmtB variants (Δ 403-430, D334A D335A, R146A, Δ 423-430, D185E, AmtBHis, H193A, F131A and H342K) were grown under N₂-fixing conditions. Whole-cell extracts were subjected to SDS-PAGE (5 μ g of total protein loaded per well) and immunoblotting with anti-AmtBHis (A). In the last well, 30 ng of purified AmtBHis was added. Potential monomeric, dimeric and trimeric forms of AmtB are indicated to the right of the panel. The top of the panel indicates the AmtB variant present. Two independent experiments were done and the amounts of AmtB variants relative to wild type AmtB were quantified as described in Material and Methods (B). As previously noted for *E. coli* (3, 8, 11), dissociation of AmtB trimers, even under these denaturing conditions, is incomplete.

Fig. 2. Complex formation between AmtB variants and GlnK. Cultures of a *R. capsulatus amtB* mutant strain (RCAY63) alone (-), or complemented with a plasmid carrying a *glnKamtB* operon encoding wild-type AmtB (WT), or various AmtB variants (D185E, H193A, F131A and H342K) were grown under N₂-fixing conditions. NH₄Cl (1 mM) was added 15 minutes prior to harvest. The membrane fractions (A) and whole-cell extracts (B) of cultures exposed to NH₄Cl (1 mM) were subjected to SDS-PAGE (5 μ g of total protein loaded per well) and immunoblotting with anti-GlnK antibody. In the last well, 30 ng of purified GlnKHis was added. The loaded variants with which GlnK interacts are indicated above the panels. Two independent experiments were done, and the amount of GlnK complexed with the variant AmtB was quantified relative to wild type AmtB (C). Additional strains were examined for complex formation between GlnK and AmtB variants by visualizing the ammonium-induced membrane sequestration of GlnK using fractionation and immunoblotting. Two parallel cultures of each strain were grown under N₂-fixing conditions. The strains examined consisted of a *R. capsulatus amtB* mutant strain (RCAY63) alone (-), or complemented with a plasmid carrying a *glnKamtB* operon encoding wild-type AmtB (WT), or various AmtB variants (Δ 403-430, D334A

D335A, Δ 423-430, AmtBHis). NH_4Cl (1 mM) was added to one of the parallel cultures 15 minutes prior to harvest. Cytoplasmic (C) and membrane (M) fractions were subjected to SDS-PAGE (5 μg of total protein loaded per well) and immunoblotting with anti-GlnK. The top of the panel indicates the AmtB variant present (D).

Fig. 3. Ammonium-induced ADP-ribosylation of NifH in *amtB* variant strains.

Cultures of *R. capsulatus* were grown under N_2 -fixing conditions. Time 0 corresponded to the addition of acetylene necessary to start the in vivo nitrogenase activity assay (results presented in Table 1) which was carried out simultaneously with the monitoring of the ADP-ribosylation state of NifH. Where indicated by arrows, NH_4Cl was added to 200 μM at 25 minutes. Culture samples were withdrawn at the indicated times, and the ADP-ribosylation state of NifH of the *amtB* mutant strain (RCAY63) complemented with the wild type *glnK-amtB* operon, encoding wild type AmtB (WT); the uncomplemented *amtB* mutant strain (-); and the *amtB* mutant strain complemented with plasmids carrying *glnK-amtB* operons bearing different mutated *amtB* genes encoding AmtB variants (D185E, Δ 403-430, R146A, Δ 423-430, AmtBHis, D334A D335A, H193A, F131A and H342K) was monitored using immunoblotting.

Table 1. Putative functions of mutated residues of *R. capsulatus* AmtB

<i>R. capsulatus</i> AmtB ^a variant	Corresponding residue(s) in <i>E. coli</i> AmtB ^a	Putative function(s)
F131A	F107	- Blocking periplasmic entrance of the pore and/or preventing hydration of the pore after NH ₄ ⁺ deprotonation (4, 18, 42)
R146A D185E	R122 D160	- None - Role in the periplasmic vestibule recruiting NH ₄ ⁺ (18, 21, 26, 42)
H193A	H168	- Proton acceptor or agent of weak stabilization by hydrogen bonding between the substrate and AmtB (4, 16, 18, 42)
D334A D335A	D309, D310	- Participation in the rearrangement of AmtB cytoplasmic face upon GlnK binding (7) and in reprotonation of NH ₃ after passage through the pore (19)
H342K	H318	- Proton acceptor or agent of weak stabilization by hydrogen bonding between the substrate and AmtB (4, 16, 18, 42)
Δ423-430	Partial C-terminal tail	- Part of cytoplasmic pore exit of next subunit (7)

^a The numbering shown is with the N-terminal residue of the respective mature AmtB protein as 1. The *E. coli* AmtB preprotein has been shown to have a signal sequence that is cleaved upon membrane insertion (32), the presumed *R. capsulatus* mature AmtB protein, after removal of the predicted signal peptide (SignalP 3.0) (2) has an N-terminus that is extended by 17 amino acids in comparison with that of *E. coli* AmtB.

Table 2. Methylamine transport and nitrogenase switch-off in *amtB* variant strains

Strain	Relevant AmtB phenotype	CH ₃ NH ₂ ⁺ transport ^{a,b}	Nitrogenase switch-off ^{b,c}
RCAY63 pAY99	Wild type	2.82 ± 0.53	0.37 ± 0.09
RCAY63	AmtB ⁻	0.50 ± 0.28	0.99 ± 0.14
RCAY63 pPLT2	Δ403-430	1.10 ± 0.25	0.93 ± 0.09
RCAY63 pPLT6	D334A D335A	0.36 ± 0.50	1.01 ± 0.07
RCAY63 pPLT28	Δ423-430	1.82 ± 0.65	1.09 ± 0.11
RCAY63 pPLT31	D185E	1.73 ± 0.52	0.35 ± 0.20
RCAY63 pPLT33	C-terminal histidine tag	4.94 ± 0.80	1.20 ± 0.15
RCAY63 pPLT41	H193A	0.44 ± 0.11	0.93 ± 0.15
RCAY63 pPLT47	F131A	0.28 ± 0.07	0.95 ± 0.09
RCAY63 pPLT49	H342K	0.44 ± 0.26	0.98 ± 0.16

^a Values are the mean nmol CH₃NH₂⁺ /mg protein/min ± the standard error of the mean.

^b Values are from triplicate experiments.

^c Shown is the mean nitrogenase activity 5 min after addition of NH₄Cl to 200 μM divided by nitrogenase activity 5 min before ammonium addition ± the standard error of the mean.

Figure 1

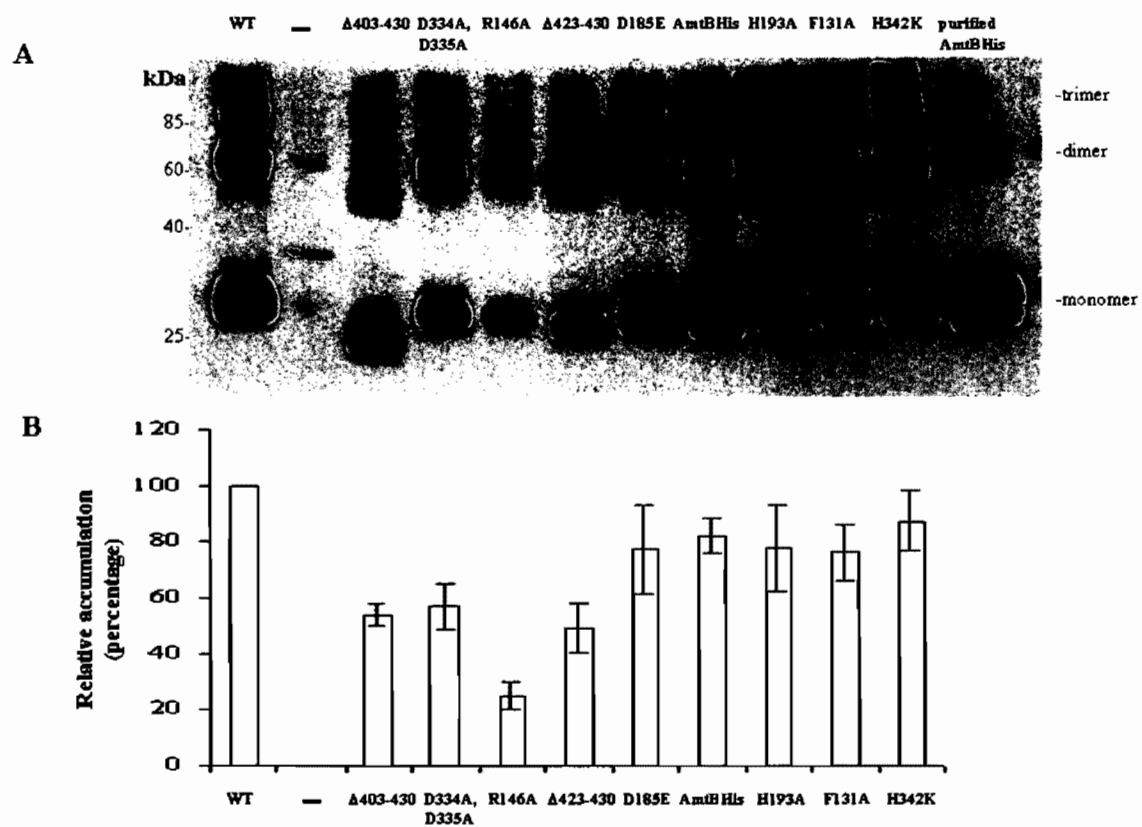


Figure 2

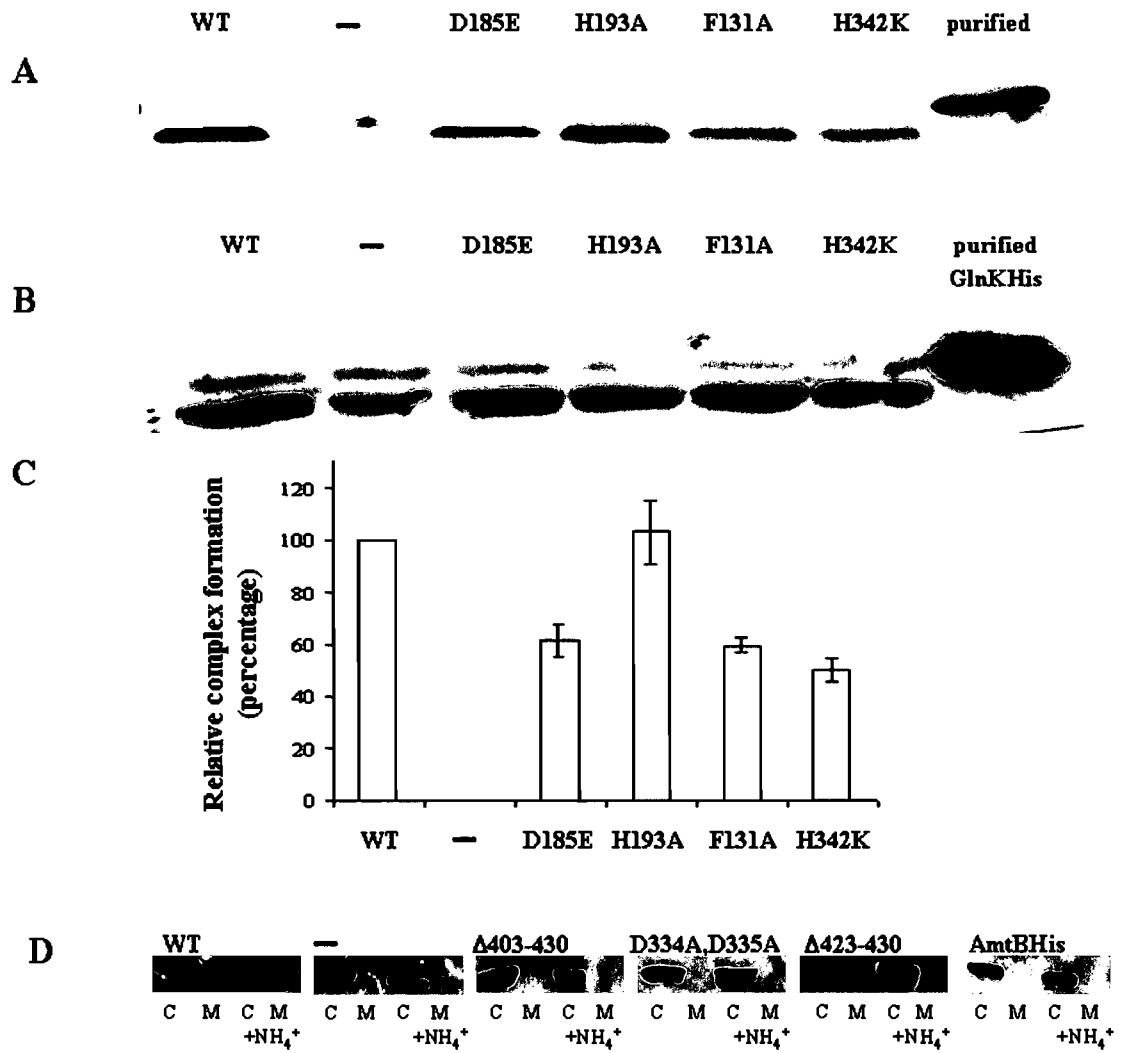
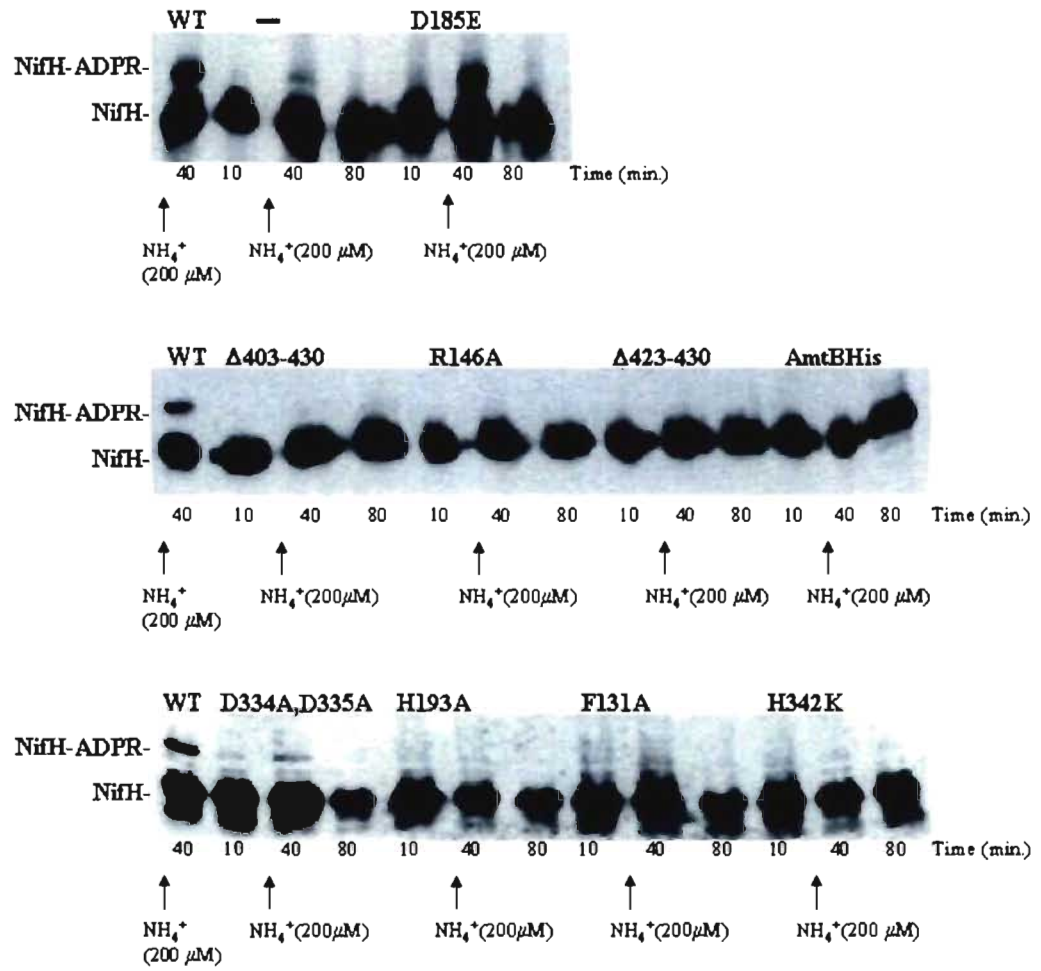


Figure 3



CHAPITRE III

DISCUSSION

Chez les bactéries, la séquestration membranaire est un mécanisme de contrôle de l'activité de facteurs de transcription étudié depuis un peu plus d'une décennie. La première voie de régulation de ce type identifiée a été l'association du répresseur PutA avec la membrane chez *Salmonella typhimurium* (Ostrovsky de Spicer et Maloy, 1993). En absence de proline, PutA s'attache aux opérateurs *put* et réprime l'expression de l'opéron *putAP*. PutP est un symporteur Na⁺/proline. En plus de réprimer sa propre expression, PutA est une enzyme responsable de la conversion de la proline en glutamate possédant deux activités: proline déhydrogénase et 1-pyrroline-5-carboxylate déhydrogénase. Ce double emploi permet de classer PutA dans un nouveau regroupement appelé «trigger enzyme» constitué de protéines active à la fois dans le métabolisme et le contrôle de l'expression génique (Revue par Commichau et Stülke, 2008). Lorsque la proline est en excès dans le milieu, PutA interagit avec son substrat et est réduite par la chaîne de transport des électrons. La combinaison de ces deux phénomènes provoque une dissociation entre PutA et les opérateurs *put* ainsi qu'une capture du répresseur par la membrane (Ostrovsky de Spicer et Maloy, 1993). Les activateurs de la transcription peuvent aussi subir le même sort. En absence de maltose, MalT est séquestré par les deux sous-unités codées par MalK du transporteur ABC MBP-MalFGK. L'ajout de maltose dans le milieu entraîne la libération de MalT dans le cytoplasme et l'induction de la transcription des gènes *mal* impliqués dans l'utilisation du maltose et des maltodextrines comme sources de carbone et d'énergie (Revue par Böhm et Boos, 2004).

La séparation spatiale entre le chromosome et les facteurs de la transcription associés à la membrane expliquerait leur inactivation. Deux exemples montrent que cette conséquence de la séquestration membranaire n'est pas universelle. La construction d'une protéine de fusion LacI artificiellement attachée à la membrane a démontré que ce répresseur de l'opéron *lac* est actif indépendamment de sa localisation cellulaire (Görke et al., 2005). En présence de citrate ferrique, l'interaction entre la protéine membranaire FecR d'*Escherichia coli* et FecI permet à ce facteur σ de diriger l'ARN polymérase vers le promoteur de l'opéron *fecABCDE*

(Mahren et al., 2002). FecA assure le passage du Fe^{3+} -dicitrate à travers la membrane externe et interagit avec FecR. FecBCDE forment un système de transport ABC.

Récemment, la séquestration membranaire a été identifiée comme mécanisme de régulation de l'activité d'une enzyme bactérienne impliquée dans une modification post-traductionnelle. La capture par le complexe Amt-PII de l'ADP-ribosylglycohydrolase DraG responsable de la démodification de la dinitrogénase réductase NifH chez les bactéries pourpres non-sulfureuses est la seule voie de transduction du signal de ce type partiellement décrite à ce jour. Après le choc NH_4^+ , la séparation spatiale entre la protéine cytoplasmique NifH et la membrane empêcherait DraG d'exercer sa fonction.

Plus largement, la séquestration par Amt des protéines PII occupe une place de choix dans la gestion du métabolisme de l'azote. L'élucidation des principes de cette interaction protéique participant à la régulation du transport du NH_4^+ par Amt, de l'assimilation et de la fixation de l'azote, présente un intérêt scientifique certain. Compte tenu de l'ubiquité d'Amt/Mep/Rh et de PII dans les royaumes du vivant, de leurs fonctions multiples et de la complexité des voies de transduction du signal impliquant ces deux familles de protéines, la caractérisation en détails de la relation entre PII et Amt est un travail imposant. Nous nous sommes concentrés sur le rôle du complexe GlnK/GlnB-AmtB de *Rhodobacter capsulatus* dans le cadre, principalement, de la régulation post-traductionnelle de la nitrogénase molybdène.

En premier lieu, nous avons montré que l'ajout de NH_4^+ à une culture de *R. capsulatus* conduit à la formation du complexe GlnK-AmtB et, dans une moindre mesure, du complexe GlnB-AmtB. Le modèle proposé antérieurement chez *E. coli* était que la déuridylylation de GlnK provoquée par une hausse de la concentration intracellulaire en glutamine est suffisante pour entraîner la capture de la protéine PII par AmtB (Javelle et al., 2004). Trois observations que nous avons faites indiquent le contraire. La séquestration membranaire de GlnK-Y51F, un variant déuridylylé en permanence, dépend toujours du choc NH_4^+ . Chez un mutant *glnB*, GlnK est

déuridylylée après l'ajout de NH_4^+ mais demeure dans le cytoplasme. Chez un mutant *glnK*, des isoformes de GlnB partiellement uridylylés se trouvent à l'origine dans la fraction cytoplasmique. Après l'ajout de NH_4^+ , les mêmes isoformes migrent vers la fraction membranaire. En ce basant, sur une étude *in vitro* démontrant l'influence de l'ATP et de l' αCG sur la formation et la dissociation du complexe GlnK-AmtB d'*E. coli* (Durand et Merrick, 2006) et sur la sensibilité au niveau d'ATP intracellulaire de la séquestration de GlnK de *Bacillus subtilis* par AmtB (Heinrich et al., 2006), nous avons suggéré que la concentration de ces deux métabolites est le signal majeur déterminant la localisation des protéines PII de *R. capsulatus*. Qui plus est, la cristallographie du complexe GlnK-AmtB d'*E. coli* indique l'existence de trois sites potentiels d'attachement non-covalent pour l' αCG et l'ATP à la base de la boucle T de GlnK (Gruswitz et al., 2007).

Après la publication de nos résultats, deux études ont apportées des preuves supplémentaires appuyant notre position. Wolfe et al. (2007) ont montré qu'une faible concentration d' αCG en présence d'ATP déclenche la dissociation du complexe GlnJ-AmtB1 chez *Rhodospirillum rubrum*. L'ADP serait aussi un acteur de premier plan puisqu'il stabilise le complexe exposé à l'ATP et à l' αCG . Autre argument, la comparaison entre la K_d de l' αCG pour GlnJ-AmtB1 et la concentration d' αCG nécessaire pour l'uridylylation de GlnJ permet de conclure que cette modification post-traductionnelle n'est pas à l'origine du relâchement dans le cytoplasme de la protéine PII. Huergo et al., (2007) ont observé que l'ajout d'à peine 10 μM d' αCG en compagnie de MgCl_2 et d'ATP provoque la dissociation du complexe GlnZ-AmtB chez *Azospirillum brasilense*.

En parallèle à ces expériences sur la localisation subcellulaire de GlnK et de GlnB, nous avons examiné le patron d'uridylylation des deux protéines PII en absence de l'autre. Dans ces conditions, la perturbation de l'uridylylation de GlnB ou de GlnK que nous avons observée peut s'expliquer par une variation dans les réservoirs de glutamine, d' αCG , d'ATP et d'ADP. Pour vérifier cette supposition, il faut déterminer la concentration intracellulaire de ces métabolites dans les mutants

glnB et *glnK* avant et après l'ajout de NH_4^+ . Le dosage des réservoirs de nucléotides et de L-glutamine peut être effectué avec des méthodes basées sur la technologie du HPLC. Utilisé par la glutamate déshydrogénase, l' αCG peut être dosé en suivant la cinétique de disparition du NADPH par spectrofluorométrie. La glutamine synthétase catalyse la réaction cruciale dans la fluctuation des ratios Gln/ αCG et ATP/ADP après le choc NH_4^+ . Des résultats préliminaires obtenus grâce au dosage de l'activité γ -glutamyltransférase de GlnA ont révélé que la régulation post-traductionnelle de cette enzyme est pratiquement inexistante chez les mutants *glnB* et *glnK* (voir figure 27, annexe A). Quant à l'activité de GlnA avant l'ajout de NH_4^+ , elle est supérieure à celle de la souche sauvage pour le mutant *glnK* et inférieure pour le mutant *glnB*. Il est donc probable que ces deux mutations altèrent les ratios Gln/ αCG et ATP/ADP. D'ailleurs, l'impact de l'inactivation de *glnB* sur le niveau intracellulaire des quatre métabolites d'intérêt est l'explication la plus simple de l'absence de séquestration par AmtB de GlnK déuridylylé dans cette souche.

Dans le modèle actuel, trois signaux participent à la régulation de la formation/séparation du complexe Amt-P_{II}: la glutamine par l'entremise de l'uridylylation/déuridylylation des protéines P_{II}, l' αCG et le ratio ATP/ADP par l'intermédiaire de liens non-covalents avec P_{II}. La présence d'un résidu UMP à l'apex de la boucle T des protéines P_{II} empêche physiquement leur ancrage dans l'entrée cytoplasmique du pore hydrophobe des protéines Amt (Conroy et al., 2007). Il est généralement admis que l'homotrimère P_{II} doit être complètement déuridylylé pour interagir avec Amt (Coutts et al., 2002; Durand et Merrick, 2006). Notre expérience de fractionnement cellulaire du mutant *glnK* combinée à un native-PAGE et à une immunoempreinte avec un anticorps polyclonal anti-GlnB indique que des isoformes de GlnB partiellement uridylylés peuvent s'accrocher à AmtB. Dans ce cas, il est probable que la déuridylylation d'une seule ou de deux sous-unités du trimère en synergie avec les effets de l'ATP, de l'ADP, et de l' αCG soit suffisante pour permettre la relocalisation de GlnB.

AmtY, l'homologue d'AmtB chez *R. capsulatus*, ne participe pas au transport du méthylammonium et à la régulation post-traductionnelle de la nitrogénase molybdène. Nous avons montré qu'à l'inverse d'AmtB, AmtY est incapable d'interagir avec les protéines PII. Étonnamment, l'expression hétérologue d'AmtY à partir d'un promoteur *trc* améliore grandement le temps de doublement d'*E. coli* Δ *amtB* dans un milieu minimal à pH 5 en présence de 1 mM NH₄Cl (voir tableau IV, annexe A). Ce résultat indique qu'AmtY est capable de transporter le NH₄⁺ dans ces conditions. Nous projetons de vérifier si AmtY et AmtB de *R. capsulatus* peuvent séquestrer GlnK et/ou GlnB d'*E. coli*. AmtY est une protéine de 422 acides aminés alors qu'AmtB en possède 453. Le pourcentage d'identité entre les deux homologues est de 39 %. Par rapport à la structure d'AmtB d'*E. coli* obtenue par cristallographie, AmtY est dépourvue de queue N-terminale périplasmique, de l'hélice transmembranaire M1 et d'une quinzaine de résidus situés dans la boucle périplasmique peu conservée M10-M11 (voir figure 28, annexe A) (Khademi et al., 2004; Zheng et al., 2004). Cinq acides aminés supplémentaires sont insérés dans la boucle périplasmique peu conservée M4-M5. De ces différentes régions des protéines Amt, seule l'hélice transmembranaire M1 est associée à des rôles structurels et/ou fonctionnels. M1 participe à la trimérisation puisque certains de ses résidus interagissent avec la sous-unité adjacente (voir figure 29, annexe A). Les trois hélices M1 scellent l'extrémité périplasmique de la jonction entre les monomères Amt (voir figure 30, annexe A). Par conséquent, le contact entre les hélices M1 favoriserait la stabilité du trimère et le rendrait étanche au passage de molécules alternatives (Khademi et al., 2004). De plus, M1 d'AmtB d'*E. coli* contient deux acides aminés peu conservés imbriqués dans le mur du pore hydrophobe (Khademi et al., 2004).

Il est plausible que pour une raison inconnue les conditions de croissance de *R. capsulatus* (photohétérotrophique sans azote fixée) dans lesquelles les différentes expériences ont été effectuées, soient inappropriées pour observer les fonctions d'AmtY. La première chose à faire est d'obtenir un anticorps spécifique contre AmtY pour vérifier l'expression, la stabilité et la trimérisation de la protéine. La transcription d'*amtY*, un gène monocistronique, est activée par NtrC-P en absence de

NH_4^+ . Il serait pertinent d'examiner la viabilité des mutants *amtB*, *amtY* et *amtBamtY* en présence de faibles concentrations de NH_4^+ exogène à différents pH dans des conditions chimioorganotrophiques où les deux nitrogénases ne sont pas exprimées et/ou actives. Un dosage du transport du méthylammonium dans des circonstances similaires où une source d'azote fixée alternative serait utilisée est aussi envisageable. Plus largement, ce type de croissance nous permettrait d'établir les caractéristiques cinétiques (K_m , V_{max}) du transport de méthylammonium d'AmtB et, s'il y a lieu, d'AmtY. En effet, l'excrétion d'une partie de la production des nitrogénases en conditions photoautotrophiques complique les calculs cinétiques puisque le NH_4^+ inhibe le transport du méthylammonium en concurrençant celui-ci. Ces conditions expérimentales permettraient aussi de déterminer l'affinité des deux homologues Amt pour leur substrat physiologique en calculant la constante d'inhibition (K_i) du NH_4^+ .

Grâce à des études de mutagenèse, principalement menés sur AmtB d'*E. coli*, de cristallographie et de simulation informatique, des résidus conservés et des régions des membres de la famille Amt/Mep/Rh se sont vus attribuer des fonctions dans le cadre du transport du NH_4^+ . Nous avons voulu connaître l'impact de mutations de ces résidus et régions d'AmtB de *R. capsulatus* sur la régulation de l'activité de la nitrogénase molybdène. Outre les résultats spécifiques pour chaque substitution et délétion exposés dans le chapitre II de cette thèse, deux observations plus générales ont été faites. La séquestration membranaire de GlnK et de GlnB (voir figure 31, annexe A pour les résultats concernant la séquestration de GlnB) à un niveau comparable à ce que l'on retrouve chez la souche sauvage, est insuffisante en soi pour mettre en branle le processus conduisant au «switch-off» de la nitrogénase molybdène. De plus, chez nos différents mutants, une corrélation entre la capacité de transporter le NH_4^+ et de contribuer à la régulation post-traductionnelle standard de NifHDK suggère que la première activité est essentielle au bon fonctionnement de la deuxième.

À des concentrations physiologiques de NH_4^+ , AmtB d'*E. coli* serait un senseur du niveau d'azote fixé et transmettrait un signal au système à deux composantes NtrB/NtrC (voir figure 32, annexe A) (Javelle et al., 2004). Lorsque le milieu de culture contient autour de 50 μM de NH_4Cl , AmtB est essentielle pour l'importation de NH_4^+ . Dans ces conditions, la production de glutamine par GlnA est dépendante du transport effectué par AmtB. Subséquemment, la glutamine est sentie par GlnD qui enlève le résidu uridylyl fixé à GlnB et à GlnK. GlnB déuridylylée s'attache à NtrB et favorise la déphosphorylation de NtrC alors que GlnK déuridylylée s'accroche à AmtB. L'altération de la concentration d' αCG et du ratio ATP/ADP suite à l'activité d'AmtB et de GlnA contribue aussi aux interactions GlnB-NtrB et GlnK-AmtB. Dès lors que la concentration en NH_4^+ est suffisamment élevée pour permettre le passage par diffusion ou par un autre mécanisme alternatif, le transport effectué par AmtB n'a plus de réel impact sur la voie de transduction décrite ci-haut. Nos résultats vont à l'encontre d'une transposition sans modification de ce modèle dans le cadre de la régulation post-traductionnelle de la nitrogénase molybdène. En effet, nos expériences de fractionnement cellulaire, de switch-off de NifHDK, et d'ADP-ribosylation de NifH ont été menées avec une concentration en NH_4Cl ajouté (1 mM) assez élevée pour générer, dans un mutant *amtB*, une régulation de l'activité de la glutamine synthétase et de la déuridylylation de GlnK similaire à ce que l'on observe chez la souche sauvage (Yakunin et Hallenbeck, 2002) (voir figure 27 et 33, annexe A). De plus, le phénotype du variant AmtB H193A, incapable de transporter le NH_4^+ , indique qu'il y a une fluctuation de la concentration intracellulaire de glutamine, d' αCG , d'ATP et d'ADP suffisante pour engendrer une séquestration de type AmtB sauvage de GlnK. Malgré cela, le transport du substrat par AmtB de *R. capsulatus* semble être nécessaire pour le «switch-off» de la nitrogénase molybdène. Alors que chez *E. coli* c'est la conversion métabolique du NH_4^+ charrié par AmtB en glutamine qui confère à cette protéine la qualité de senseur, chez *R. capsulatus* ce serait plutôt un événement survenant durant le transport effectué par AmtB.

Des études effectuées chez *Saccharomyces cerevisiae* apportent d'autres arguments en faveur d'un modèle où le transport du NH_4^+ en tant que tel par les protéines Mep/Amt leur permettrait de sentir le niveau d'azote fixé dans le milieu. L'une des trois protéines Mep de *S. cerevisiae*, Mep2, est requise pour la croissance pseudohyphale de la levure induite par une limitation en azote fixé (Lorenz et Heitman, 1998). Ces conditions amènent *S. cerevisiae* à adopter une morphologie lui permettant d'explorer son environnement à la recherche du NH_4^+ ou d'acides aminés (Gimeno et al., 1992). Les modalités de l'implication de Mep2 dans cette voie de régulation sont peu connues. Boeckstaens et al. (2007) ont démontré que la fonction senseur de Mep2 est liée à sa fonction transport. Dans des conditions limitantes en azote fixé, Mep2 N4Q, G349C, un variant hyperactif en terme de transport de NH_4^+ , induit une filamentation améliorée par rapport à la protéine Mep2 sauvage. Si les deux fonctions de Mep2 n'étaient pas couplées et que le niveau de NH_4^+ était senti par un mécanisme intracellulaire, il y aurait possiblement une détérioration de la filamentation puisque la cellule pourvue de Mep2 N4Q, G349C est mieux alimentée en azote fixé. Une autre mutation de Mep2, D186N, abolit à la fois le transport du substrat et la filamentation (Marini et al., 2006) et ce même si la protéine est présente dans la membrane.

Il a été suggéré que le signal capté par Mep2 activant la croissance pseudohyphale soit transmis par une voie de transduction impliquant la protéine kinase A (PKA) (Lorenz et Heitman, 1998). Chez *S. cerevisiae*, cette enzyme participe à la régulation de plusieurs processus biologiques en réponse à un ajout dans le milieu de glucose, de phosphate ou d'acides aminés. De ces trois stimuli, seul le glucose active PKA par l'intermédiaire d'une augmentation de la synthèse de l'AMP cyclique (AMPc) (Giots et al., 2003; Hirimburegama et al., 1992). Parmi les différentes cibles de cette enzyme, l'on retrouve la tréhalase. PKA active la tréhalase, une protéine qui catalyse la conversion du tréhalose en glucose, par phosphorylation. En mesurant l'activité de la tréhalase, Van Nuland et al. (2006) ont démontré que Mep2, grâce à sa fonction transport, fait office de senseur au cours d'une voie de transduction indépendante de l'AMPc contrôlant PKA. Tout d'abord, cette équipe de

recherche a prouvé que l'activation de la tréhalase induite par un choc NH_4^+ est indépendante de l'activité des deux enzymes responsables de l'assimilation de l'azote chez *S. cerevisiae*, la glutamine synthétase et la glutamate déhydrogénase. Ensuite, aucune corrélation n'a été observée entre la concentration de NH_4^+ intracellulaire et le niveau de stimulation de la tréhalase. Deux molécules transportées par Mep2, le NH_4^+ et le méthylammonium, induisent l'activation de la tréhalase. La diffusion rapide du méthylammonium à travers la membrane plasmique d'une cellule *mepΔ* ne stimule pas la tréhalase. Il s'agit d'une autre preuve que le transport et non un mécanisme de détection intracellulaire est responsable de la perception du niveau de NH_4^+ . Van Nuland et al. (2006) ont aussi procédé à une analyse mutationnelle de Mep2. Ils ont observé une étroite corrélation entre les capacités de Mep2 à importer et à sentir le NH_4^+ . D'ailleurs, l'un de leurs variants, Mep2 N217A, transporte le NH_4^+ mais pas le méthylammonium. Sans surprise, dans cette souche, le NH_4^+ induit normalement l'activation de la tréhalase alors que le méthylammonium n'a pas d'effet.

Quoique insuffisante en soi pour déclencher le «switch-off» de la nitrogénase molybdène, la séquestration de GlnK par AmtB semble être nécessaire. Les variants AmtBHis, $\Delta 403-430$ et $\Delta 423-430$ transportent le méthylammonium avec une efficacité variable mais ne peuvent interagir avec GlnK. En l'occurrence, il n'y a pas de régulation post-traductionnelle de NifHDK. Il est possible que ces modifications d'AmtB sapent sa capacité à interagir avec un partenaire régulateur inconnu. Par contre, la formation d'un complexe ternaire AmtB-GlnZ-DraG chez *A. brasilense* (Huergo et al., 2007) et le fait que l'inactivation de GlnK de *R. capsulatus* abolisse le «switch-off», plaident en faveur d'un rôle prépondérant de l'interaction AmtB-GlnK dans la régulation de l'activité de NifHDK. À la lumière de nos résultats, nous proposons un modèle où le transport du NH_4^+ par AmtB combiné à la formation d'un complexe AmtB-GlnK-(DraG)? induite par une fluctuation des ratios Gln/ α CG et ATP/ADP déclenchent un ou des mécanismes de régulation post-traductionnelle de la nitrogénase molybdène.

Pour apporter d'autres arguments en faveur d'un rôle de senseur impliquant la fonction transport d'AmtB de *R. capsulatus*, nous devons effectuer des expériences supplémentaires. L'étude de l'impact du thallium, un inhibiteur du transport de méthylammonium par AmtB d'*E. coli*, sur le «switch-off» de la nitrogénase molybdène pourrait être un avenue intéressante (Javelle et al., 2008). L'obtention d'autres variants AmtB permettrait d'étoffer davantage la corrélation observée entre le transport et la régulation de l'activité de NifHDK. La glycine 349 de Mep2 est un résidu fortement conservé chez les membres de la famille Amt/Mep. Dans le variant Mep2 N4Q, G349C obtenu par Boeckstans et al. (2007), c'est cette substitution qui cause l'hyperactivité de la protéine. Le remplacement de l'asparagine 4 par une glutamine empêche la glycosylation de la protéine et permet d'obtenir une bande discrète pendant l'immunoempreinte. Il serait pertinent d'introduire la substitution G349C dans AmtB de *R. capsulatus* pour voir si le transport du méthylammonium est accentué et si cela entraîne une altération du «switch-off» de la nitrogénase molybdène. Une autre approche consiste à fusionner GlnK à une protéine membranaire pour rendre sa localisation subcellulaire indépendante d'AmtB et d'introduire cette construction dans une souche *glnKamtB*. Chez *A. brasilense*, l'interaction entre DraG et GlnZ est gouvernée par les concentrations d' α CG et d'ATP (Huergo et al., 2007). À condition que le même type de relation existe entre GlnK et DraG de *R. capsulatus*, le choc NH_4^+ devrait induire la capture de DraG par la protéine chimérique GlnK. Avec ce système, si la séquestration de DraG par la membrane est aussi intense que ce qui est observé chez la souche sauvage et qu'il n'y a pas de «switch-off» standard, on peut conclure qu'AmtB participe à la régulation de l'activité de NifHDK autrement que par la formation d'un complexe avec GlnK-DraG.

Quelle est la nature du mécanisme régulateur impliquant le transport du NH_4^+ par d'AmtB? En ce moment, nous produisons des anticorps polyclonaux anti-DraG afin de vérifier si cette enzyme est séquestrée par le complexe AmtB-GlnK de *R. capsulatus*. Si tel est le cas, nous examinerons l'intensité de la séquestration de DraG avec chacun de nos variants AmtB pour voir si l'absence de transport a un impact sur

la stabilité de l'interaction entre AmtB-GlnK et DraG. Le Blue native PAGE (BN-PAGE) permet d'isoler les complexes protéiques ancrés dans les membranes biologiques (Heinemeyer et al., 2007; Wittig et al, 2006). Nous envisageons d'utiliser cette technique suivie d'un SDS-PAGE (2D) ou d'un IEF/SDS-PAGE (3D) pour savoir si, dans différentes conditions, d'autres protéines sont comprises dans un complexe régulateur avec AmtB. La spectrométrie de masse servira à identifier les candidats intéressants. La même approche pourrait être utilisée dans le cas d'AmtY. Nos résultats démontrent que le transport de NH_4^+ par AmtB et la formation du complexe AmtB-GlnK sont à la fois nécessaires pour la régulation ADP-ribosylation dépendante et indépendante de l'activité de NifHDK. Le BN-PAGE pourrait nous donner des pistes pour débiter la caractérisation de la voie de transduction du signal indépendante de l'ADP-ribosylation. La technique du système levure à deux hybrides Split-Ubiquitin permet d'étudier l'interaction entre une protéine membranaire et une protéine soluble ou deux protéines membranaires (Revue par Stagljar et Fields, 2002). Lorsque l'on veut identifier les partenaires d'une protéine membranaire, le principal défaut des systèmes levure à deux hybrides traditionnels est que le facteur de transcription reconstitué doit se trouver dans le noyau pour activer le gène rapporteur. Avec le système Split-Ubiquitin, l'association de la protéine appât et de la protéine proie fusionnées respectivement à la partie C-terminale et N-terminale de l'ubiquitine occasionne la formation d'une ubiquitine complète. À cause de cela, le facteur de transcription qui était attaché à la partie C-terminale de l'ubiquitine est relâchée dans le cytoplasme après l'action des protéases spécifiques aux ubiquitines. C'est avec cette technique que l'hétérotrimérisation de LeAmt1;1 et LeAmt1;2 de la tomate a été observée (Ludewig et al., 2003). En criblant une banque d'ADN génomique avec AmtB ou AmtY comme appât, nous pouvons identifier de nouveaux partenaires pour ces transporteurs. Cette méthode présente deux désavantages majeurs par rapport au BN-PAGE. D'abord, les interactions impliquant un ou plusieurs intermédiaires entre AmtB ou AmtY et une protéine inconnue ne peuvent être détectés. Deuxièmement, il est impossible d'observer la dépendance d'une interaction protéique à un facteur environnemental puisque cela implique des

modifications des protéines (Ex.: uridylylation de GlnK; attachement non-covalent de l' α CG et de l'ATP, etc.) irréalisables ailleurs que dans l'organisme d'origine.

UhpC d'*E. coli* transporte et sent le niveau de glucose-6-phosphate (Glc6P). En présence de Glc6P, cet antiporteur Glc6P/phosphate interagit avec l'histidine kinase membranaire UhpB qui, à son tour, phosphoryle l'activateur de la transcription UhpA (Schwöppe et al., 2002; Wright et Kadner, 2001). UhpA stimule l'expression d'un deuxième antiporteur beaucoup plus compétent pour le transport du Glc6P, UhpT. Pour déclencher cette voie de transduction, Glc6P doit se trouver dans le milieu extracellulaire et pas seulement dans le cytoplasme (Winkler, 1966). Une étude mutationnelle effectuée par Schwöppe et al. (2003) montre que la fonction transport d'UhpC n'est pas nécessaire pour que l'antiporteur perçoive le Glc6P. Les auteurs concluent que l'attachement du Glc6P à UhpC est suffisant pour induire un probable changement de conformation de la protéine et une interaction subséquente avec UhpB. Ce modèle ne semble pas s'appliquer à AmtB de *R. capsulatus*. Le résidu D185 (D186 chez Mep2 de *S. cerevisiae*) joue un rôle structural dans le vestibule périplasmique de recrutement du NH_4^+ des protéines Amt/Mep (Khademi et al., 2004; Zheng et al., 2004) ou encore est l'accepteur ultime de proton avant l'entrée du substrat dans le pore (Lin et al., 2006; Nygaard et al., 2006). Lorsque cet acide aspartique est remplacé par un acide glutamique, l'affinité du transporteur pour le substrat est diminué (Javelle et al., 2004; Marini et al., 2006). Nos résultats montrent que malgré cette réduction, le «switch-off» de la nitrogénase molybdène et l'ADP-ribosylation de NifH sont similaires à ce qui est observés chez la souche sauvage. Par conséquent, l'étape critique du transport du NH_4^+ par AmtB associée à la régulation de l'activité de NifHDK se produirait après le recrutement du substrat par le vestibule périplasmique. S'agit-il d'un événement lors de la progression dans le pore ou lors de l'hypothétique reprotonation dans le cytoplasme? Pour le moment, il est difficile d'identifier l'étape critique, principalement, parce que le mode de transport pratiqué par les protéines Amt bactériennes est toujours débattu.

La présence d'Amt/Mep/Rh dans les trois royaumes de la vie laisse présager de l'existence d'une panoplie de fonctions pour cette famille. La découverte récente que Ci-Amt1a de *Ciona intestinalis*, une ascidie, est nécessaire à la formation d'une cavité dans le cerveau contenant un otholithe est un exemple frappant de la diversité des rôles joués par ces protéines dans la nature (Marino et al., 2007). Les auteurs ont spéculé que Ci-Amt1a participe à la régulation de la concentration de sels d'ammonium affectant la viscosité et la densité de la solution retrouvée dans la cavité et par conséquent, la flottaison de l'otholithe. L'élucidation des voies de régulation impliquant Amt des procaryotes permettra de développer des modèles pouvant servir de base à la recherche effectuée chez d'autres organismes. Pensons seulement aux glycoprotéines Rh de l'humain. Comme Mep2 de *S. cerevisiae* et Amt des procaryotes, ces transporteurs de NH_4^+ et/ou de dioxyde de carbone pourraient aussi jouer un rôle de senseur.

Dans cette optique, cette thèse de doctorat apporte des éclaircissements quant au rôle d'AmtB de *R. capsulatus* dans la régulation de la fixation de l'azote. Suite à notre démonstration que l'uridylylation de GlnK a relativement peu d'impact sur sa localisation cellulaire, nous avons été parmi les premiers à suggérer que l'attachement non-covalent de métabolites à GlnK est un signal majeur modulant l'interaction de cette protéine avec AmtB. De plus, nous avons illustré, avec une analyse mutationnelle, l'importance du transport de NH_4^+ par AmtB dans la régulation posttraductionnelle de la nitrogénase molybdène. Les résultats que nous avons obtenus constituent un argument de taille en faveur d'un système où AmtB de *R. capsulatus* perçoit directement le niveau de NH_4^+ en plus de coopérer avec le circuit protéique PII-GlnD qui sent la concentration intracellulaire de métabolites impliqués dans l'assimilation de l'azote (glutamine, α -cétoglutarate, ATP, ADP) afin de transmettre un signal à la nitrogénase molybdène. Beaucoup de travail reste à faire pour mieux définir la place qu'occupe AmtB dans cette voie de régulation. En somme, cette thèse contribue modestement à l'avancement des connaissances sur la famille Amt/Mep/Rh mais peut servir de socle à plusieurs projets de recherche.

Outre un intérêt purement scientifique, la compréhension détaillée de la régulation de l'expression et de l'activité des nitrogénases peut améliorer la condition humaine. Le développement d'outils agricoles dérivés de l'étude de la fixation biologique de l'azote générera une augmentation des ressources alimentaires mondiales. L'aspect environnemental ne doit pas être négligé. En effet, la production d'engrais azotés par la réaction Haber-Bosch qui permet de nourrir un peu moins de la moitié de la population mondiale est extrêmement coûteuse énergétiquement et contribue au réchauffement climatique. Réduire notre dépendance à ce procédé industriel ne peut être que bénéfique pour la suite des choses.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Agnelli, P., L. Dossena, P. Colombi, S. Mulazzi, P. Morandi, G. Tedeschi, A. Negri, B. Curti et M.A. Vanoni. 2005. The unexpected structural role of glutamate synthase [4Fe-4S](+1,+2) clusters as demonstrated by site-directed mutagenesis of conserved C residues at the N-terminus of the enzyme beta subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**: 355-366.

Anderson, W.B. et E.R. Stadtman. 1970. Glutamine synthetase deadenylation: a phosphorolytic reaction yielding ADP as nucleotide product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**: 704-709.

Andrade, S.L., A. Dickmanns, R. Ficner et O. Einsle. 2005. Expression, purification and crystallization of the ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**: 861-863.

Andrade, S.L. et O. Einsle. 2007. The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Mol. Membr. Biol.* **24**: 357-365.

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

Assumpção, M.C., E.M. de Souza, M.G. Yates, F. Pedrosa de Oliveira et E.M. Benelli. 2007. Purification and characterisation of *Azospirillum brasilense* N-truncated NtrX protein. *Protein Expr. Purif.* **53**: 302-308.

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

Atkinson, M.R. et A.J. Ninfa. 1999. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32**: 301-313.

Atkinson, M.R., N. Pattaramanon et A.J. Ninfa. 2002. Governor of the *glnAp2* promoter of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **46**: 1247-1257.

Atlas, R.M. et R. Bartha. 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, California, pp. 218–280.

Austin, S., M. Buck, W. Cannon, T. Eydmann et R. Dixon. 1994. Purification and in vitro activities of the native nitrogen fixation control proteins NifA and NifL. *J. Bacteriol.* **176**: 3460-3465.

Bakouh, N., F. Benjelloun, P. Hulin, F. Brouillard, A. Edelman, B. Chérif-Zahar et G. Planelles. 2004. NH₃ is involved in the NH₄⁺ transport induced by the functional expression of the human Rh C glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **279**: 15975-15983.

Ball, C.A., R. Osuna, K.C. Ferguson et R.C. Johnson. 1992. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 8043-8056.

Barney, B.M., M. Laryukhin, R.Y. Igarashi, H.I. Lee, P.C. Dos Santos, T.C. Yang, B.M. Hoffman, D.R. Dean et L.C. Seefeldt. 2005. Trapping a hydrazine reduction intermediate on the nitrogenase active site. *Biochemistry.* **44**: 8030-8037.

Barney, B.M., J. McClead, D. Lukoyanov, M. Laryukhin, T.C. Yang, D.R. Dean, B.M. Hoffman et L.C. Seefeldt. 2007. Diazene (HN=NH) is a substrate for nitrogenase: insights into the pathway of N₂ reduction. *Biochemistry.* **46**: 6784-6794.

Bashan, Y., G. Holguin et L.E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* **50**: 521-577.

Belitsky, B.R., L.V. Jr Wray, S.H. Fisher, D.E. Bohannon et A.L. Sonenshein. 2000. Role of TnrA in nitrogen source-dependent repression of *Bacillus subtilis* glutamate synthase gene expression. *J. Bacteriol.* **182**: 5939-5947.

Bender, R.A. 1991. The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. *Mol. Microbiol.* **5**: 2575-2580.

Bennett, L.T., M.R. Jacobson et D.R. Dean. 1988. Isolation, sequencing, and mutagenesis of the *nifF* gene encoding flavodoxin from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **263**: 1364-1369.

Berg, O.G. 1988. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins: the LexA protein and the arginine repressor use different strategies for functional specificity. *Nucleic Acids Res.* **16**: 5089-5105.

Blakey, D., A. Leech, G.H. Thomas, G. Coutts, K. Findlay et M. Merrick. 2002. Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. *Biochem. J.* **364**: 527-535.

Blauwkamp, T.A. et A.J. Ninfa. 2002. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. *Mol. Microbiol.* **46**: 203-214.

Blauwkamp, T.A. et A.J. Ninfa. 2003. Antagonism of PII signalling by the AmtB protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**: 1017-1028.

- Boeckstans, M., B. André et A.M. Marini.** 2007. The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. *Mol. Microbiol.* **64**: 534-546.
- Böhm, A. et W. Boos.** 2004. Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 151-156.
- Boisson, G., C. Steingen, L.J. Stal et H. Bothe.** 2006. The rice field cyanobacteria *Anabaena azotica* and *Anabaena* sp. CH1 express vanadium-dependent nitrogenase. *Arch. Microbiol.* **186**: 367-376.
- Borghese, R. et J.D. Wall.** 1995. Regulation of the *glnBA* operon of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **177**: 4549-4552.
- Bostick, D.L. et C.L. 3rd Brooks.** 2007. Deprotonation by dehydration: the origin of ammonium sensing in the AmtB channel. *PLoS Comput. Biol.* **3**: e22.
- Brennan, R.** 1993. The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell.* **74**: 773-776.
- Brinkman, A.B., T.J. Ettema, W.M. de Vos et J. Van der Oost.** 2003. The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol. Microbiol.* **48**: 287-294.
- Bowman, W.C. et R.G. Kranz.** 1998. A bacterial ATP-dependent, enhancer binding protein that activates the housekeeping RNA polymerase. *Genes Dev.* **12**: 1884-1893.
- Buck, M., M.T. Gallegos, D.J. Studholme, Y. Guo et J.D. Gralla.** 2000. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J. Bacteriol.* **182**: 4129-4136.
- Buggy, J.J., M.W. Sganga et C.E. Bauer.** 1994. Characterization of a light-responding trans-activator responsible for differentially controlling reaction center and light-harvesting-I gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **176**: 6936-6943.
- Burgess, B.K. et D.J. Lowe.** 1996. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. **96**: 2983-3012.
- Burns, R.C. et R.W. Hardy.** 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **21**: 1-189.
- Caballero, F.J., J. Cardenas et F. Castillo.** 1989. Purification and properties of L-alanine dehydrogenase of the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *J. Bacteriol.* **171**: 3205-3210.

- Camarena, L., S. Poggio, N. Garcia et A. Osorio.** 1998. Transcriptional repression of *gdhA* in *Escherichia coli* is mediated by the Nac protein. *Fems Microbiol. Lett.* **167**: 51-56.
- Carr, P.D., E. Cheah, P.M. Suffolk, S.G. Vasudevan, N.E. Dixon et D.L. Ollis.** 1996. X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli* at 1.9 Å. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **52**: 93-104.
- Carrasco, C.D., K.S. Ramaswamy, T. Ramasubramanian et J.W. Golden.** 1994. *Anabaena xisF* gene encodes a developmentally regulated site-specific recombinase. *Genes Dev.* **8**: 74-83.
- Castanie-Cornet, M.P. et J.W. Foster.** 2001. *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. *Microbiology.* **147**: 709-715.
- Chang, C.L., L.C. Davis, M. Rider et D.J. Takemoto.** 1988. Characterization of *nifH* mutations of *Klebsiella pneumoniae*. **170**: 4015-4022.
- Chen, S., M.H. Rosner et J.M. Calvo.** 2001. Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **312**: 625-635.
- Chen, S. et J.M. Calvo.** 2002. Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *J. Mol. Biol.* **318**: 1031-1042.
- Chen, S., L. Liu, X. Zhou, C. Elmerich et J.L. Li.** 2005. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr-->Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. *Mol. Genet. Genomics.* **273**: 415-422.
- Cheng, J., M. Johansson et S. Nordlund.** 1999. Expression of P(II) and glutamine synthetase is regulated by P(II), the *ntfBC* products, and processing of the *glnBA* mRNA in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **181**: 6530-6534.
- Cherif-Zahar, B., A. Durand, I. Schmidt, H. Hamdaoui, I. Matic, M. Merrick et G. Matassi.** 2007. Evolution and functional characterization of the RH50 gene from the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **189**: 9090-9100.
- Chisnell, J.R., R. Premakumar et P.E. Bishop.** 1988. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **170**: 27-33.

Clancy, P., Y. Xu, W.C. Van Heeswijk, S.G. Vasudevan et D.L. Ollis. 2007. The domains carrying the opposing activities in adenylyltransferase are separated by a central regulatory domain. *FEBS J.* **274**: 2865-2877.

Commichau, F. et J. Stülke. 2008. Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Mol. Microbiol.* **67**: 692-702.

Conroy, M.J., S.J. Jamieson, D. Blakey, T. Kaufmann, A. Engel, D. Fotiadis, M. Merrick et P.A. Bullough. 2004. Electron and atomic force microscopy of the trimeric ammonium transporter AmtB. *EMBO Rep.* **5**: 1153-1158.

Conroy, M.J., A. Durand, D. Lupo, X.D. Li, P.A. Bullough, F.K. Winkler et M. Merrick. 2007. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 1213-1218.

Constantinidou, C., J.L. Hobman, L. Griffith, M.D. Pattel, C.W. Penn, J.A. Cole et T.W. Overton. 2006. A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *J. Biol. Chem.* **281**: 4802-4815.

Cordea, D. et M. Di Girolamo. 2003. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J.* **22**: 1953-1958.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10881-10890.

Cosseau, C. et J. Batut. 2004. Genomics of the *ccoNOQP*-encoded *cbb3* oxidase complex in bacteria. *Arch. Microbiol.* **181**: 89-96.

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

Csonka, L.N. et A.D. Hanson. 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.

Cullen, P.J., W.C. Bowman et R.G. Kranz. 1996. In vitro reconstitution and characterization of the *Rhodobacter capsulatus* NtrB and NtrC two-component system. *J. Biol. Chem.* **271**: 6530-6536.

Cullen, P.J., W.C. Bowman, D.F. Hartnett, S.C. Reilly et R.G. Kranz. 1998. Translational activation by an NtrC enhancer-binding protein. *J. Mol. Biol.* **278**: 903-914.

Curatti, L., C.S. Brown, P.W. Ludden et L.M. Rubio. 2005. Genes required for rapid expression of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **102**: 6291-6296.

Dance, I. 2007. Elucidating the coordination chemistry and mechanism of biological nitrogen fixation. Chem. Asian J. **2**: 936-946.

D'Ari, R., R.T. Lin et E.B. Newman. 1993. The leucine-responsive regulatory protein: more than a regulator? Trends Biochem. Sci. **18**: 260-263.

De Billy, F., D.G. Barker, P. Gallusci et G. Truchet. 1991. Leghemoglobin gene transcription is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen-fixing root nodule of alfalfa. Plant J. **1**: 27-37.

de Zamaroczy, M., F. Delorme et C. Elmerich. 1989. Regulation of transcription and promoter mapping of the structural genes for nitrogenase (*nifHDK*) of *Azospirillum brasilense* Sp7. Mol. Gen. Genet. **220**: 88-94.

de Zamaroczy, M., A. Paquelin et C. Elmerich. 1993. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **175**: 2507-2515.

Dixon, R. 1998. The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-proteobacteria. Arch. Microbiol. **169**: 371-380.

Dodsworth, J.A. et J.A. Leigh. 2006. Regulation of nitrogenase by 2-oxoglutarate-reversible, direct binding of a PII-like nitrogen sensor protein to dinitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**: 9979-9784.

Dodsworth, J.A. et J.A. Leigh. 2007. NifI inhibits nitrogenase by competing with Fe protein for binding to the MoFe protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. **364**: 378-382.

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**: 2203-2212.

Drepper, T., J. Wiethaus, D. Giaourakis, S. Gross, B. Schubert, M. Vogt, Y. Wiencek, A.G. McEwan et B. Masepohl. 2006. Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. FEMS Microbiol. Lett. **258**: 250-256.

Du, C. et J.R. Gallon. 1993. Modification of the Fe protein of the nitrogenase of *Gloeotheca* (Nageli) sp. ATCC 27152. New Phytologist. **141**: 61-70.

- Dubbs, J.M. et F.R. Tabita.** 2004. Regulators of nonsulfur purple phototrophic bacteria and the interactive control of CO₂ assimilation, nitrogen fixation, hydrogen metabolism and energy generation. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 353-376.
- Durand, A. et M. Merrick.** 2006. In vitro analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. *J. Biol. Chem.* **281**: 29558-29567.
- Edwards, R. Et M. Merrick.** 1995. The role of uridylyltransferase in the control of *Klebsiella pneumoniae nif* gene regulation. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 189-198.
- Einsle, O., F.A. Tezcan, S.L. Andrade, B. Schmid, M. Yoshida, J.B. Howard et D.C. Rees.** 2002. Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. *Science.* **297**: 1696-1700.
- Eisenberg, D., H.S. Gill, G.M. Pfluegl et S.H. Rotstein.** 2000. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**: 122-145.
- Elsen, S., W. Dischert, A. Colbeau et C.E. Bauer.** 2000. Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **182**: 2831-2837.
- Elsen, S., L.R. Swem, D.L. Swem et C.E. Bauer.** 2004. RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 263-279.
- Endeward, V., J.P. Cartron, P. Ripoche et G. Gros.** 2006. Red cell membrane CO₂ permeability in normal human blood and in blood deficient in various blood groups, and effect of DIDS. *Transfus. Clin. Biol.* **13**: 123-127.
- Feng, J., M.R. Atkinson, W. McCleary, J.B. Stock, B.L. Wanner et A.J. Ninfa.** 1992. Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 6061-6070.
- Fischer, H.M., T. Bruderer et H. Hennecke.** 1988. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. *Nucleic Acids Res.* **16**: 2207-2224.
- Fischer, H.M.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**: 352-386.
- Fitzmaurice, W.P., L.L. Saari, R.G. Lowery, P.W. Ludden et G.P. Roberts.** 2000. Genes coding for the reversible ADP-ribosylation system of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 340-347.

- Floener, L. et H. Bother.** 1985. Nitrogen fixation in *Rhopalodia gibba*; a diatom containing blue-greenish inclusions symbiotically. In *Endocytobiology; Endosymbiosis and Cell Biology*. W. Schwemmler, S. Berlin, éditeurs, Walter de Gruyter & Co. pp. 541-552.
- Fong, R.N., K.S. Kim, C. Yoshihara, W.B. Inwood et S. Kustu.** 2007. The W148L substitution in the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB increases flux and indicates that the substrate is an ion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 18706-18711.
- Forchhammer, K., A. Hedler, H. Strobel et V. Weiss.** 1999. Heterotrimerization of PII-like signalling proteins: implications for PII-mediated signal transduction systems. *Mol. Microbiol.* **33**: 338-349.
- Förster, B., K. Maner, F. Fassbinder et J. Oelze.** 1999. Reversible inactivation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* strain W107I deleted in the *draTG* gene region. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 167-171.
- Foster-Hartnett, D., P.J. Cullen, K.K. Gabbert et R.G. Kranz.** 1993. Sequence, genetic, and *lacZ* fusion analyses of a *nifR3-ntrB-ntrC* operon in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.* **8**: 903-914.
- Foster-Hartnett, D. et R.G. Kranz.** 1994. The *Rhodobacter capsulatus glnB* gene is regulated by NtrC at tandem *rpoN*-independent promoters. *J. Bacteriol.* **176**: 5271-5176.
- Gallon, J.R., J. Cheng, L.J. Dougherty, V.A. Gallon, H. Hiltz, D.M. Pederson, H.M. Richards, S. Rüggeberg et C.J. Smith.** 2000. A novel covalent modification of nitrogenase in a cyanobacterium. *FEBS Lett.* **468**: 231-233.
- Gallon, J.R.** 2004. N₂ fixation by Non-heterocystous Cyanobacteria. In *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon et W.E. Newton, éditeurs, Kluwer Academic Publishers, pp. 111-133.
- Galloway, T.S., R.M. Tait et S. Van Heyningen.** 1987. Photolabelling of cholera toxin by NAD⁺. *Biochem. J.* **242**: 927-930.
- Gavini, N., S. Tungtur et L. Pukalat.** 2006. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase-independent functional NifH mutant of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **188**: 6020-6025.
- Georgiadis, M.M., H. Komiya, P. Chakrabarti, D. Woo, J.J. Kornuc et D.C. Rees.** 1992. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science.* **257**: 1624-1625.

Gennaro, G., P. Hübner, U. Sandmeier, A.F. Yakunin et P.C. Hallenbeck. 1996. Cloning, characterization, and regulation of *nifF* from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **178**: 3949-3952.

Golden, J.W., S.J. Robinson et R. Haselkorn. 1985. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature.* **314**: 419-423.

Gimeno, C.J., P.O. Ljungdahl, C.A. Styles et G.R. Finks. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell.* **68**: 1077-1090.

Giots, F., M.C. Donaton et J.M. Thevelein. 2003. Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **47**: 1163-1181.

Golden, J.W., C.D. Carrasco, M.E. Mulligan, G.J. Schneider et R. Haselkorn. 1988. Deletion of a 55-kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **170**: 5034-5041.

Görke, B., J. Reinhardt et B. Rak. 2005. Activity of Lac repressor anchored to the *Escherichia coli* inner membrane. *Nucleic Acids Res.* **33**: 2504-2511.

Goss, T.J., A. Perez-Matos et R.A. Bender. 2001. Roles of glutamate synthase, *gltBD*, and *gltF* in nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **183**: 6607-6619.

Goss, T.J., B.K. Janes et R.A. Bender. 2002. Repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella aerogenes* requires two binding sites for the nitrogen assimilation control protein, NAC. *J. Bacteriol.* **184**: 6966-6975.

Gourley, D.G., A.W. Schuttelkopf, L.A. Anderson, N.C. Price, D.H. Boxer et W.N. Hunter. 2001. Oxyanion binding alters conformation and quaternary structure of the c-terminal domain of the transcriptional regulator mode. Implications for molybdate-dependent regulation, signaling, storage, and transport. *J. Biol. Chem.* **276**: 20641-20647.

Gray, K.A., M. Grooms, H. Myllykallio, C. Moomaw, C. Slaughter et F. Daldal. 1994. *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a CuA center. *Biochemistry.* **33**: 3120-3127.

Gregor, J. et G. Klug. 1999. Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 1-9.

Grunwald, S.K. et P.W. Ludden. 1997. NAD-dependent cross-linking of dinitrogenase reductase and dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **179**: 3277-3283.

Gruswitz, F., J. 3rd O,Connell et R.M. Stroud. 2007. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 42-47.

Halbleib, C.M., Y. Zhang et P.W. Ludden. 2000. Regulation of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 3493-3500.

Hallenbeck, P.C., C.M. Meyer et P.M. Vignais. 1982. Regulation of nitrogenase in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* as studied by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **151**: 1612-1616.

Hardy, R.W.F. 1993. Biological nitrogen fertilization: Present and future applications in *Agriculture and Environmental Challenges*. J.P. Srivastava and H. Aldermans, éditeurs. Proc. 13th Agric. Sector Symp. Washington, D.C.: The World Bank. pp. 109-117.

Hausinger, R.P. et J.B. Howard. 1983. Thiol reactivity of the nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **258**: 13486-13492.

He, B., K.Y. Choi et H. Zalkin. 1993. Regulation of *Escherichia coli* *glnB*, *prsA*, and *speA* by the purine repressor. *J. Bacteriol.* **175**: 3598-3606.

He, L., E. Soupene, A. Ninfa et S. Kustu. 1998. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* **180**: 6661-6667.

Heinemeyer, J., D. Lewejohann et H.P. Braun. 2007. Blue-native gel electrophoresis for the characterization of protein complexes in plants. *Methods Mol. Biol.* **355**: 343-352.

Heinrich, A., K. Wodya, K. Brauburger, G. Meiss, C. Detsch, J. Stülke et K. Forchhammer. 2006. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **281**: 340909-34917.

Herbert, R.A., E. Siefert et N. Pfennig. 1978. Nitrogen assimilation in *Rhodospseudomonas acidophila*. *Arch. Microbiol.* **119**: 1-5.

Hernandez, J.A., R.Y. Igarashi, B. Soboh, L. Curatti, D.R. Dean, P.W. Ludden et L.M. Rubio. 2007. NifX and NifEN exchange NifB cofactor and the VK-cluster, a

newly isolated intermediate of the iron-molybdenum cofactor biosynthetic pathway. *63*: 177-192.

Hill, S., S. Austin, T. Eydmann, T. Jones et R. Dixon. 1996. *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 2143-2148.

Hirimburegama, K., P. Durnez, J. Keleman, E. Oris, R. Vergauwen, H. Mergelsberg et J.H. Thevelein. 1992. Nutrient-induced activation of trehalase in nutrient-starved cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: cAMP is not involved as second messenger. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2035-2043.

Holbourn, K.P., C.C. Shone et K.R. Acharya. 2006. A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. *FEBS J.* **273**: 4579-4593.

Homer, M.J., T.D. Paustian, V.K. Shah et G.P. Roberts. 1993. The *nifY* product of *Klebsiella pneumoniae* is associated with apodinitrogenase and dissociates upon activation with the iron-molybdenum cofactor. *J. Bacteriol.* **175**: 4907-4910.

Homer, M.J., D.R. Dean et G.P. Roberts. 1995. Characterization of the gamma protein and its involvement in the metallocluster assembly and maturation of dinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **270**: 24745-24752.

Hommais, F., E. Krin, J.Y. Coppée, C. Lacroix, E. Yeramian, A. Danchin et P. Bertin. 2004. GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **150**: 61-72.

Hoover, T.R., E. Santero, S. Porter et S. Kustu. 1990. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell.* **63**: 11-22.

Honegger, R. 2001. The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes. In *The Mycota; IX Fungal Associations*. H.B. Berlin, éditeur, Springer Verlag. pp.165-188.

Howard, K.S., P.A. McClean, F.B. Hansen, P.V. Lemley, K.S. Koblan et W.H. Orme-Johnson. 1986. *Klebsiella pneumoniae nifM* gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**: 772-778.

Hu, Y., M.C. Corbett, A.W. Fay, J.A. Webber, K.O. Hodgson, B. Hedman et M.W. Ribbe. 2006. Nitrogenase Fe protein: A molybdate/homocitrate insertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 17125-17130.

Huang, C.H. et P.Z. Liu. 2001. New insights into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues. *Blood Cells Mol. Dis.* **27**: 90-101.

Huang, C.H. et J. Peng. 2005. Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 15512-15517.

Hübner, P., J.C. Willison, P.M. Vignais et T.A. Bickle. 1991. Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **173**: 2293-2999.

Huergo, L.F., E.M. Souza, M.B. Steffens, M.G.Yates, F.O. Pedrosa et L.S. Chubatsu. 2003. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**: 33-40.

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

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

Huergo, L.F., M. Merrick, F.O. Pedrosa, L.S. Chubatsu, L.M. Araujo et E.M. Souza. 2007. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **66**: 1523-1535.

Huo, Y.X., B.Y. Nan, C.H. You, Z.X. Tian, A. Kolb et Y.P. Wang. 2006. FIS activates *glnAp2* in *Escherichia coli*: role of a DNA bend centered at -55, upstream of the transcription start site. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**: 99-105.

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

Imhoff, J.F. 1995. Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulphur bacteria. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. R.E. Blankenship, M.T. Madigan et C.E. Bauer, éditeurs, The Netherlands: Kluwer. pp. 179-205.

Imperial, J., T.R. Hoover, M.S. Madden, P.W. Ludden et V.K. Shah. 1989. Substrate reduction properties of dinitrogenase activated in vitro are dependent upon the presence of homocitrate or its analogues during iron-molybdenum cofactor synthesis. *Biochemistry.* **28**: 7796-7799.

Inoue, K., J.L. Kouadio, C.S. Mosley et C.E. Bauer. 1995. Isolation and in vitro phosphorylation of sensory transduction components controlling anaerobic induction of light harvesting and reaction center gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry.* **34**: 391-396.

Iyer, C., C. Williams et C. Miller. 2003. Arginine-agsmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **185**: 6556-6561.

Jacobson, M.R., R. Prekakar et P.E. Bishop. 1986. Transcriptional regulation of nitrogen fixation by molybdenum in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **167**: 480-486.

Janes, B.K., P.J. Pomposiello, A. Perez-Matos, D.J. Najarian, T.J. Goss et R.A. Bender. 2001. Growth inhibition caused by overexpression of the structural gene for glutamate dehydrogenase (*gdhA*) from *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol. **183**: 2709-2714.

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

Javelle, A., G. Thomas, A.M. Marini, R. Krämer et M. Merrick. 2005. In vivo functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. Biochem. J. **390**: 215-222.

Javelle, A., D. Lupo, L. Zheng, F.K. Winkler et M. Merrick. 2006. An unusual twin-his arrangement in the pore of ammonia channels is essential for substrate conductance. J. Biol Chem. **281**: 39492-39498.

Javelle, A., D. Lupo, P. Ripoche, T. Fulford, M. Merrick et F.K. Winkler. 2008. Substrate binding, deprotonation, and selectivity at the periplasmic entrance of the *Escherichia coli* ammonia channel AmtB. Proc. Natl. Acad. Sci. [Epub ahead of print].

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

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

Jiang, P., J.A. Peliska et A.J. Ninfa. 1998A. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. Biochemistry. **37**: 12782-12794.

Jiang, P., J.A. Peliska et A.J. Ninfa. 1998B. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylylation state. *Biochemistry*. **37**: 12802-12810.

Jiang, P., J.A. Peliska et A.J. Ninfa. 1998C. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **37**: 12795-12801.

Jiang, P. Et A.J. Ninfa. 1999. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. *J. Bacteriol.* **181**: 1906-1911.

Jiang, P., A.A. Pioszak et A.J. Ninfa. 2007. Structure-function analysis of glutamine synthetase adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **46**: 4117-4132.

Joerger, R.D., M.R. Jacobson, R. Prekakar, E.D. Wolfinger et P.E. Bishop. 1989. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 1075-1086.

Jones, R. et R. Haselkorn. 1989. The DNA sequence of the *Rhodobacter capsulatus* *ntrA*, *ntrB* and *ntrC* gene analogues required for nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 507-516.

Jonsson, A., P.F. Teixeira et S. Nordlund. 2007. The activity of adenylyltransferase in *Rhodospirillum rubrum* is only affected by alpha-ketoglutarate and unmodified PII proteins, but not by glutamine, in vitro. *FEBS J.* **274**: 2449-2460.

Jonsson, A. et S. Nordlund. 2007. In vitro studies of the uridylylation of the three PII protein paralogs from *Rhodospirillum rubrum*: the transferase activity of *R. rubrum* GlnD is regulated by alpha-ketoglutarate and divalent cations but not by glutamine. *J. Bacteriol.* **189**: 3471-3478.

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

Jouanneau, Y., S. Lebecque, et P. M. Vignais. 1984. Ammonia and light effect on nitrogenase activity in nitrogen-limited continuous cultures of *Rhodopseudomonas capsulata*. Role of glutamine synthetase. *Arch. Microbiol.* **139**: 326-331.

Jouanneau, Y., C. Meyer, I. Naud et W. Klipp. 1995. Characterization of an *fdxN* mutant of *Rhodobacter capsulatus* indicates that ferredoxin I serves as electron donor to nitrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1232**: 33-42.

- Jouanneau, Y., H.S. Jeong, N. Hugo, C. Meyer et J.C. Willison.** 2000. Overexpression in *Escherichia coli* of the *rnf* genes from *Rhodobacter capsulatus* characterization of two membrane-bound iron-sulfur proteins. *Eur. J. Biochem.* **251**: 54-64.
- Kamberov, E.S., M.R. Atkinson et A.J. Ninfa.** 1995. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J. Biol. Chem.* **270**: 17797-17807.
- Keener, J. et S. Kustu.** 1988. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 4976-4980.
- Kern, M., P.B. Kamp, A. Paschen, B. Masepohl et W. Klipp.** 1998. Evidence for a regulatory link of nitrogen fixation and photosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* via HvrA. *J. Bacteriol.* **180**: 1965-1969.
- Khademi, S., J. 3rd O'Connell, J. Remis, Y. Robles-Colmeranes, L.J. Miercke et R.M. Stroud.** 2004. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science.* **305**: 1587-1594.
- Khademi, S. et R.M. Stroud.** 2006. The Amt/MEP/Rh family: structure of AmtB and the mechanism of ammonia gas conduction. *Physiology (Bethesda).* **21**: 419-429.
- Kiley, P.J. et H. Beinert.** 2003. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 181-185.
- Kim, J. et D.C. Rees.** 1992. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science.* **257**: 1677-1682.
- Klassen, G., E.M. de Souza, M.G. Yates, L.U. Rigo, J. Inaba et F.O. Pedrosa.** 2001. Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **183**: 6710-6713.
- Klassen, G., E.M. Souza, M.G. Yates, L.U. Rigo, R.M. Costa, J. Inaba et F.O. Pedrosa.** 2005. Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the GlnB nitrogen signal-transducing protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5637-5641.
- Kleiner, D.** 1985. Energy expenditure for cyclic retention of NH₃/NH₄⁺ during N₂ fixation by *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Lett.* **187**: 237-239.

- Klopprogge, K., J. Stips et R.A. Schmitz.** 2002. The inhibitory form of NifL from *Klebsiella pneumoniae* exhibits ATP hydrolyzing activity only when synthesized under nitrogen sufficiency. *Biophys. Biochim. Acta.* **1594**: 243-254.
- Körner, H., H.J. Sofia et W.G. Zumft.** 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 559-592.
- Kneip, C., P. Lockhart, C. Voss et U.G. Maier.** 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes--new models for symbiosis. *BMC Evol. Biol.* **7**: 55.
- Kumagai, H., T. Fujiwara, H. Matsubara et K. Saeki.** 1997. Membrane localization, topology, and mutual stabilization of the *rnfABC* gene products in *Rhodobacter capsulatus* and implications for a new family of energy-coupling NADH oxidoreductases. *Biochemistry.* **36**: 5509-5521.
- Kutsche, M., S. Leimkühler, S. Angermüller et W. Klipp.** 1996. Promoters controlling expression of the alternative nitrogenase and the molybdenum uptake system in *Rhodobacter capsulatus* are activated by NtrC, independent of sigma54, and repressed by molybdenum. *J. Bacteriol.* **178**: 2010-2017.
- Laguri, C., M.K. Phillips-Jones et M.P. Williamson.** 2003. Solution structure and DNA binding of the effector domain from the global regulator PrrA (RegA) from *Rhodobacter sphaeroides*: insights into DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* **31**: 6778-6787.
- Lammers, P.J., J.W. Golden et R. Haselkorn.** 1986. Identification and sequence of a gene required for a developmentally regulated DNA excision in *Anabaena*. *Cell.* **48**: 905-911.
- Landgraf, J.R., J. Wu et J.M. Calvo.** 1996. Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6930-6936.
- Lawson, C.L., D. Swigon, K.S. Murakami, S.A. Darst, H.M. Berman et R.H. Ebright.** 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 10-20.
- Lehman, L.J. et G.P. Roberts.** 1991. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **173**: 5705-5711.
- Leigh, J.A. et J.A. Dodsworth.** 2007. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 349-377.
- Lengeler J.W., G. Drews et H.G. Schlegel.** 1999. *Biology of the prokaryotes*: Blackwell Science.

Li, X., S. Jayachandran, H.H. Nguyen et M.K. Chan. 2007. Structure of the *Nitrosomonas europaea* Rh protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**: 19279-19284.

Liang, J.H., G.M. Nielsen, D.P. Lies, R.H. Burris, G.P. Roberts et P.W. Ludden. 1991. Mutations in the *draT* and *draG* genes of *Rhodospirillum rubrum* result in loss of regulation of nitrogenase by reversible ADP-ribosylation. J. Bacteriol. **173**: 6903-6909.

Liang, Y.Y., P.A. Kaminski et C. Elmerich. 1991. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. Mol. Microbiol. **5**: 2735-2744.

Liaw, S.H., C. Pan et d. Eisenberg. 1993. Feedback inhibition of fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* by glycine, alanine, and serine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**: 4996-5000.

Liaw, S.H., G. Jun et D. Eisenberg. 1994. Interactions of nucleotides with fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium*. Biochemistry. **33**: 11184-11188.

Liaw, S.H., I. Kuo et D. Eisenberg. 1995. Discovery of the ammonium substrate site on glutamine synthetase, a third cation binding site. Protein Sci. **4**: 2358-2365.

Lin, Y., Z. Cao et Y. Mo. 2006. Molecular dynamics simulations on the *Escherichia coli* ammonia channel protein AmtB: mechanism of ammonia/ammonium transport. J. Am. Chem. Soc. **128**: 10876-10884.

Little, R., V. Colombo, A. leech et R. Dixon. 2002. Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. J. Biol. Chem. **277**: 15472-15481.

Little, R. et R. Dixon. 2003. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. J. Biol. Chem. **278**: 28711-28718.

Little, R., I. Martinez-Argudo et R. Dixon. 2006. Role of the central region of NifL in conformational switches that regulate nitrogen fixation. Biochem. Soc. Trans. **34**: 162-164.

Liu, Y. et X. Hu. 2006. Molecular determinants for binding of ammonium ion in the ammonia transporter AmtB-A quantum chemical analysis. J. Phys. Chem. A. **110**: 1375-1381.

- Lodwig, E., S. Kumar, D. Alloway, A. Bourdes, J. Prell, U. Priefer et P. Poole.** Regulation of L-alanine dehydrogenase in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and its role in pea nodules. *J. Bacteriol.* **186**: 842-849.
- Lorenz, M.C. et J. Heitman.** 1998. The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 1236-1247.
- Loveless, T.M. et R.E. Bishop.** 1999. Identification of genes unique to Mo-independent nitrogenase systems in diverse diazotrophs. *Can. J. Microbiol.* **45**: 312-317.
- Ludden, P.W.** 1994. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol. Cell. Biochem.* **138**: 123-129.
- Ludwig, U., N. von Wirén et W.B. Frommer.** 2002. Uniport of NH₄⁺ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J. Biol. Chem.* **277**: 13548-13555.
- Ludwig, U., S. Wilkens, B. Wu, W. Jost, P. Obrdlik, M. El Bakkoury, A.M. Marini, E. Boles, N. Von Wirén et W.B. Frommer.** 2003. Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH₄ uniporters. *J. Biol. Chem.* **278**: 45603-45610.
- Ludwig, U.** 2004. Electroneutral ammonium transport by basolateral rhesus B glycoprotein. *J. Physiol.* **559**: 751-759.
- Ludwig, U, B. Neuhäuser et M. Dynowski.** 2007. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Lett.* **581**: 2301-2308.
- Lupo, D., X.D. Li, A. Durand, T. Tomizaki, B. Cherif-Zahar, G. Matassi, M. Merrick et F.K. Winkler.** 2007. The 1.3-Å resolution structure of *Nitrosomonas europaea* Rh50 and mechanistic implications for NH₃ transport by Rhesus family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 19303-19308.
- Ma, Y. et P.W. Ludden.** 2001. Role of the dinitrogenase reductase arginine 101 residue in dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase binding, NAD binding, and cleavage. *J. Bacteriol.* **183**: 250-256.
- Ma, Z., S. Gong, H. Richard, D.L. Tucker, T. Conway et J.W. Foster.** 2003. GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **49**: 1309-1320.
- Macaluso, A., E.A. Best et R.A. Bender.** 1990. Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **172**: 7249-7255.

- Machado, H.B., M.G. Yates, S. Funayama, L.U. Rigo, M.B. Steffens, E.M. Souza et F.O. Pedrosa.** 1995. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. *Can. J. Microbiol.* **41**: 674-684.
- Maheswaran, M. et K. Forchhammer.** 2003. Carbon-source-dependent nitrogen regulation in *Escherichia coli* is mediated through glutamine-dependent GlnB signalling. *Microbiology.* **149**: 2163-2172.
- Mahren, S., S. Enz et V. Braun.** 2002. Functional interaction of region 4 of the extracytoplasmic function sigma factor FecI with the cytoplasmic portion of the FecR transmembrane protein of the *Escherichia coli* ferric citrate transport system. *J. Bacteriol.* **184**: 3704-3711.
- Mao, X.J., Y.X. Huo, M. Buck, A. Kolb et Y.P. Wang.** 2007. Interplay between CRP-cAMP and PII-Ntr systems forms novel regulatory network between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **35**: 1432-1440.
- Marini, A.M., S. Soussi-Boudekou, S. Vissers et B. André.** 1997. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **17**: 4282-4293.
- Marini, A.M., G. Matassi, V. Raynal, B. André, J.P. Cartrone et B. Chérif-Zahar.** 2000. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat. Genet.* **26**: 341-344.
- Marini, A.M., M. Boeckstaens, F. Benjelloun, B. Chérif-Zahar et B. André.** 2006. Structural involvement in substrate recognition of an essential aspartate residue conserved in Mep/Amt and Rh-type ammonium transporters. *Curr. Genet.* **49**: 364-374.
- Marino, R., D. Melillo, M. di Filippo, A. Yamada, M.R. Pinto, R. De Santis, E.R. Brown et G. Matassi.** 2007. Ammonium channel expression is essential for brain development and function in the larva of *Ciona intestinalis*. *J. Comp. Neurol.* **503**: 135-147.
- Martinez-Argudo, I., R. Little, N. Shearer, P. Johnson et R. Dixon.** 2004. The NifL-NifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *J. Bacteriol.* **186**: 601-610.
- Masepohl, B., W. Klipp et A. Pühler.** 1988. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 27-37.

- Masepohl, B., R. Krey et W. Klipp.** 1993. The *draTG* gene region of *Rhodobacter capsulatus* is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2667-2675.
- Masepohl, B. et W. Klipp.** 1996. Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* **165**: 80-90.
- Masepohl, B., B. Kaiser, N. Isakovic, C.L. Richards, R.G. Kranz et W. Klipp.** 2001. Urea utilization in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* is regulated by the transcriptional activator NtrC. *J. Bacteriol.* **183**: 637-643.
- Masepohl, B., T. Drepper, A. Paschen, S. Gross, A. Pawlowski, K. Raabe, K.U. Riedel et W. Klipp.** 2002. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 243-248.
- Masepohl, B., T. Drepper et W. Klipp.** 2004. Nitrogen fixation in the photosynthetic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. In *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon et W.E. Newton, éditeurs, Kluwer Academic Publishers, pp. 141-165.
- Masuda, S., Y. Matsumoto, K.V. Nagashima, K. Shimada, K. Inoue, C.E. Bauer et K. Matsuura.** 1999. Structural and functional analyses of photosynthetic regulatory genes *regA* and *regB* from *Rhodovulum sulfidophilum*, *Roseobacter denitrificans*, and *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **181**: 4205-4215.
- Maupin-Furlow, J.A., J.K. Rosentel, J.H. Lee, U. Deppenmeier, R.P. Gunsalus et K.T. Shanmugam.** 1995. Genetic analysis of the *modABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 4851-4856.
- Mayer, M., M. Dynowski et U. Ludewig.** 2006. Ammonium ion transport by the AMT/Rh homologue LeAMT1;1. *Biochem. J.* **396**: 431-437.
- Meeks, J.C.** 1998. Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. *BioScience.* **48**: 266-276.
- Meeks, J.C., J. Elhai, T. Thiel, M. Potts, F. Larimer, J. Lamerdin, P. Predki et R. Atlas.** 2001. An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. *Photosynth. Res.* **70**: 85-106.
- Meier-Wagner, J., L. Nolden, M. Jakoby, R. Siewe, R. Krämer et A. Burkovski.** 2001. Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: role of Amt and AmtB. *Microbiology.* **147**: 135-143.

- Meletzus, D., P. Rudnick, N. Doestch, A. Green et C. Kennedy.** 1998. Characterization of the *glnK-amtB* operon of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180**: 3260-3264.
- Merrick, M.J.** 2004. Regulation of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. In *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon et W.E. Newton, éditeurs, Kluwer Academic Publishers, pp. 197-215.
- Michel-Reydellet, N. et P.A. Kaminski.** 1999. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. *J. Bacteriol.* **181**: 2655-2658.
- Miller, R.E. et E.R. Stadtman,** 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein. *J. Biol Chem.* **247**: 7407-7419.
- Monteiro, R.A., E.M. de Souza, R. Wassem, M.G. Yates, F.O. Pedrosa et L.S. Chubatsu.** 2001. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEBS Lett.* **508**: 1-4.
- Morett, E. et L. Segovia.** 1993. The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**: 6067-6074.
- Murrell, S.A., R.G. Lowery et P.W. Ludden.** 1988. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase from *Clostridium pasteurianum* prevents its inhibition of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **251**: 609-612.
- Mylona, P.V., R. Prekakar, R.N. Pau et P.E. Bishop.** 1996. Characteristics of *orf1* and *orf2* in the *anfHDGK* genomic region encoding nitrogenase 3 of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **178**: 204-208.
- Nakayama, Y., M. Hayashi et T. Unemoto.** 1998. Identification of six subunits constituting Na⁺-translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett.* **422**: 240-242.
- Nakhoul, N.L., E. Schmidt, S.M. Abdunour-Nakhoul et L.L. Hamm.** 2006. Electrogenic ammonium transport by renal Rhbg. *Transfus. Clin. Biol.* **13**: 147-153.
- Nieva-Gomez, D., G.P. Roberts, S. Klevickis et W.J. Brill.** 1980. Electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 2555-2558.
- Ninfa, E.G., M.R. Atkinson, E.S. Kamberov et A.J. Ninfa.** 1993. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J. Bacteriol.* **175**: 7024-7032.

Ninfa, A.J. et M.R. Atkinson. 2000. PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol.* **8**: 172-179.

Ninfa A.J., P. Jiang, M.R. Atkinson et J.A. Peliska. 2000. Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Curr. Top. Cell Regul.* **36**: 31-75.

S. Nordlund et P.W. Ludden. 2004. Post-translational regulation of nitrogenase in photosynthetic bacteria. In *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon et W.E. Newton, éditeurs, Kluwer Academic Publishers, pp. 175-190.

Norén, A. et S. Nordlund. 1994. Changes in the NAD(P)H concentration caused by addition of nitrogenase 'switch-off' effectors in *Rhodospirillum rubrum* G-9, as measured by fluorescence. *FEBS Lett.* **356**: 43-45.

Norén, A. et S. Nordlund. 1997. Dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase can be released from chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* by treatment with MgGDP. *FEBS Lett.* **399**: 7872-7874.

Norén, A., A. Soliman et S. Nordlund. 1997. The role of NAD⁺ as a signal during nitrogenase switch-off in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem J.* **322**: 829-832.

Nygaard, T.P., C. Rovira, G.H. Peters et M.O. Jensen. 2006. Ammonium recruitment and ammonia transport by *E. coli* ammonia channel AmtB. *Biophys. J.* **91**: 4401-4412.

Oh, J.I. et S. Kaplan. 2002. Oxygen adaptation. The role of the CcoQ subunit of the cbb3 cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Biol. Chem.* **277**: 16220-16228.

Ostrovsky de Spicer, P. et S. Maloy. 1993. PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 4295-4298.

Ouchane, S. et S. Kaplan. 1999. Topological analysis of the membrane-localized redox-responsive sensor kinase PrrB from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Biol. Chem.* **274**: 17290-17296.

Paget, M.S. et J.D. Hellman. 2003. The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* **4**: 203.

Pahel, G., D.M. Rothstein et B. Magasanik. 1982. Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **150**: 202-213.

- Pau, R.N., M.E. Eldridge, D.J. Lowe, L.A. Mitchenall et R.R. Eady.** 1993. Molybdenum-independent nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*: a functional species of alternative nitrogenase-3 isolated from a molybdenum-tolerant strain contains an iron-molybdenum cofactor. *Biochem. J.* **293**: 101-107.
- Park, Y.H., B.R. Lee, Y.J. Seok et A. Peterkofsky.** 2006. In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**: 6448-6454.
- Paschen, A., T. Drepper, B. Masepohl et W. Klipp.** 2001. *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating *nif* gene expression in the presence of ammonium. *FEMS Microbiol. Lett.* **200**: 207-213.
- Paul, L., R.M. Blumenthal et R.G. Matthews.** 2001. Activation from a distance: roles of Lrp and integration host factor in transcriptional activation of *gltBDF*. *J. Bacteriol.* **183**: 3910-3918.
- Paul, L., P.K. Mishra, R.M. Blumenthal et R.G. Matthews.** 2007. Integration of regulatory signals through involvement of multiple global regulators: control of the *Escherichia coli gltBDF* operon by Lrp, IHF, Crp, and ArgR. *BMC Microbiol.* **7**: 2.
- Pawlowski, A., K.U. Riedel, W. Klipp, P. Dreiskemper, S. Gross, H. Bierhoff, T. Drepper et B. Masepohl.** 2003. Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **185**: 5240-5247.
- Pelmont, J.** 1993. Bactéries et environnements: adaptations physiologiques. Presse universitaire de Grenoble, pp. 519-536.
- Peng, J. et C.H. Huang.** 2006. Rh proteins vs Amt proteins: an organismal and phylogenetic perspective on CO₂ and NH₃ gas channels. *Transfus. Clin. Biol.* **13**: 86-94.
- Peters, J.W., K. Fisher et D.R. Dean.** 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 335-366.
- Peters, J.W., M.H. Stowell, S.M. Soltis, M.G. Finnegan, M.K. Johnson et D.C. Rees.** 1997. Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry.* **36**: 1181-1187.
- Pierrard, J., P.W. Ludden et G.P. Roberts.** 1993. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: existence of two independent regulatory effects of ammonium. *J. Bacteriol.* **175**: 1358-1366.
- Pope, M.R., L.L. Saari et P.W. Ludden.** 1986. N-glycohydrolysis of adenosine diphosphoribosyl arginine linkages by dinitrogenase reductase activating

glycohydrolase (activating enzyme) from *Rhodospirillum rubrum*. J. Biol. Chem. **261**: 10104-10111.

Porter, S.C., A.K. North, A.B. Wedel et S. Kustu. 1993. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. Genes Dev. **7**: 2258-2273.

Postgate, J.R. et R.R. Eady. 1988. The evolution of biological nitrogen fixation. In Nitrogen Fixation: Hundred Years After. H. Bothe, F.J. de Bruijn et W.E. Newton, éditeurs, Stuttgart: Gustav Fischer. pp. 31-40.

Raabe, K., T. Drepper, K.U. Riedel, B. Masepohl et W. Klipp. 2002. The H-NS-like protein HvrA modulates expression of nitrogen fixation genes in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* by binding to selected *nif* promoters. FEMS Microbiol. Lett. **216**: 151-158.

Raina, R., U.K. Bageshwar et H.K. Das. 1993. The ORF encoding a putative ferredoxin-like protein downstream of the *vnfH* gene in *Azotobacter vinelandii* is involved in the vanadium-dependent alternative pathway of nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. **236**: 459-462.

Ramaswamy, K.S., C.D. Carrasco, T. Fatma et J.W. Golden. 1997. Cell-type specificity of the *Anabaena fdxN*-element rearrangement requires *xisH* and *xisI*. Mol. Microbiol. **23**: 1241-1249.

Rees, D.C., F. Akif Tezcan, C.A. Haynes, M.Y. Walton, S. Andrade, O. Einsle et J.B. Howard. 2005. Structural basis of biological nitrogen fixation. Philos. Transact. A. Math. Phys. Eng. Sci. **363**: 971-984.

Rehder, D. 2000. Vanadium nitrogenase. J. Inorg. Biochem. **80**: 133-136.

Reitzer, L.J. et B. Magasanik. 1985. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**: 1979-1983.

Reitzer, L.J. 1996. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In F. C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter et H. E. Umbarger, éditeurs, *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 391-407.

Reitzer, L.J. 2003. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. **57**: 155-176.

Reyes-Ramirez, F., R. Little et R. Dixon. 2002. Mutant forms of the *Azotobacter vinelandii* transcriptional activator NifA resistant to inhibition by the NifL regulatory protein. *J. Bacteriol.* **184**: 6777-6785.

Riba, L., B. Becerril, L. Servin-Gonzalez, F. Valle et F. Bolivar. 1988. Identification of a functional promoter for the *Escherichia coli* *gdhA* gene and its regulation. *Gene.* **71**: 233-246.

Ribbe, M., D. Gadkari et O. Meyer. 1997. N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**: 26627-26633.

Ribbe, M. et B.K. Burgess. 2001. The chaperone GroEL is required for the final assembly of the molybdenum-iron protein of nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 5521-5525.

Ripoche, P., O. Bertrand, P. Gane, C. Birkenmeier, Y. Colin et J.P. Cartron. 2004. Human Rhesus-associated glycoprotein mediates facilitated transport of NH₃ into red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 17122-17227.

Robson, R.L. et J.R. Postgate. 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**: 183-207.

Robson, R.L., P.R. Woodley, R.N. Pau et R.R. Eady. 1989. Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *EMBO J.* **8**: 1217-1224.

Rocha, M., M. Vazquez, A. Garcarrubio et A.A. Covarrubias. 1985. Nucleotide sequence of the *glnA-glnL* intercistronic region of *Escherichia coli*. *Gene.* **37**: 91-99.

Rodriguez-Quinones, F., R. Bosch et J. Imperial. 1993. Expression of the *nifBfdxNnifOQ* region of *Azotobacter vinelandii* and its role in nitrogenase activity. *J. Bacteriol.* **175**: 2926-2935.

Rombel, I., A. North, I. Hwang, C. Wyman et S. Kustu. 1998. The bacterial enhancer-binding protein NtrC as a molecular machine. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**: 157-166.

Rosario, C.A. et R.A. Bender. 2005. Importance of tetramer formation by the nitrogen assimilation control protein for strong repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **187**: 8291-8299.

Rubio, L.M. et P.W. Ludden. 2005. Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* **187**: 405-414.

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

Saeki, K., K. Tokuda, T. Fujiwara et H. Matsubara. 1993. Nucleotide sequence and genetic analysis of the region essential for functional expression of the gene ferredoxin I, FdxN, in *Rhodobacter capsulatus*: Sharing of one upstream activator sequence in opposite direction by two operons related to nitrogen fixation. *Plant Cell Physiol.* **34**: 185-199.

Saeki, K. 2004. Electron transport to nitrogenase: diverse routes for common destination. In *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon et W.E. Newton, éditeurs, Kluwer Academic Publishers, pp. 257-281.

Salinas, P. et A. Contreras. 2003. Identification and analysis of *Escherichia coli* proteins that interact with the histidine kinase NtrB in a yeast two-hybrid system. *Mol. Genet. Genomics.* **269**: 574-581.

Schreiber, V., F. Dantzer, J.C. Ame et G. De Murcia. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**: 517-528.

Schmehl, M., A. Jahn, A. Meyer zu 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. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 602-615.

Schreier, H.J., S.W. Brown, K.D. Hirschi, J.F. Nomellini et A.L. Sonenshein. 1989. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene expression by the product of the *glnR* gene. *J. Mol. Biol.* **210**: 51-63.

Schüddekopf, K., S. Hennecke, U. Liese, M. Kutsche et W. Klipp. 1993. Characterization of *anf* genes specific for the alternative nitrogenase and identification of *nif* genes required for both nitrogenases in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.* **8**: 673-684.

Schutt, H. et H. Holzer. 1972. Biological function of the ammonia-induced inactivation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **15**: 68-72.

Schüttelkopf, A.W., D.H. Boxer et W.N. Hunter. 2003. Crystal structure of activated ModE reveals conformational changes involving both oxyanion and DNA-binding domains. *J. Mol. Biol.* **326**: 761-767.

Schwacha, A. et R.A. Bender. 1993. The product of the *Klebsiella aerogenes nac* (nitrogen assimilation control) gene is sufficient for activation of the *hut* operons and repression of the *gdh* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 2116-2124.

Schwöppe, C., H.H. Winkler et H.E. Neuhaus. 2002. Properties of the glucose-6-phosphate transporter from *Chlamydia pneumoniae* (HPTcp) and the glucose-6-phosphate sensor from *Escherichia coli* (UhpC). *J. Bacteriol.* **184**: 2108-2115.

Schwöppe, C., H.H. Winkler et H.E. Neuhaus. 2003. Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1450-1457.

Self, W.T., A.M. Grunden, A. Hasona et K.T. Shanmugam. 2001. Molybdate transport. *Res. Microbiol.* **152**: 311-321.

Severi, E., A. Javelle et M. Merrick. 2007. The conserved carboxy-terminal region of the ammonia channel AmtB plays a critical role in channel function. *Mol. Membr. Biol.* **24**: 161-171.

Shah, V.K., G. Stacey et W.J. Brill. 1983. Electron transport to nitrogenase. Purification and characterization of pyruvate:flavodoxin oxidoreductase. The *nifJ* gene product. *J. Biol. Chem.* **258**: 12064-12068.

Shah, V.K., J.R. Allen, N.J. Spengler et P.W. Ludden. 1994. In vitro synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Purification and characterization of NifB cofactor, the product of NIFB protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 1154-1158.

Shapiro, B.M. et E.R. Stadtman. 1968. Glutamine synthetase deadenylylating enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**: 32-37.

Shingler, V. 1996. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol. Microbiol.* **19**: 409-416.

Sicking, C., M. Bruschi, A. Lindackers, K.U. Riedel, B. Schubert, N. Isakovic, C. Krall, W. Klipp, T. Drepper, K. Schneider et B. Masepohl. 2005. Identification of two new genes involved in diazotrophic growth via the alternative Fe-only nitrogenase in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **187**: 92-98.

Siewe, R.M., B. Weil, A. Burkovski, B.J. Eikmanns, M. Eikmanns et R. Krämer. 1996. Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **271**: 5398-5403.

Smith, B.E. 2002. Structure. Nitrogenase reveals its inner secrets. *Science*. **297**: 1654-1655.

Soliman, A. et S. Nordlund. 1992. Studies on the effect of NAD(H) on nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Microbiol. **157**: 431-435.

Soupene, E., L. He, D. Yan et S. Kustu. 1998. Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**: 7030-7034.

Soupene, E., N. King, E. Feild, P. Liu, K.K. Niyogi, C.H. Huang et S. Kustu. 2002. Rhesus expression in a green alga is regulated by CO₂. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**: 7769-7773.

Soupene, E., W. Inwood et S. Kustu. 2004. Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO₂. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**: 7787-7792.

Spurio, R., M. Falconi, A. Brandi, C.L. Pon et C.O. Gualerzi. 1997. The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. EMBO J. **16**: 1795-1805.

Stadtman, E.R. 1990. Discovery of glutamine synthetase cascade. Methods Enzymol. **182**: 793-809.

Stagljar, I. et S. Fields. 2002. Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. Trends Biochem. Sci. **27**: 559-563.

Stingl, U., R. Radek, H. Yang et A. Brune. 2005. "Endomicrobia": cytoplasmic symbionts of termite gut protozoa form a separate phylum of prokaryotes. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 1473-1479.

Stips, J., R. Thummer, M. Neumann et R.A. Schmitz. 2004. GlnK effects complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. Eur. J. Biochem. **271**: 3379-3388.

Stirling, C.J., G. Szatmari, G. Stewart, M.C. Smith et D.J. Sherratt. The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 *cer* locus. Embo J. **7**: 4389-4395.

Swem, D.L. et C.E. Bauer. 2002. Coordination of ubiquinol oxidase and cytochrome cbb(3) oxidase expression by multiple regulators in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. **184**: 2815-2820.

Swem, D.L., L.R. Swem, A. Setterdahl et C.E. Bauer. 2005. Involvement of SenC in assembly of cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. **187**: 8081-8087.

Swem, L.R., B.J. Kraft, D.L. Swem, A.T. Setterdahl, S. Masuda, D.B. Knaff, J.M. Zaleski et C.E. Bauer. 2003. Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *EMBO J.* **22**: 4699-4708.

Swem, L.R., X. Gong, C.A. Yu et C.E. Bauer. 2006. Identification of a ubiquinone-binding site that affects autophosphorylation of the sensor kinase RegB. *J. Biol. Chem.* **281**: 6768-6775.

Swinger, K.K. et P.A. Rice. 2004. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 28-35.

Tendeng, C. et P.N. Bertin. 2003. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol.* **11**: 511-518.

Thiel, T. 2004. Nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. In *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon et W.E. Newton, éditeurs, Kluwer Academic Publishers, pp. 73-101.

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

Thorneley, R. N. et D.J. Lowe. 1985. In *Molybdenum Enzymes*; T.G. Spiro, éditeur, Wiley-Interscience: New York, pp 221.

Thorneley, R.N. 1992. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: an MgATP hydrolysing energy transduction system with similarities to actomyosin and p21 ras. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **336**: 73-82.

Thornton, J., D. Blakey, E. Scanlon et M. Merrick. 2006. The ammonia channel protein AmtB from *Escherichia coli* is a polytopic membrane protein with a cleavable signal peptide. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**: 114-120.

Thummer, R., O. Klimmek et R.A. Schmitz. 2007. Biochemical studies of *Klebsiella pneumoniae* NifL reduction using reconstituted partial anaerobic respiratory chains of *Wolinella succinogenes*. *J. Biol. Chem.* **282**: 12517-12526.

Tian, Z.X., Q.S. Li, M. Buck, A. Kolb et Y.P. Wang. 2001. The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**: 911-924.

Tondervik, A., H.R. Torgesen, H.K. Botnmark et A.R. Strom. 2006. Transposon mutations in the 5' end of *glnD*, the gene for a nitrogen regulatory sensor, that suppress the osmosensitive phenotype caused by *otsBA* lesions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**: 4218-4226.

Torrey, J.G. et J.D. Tjepkema. 1979. Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete-nodulated plants. *Bot. Gaz.* **140**.

Toudkarian, A. et C. Kennedy. 1986. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. *EMBO J.* **5**: 399-407.

Toussaint, B., I. Delic-Attree, R. De Sury D'Aspremont, L. David, M. Vinçon et P.M. Vignais. 1993. Purification of the integration host factor homolog of *Rhodobacter capsulatus*: cloning and sequencing of the *hip* gene, which encodes the beta subunit. *J. Bacteriol.* **175**: 6499-6504.

Tramonti, A., P. Visca, M. De Canio, M. Falconi et D. De Biase. 2002. Functional characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J. Bacteriol.* **184**: 2603-2613.

Travers, A. 1997. DNA-protein interactions: IHF--the master bender. *Curr. Biol.* **7**: R252-254.

Tremblay, P.L., T. Drepper, B. Masepohl et P.C. Hallenbeck. 2007. Membrane sequestration of PII proteins and nitrogenase regulation in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **189**: 5850-5859.

Triplett, E.W., J.D. Wall et P.W. Ludden. 1982. Expression of the activating enzyme and Fe protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **152**: 786-791.

Tucker, D.L., N. Tucker et T. Conway. Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 6551-6558.

Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro et T. Matsuguchi. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.* **177**: 1414-1417.

Ueno-Nishio, S., S. Mango, L.J. Reitzer et B. Magasanik. 1984. Identification and regulation of the *glnL* operator-promoter of the complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**: 379-384.

Van Den Heuvel, R.H., M.A. Vanoni et A. Mattevi. 2004. Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cell Mol. Life Sci.* **61**: 669-681.

Van Dommelen, A., V. Keijers, E. Somers et J. Vanderleyden. 2002. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense* *glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. *Mol. Genet. Genomics.* **266**: 813-820.

Van Duyne, G.D., G. Ghost, W.K. Maas et P.B. Sigler. 1996. Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **256**: 377-391.

Van Heeswijk, W.C., M. Rabenberg, H.V. Westerhoff et D. Kahn. 1993. The genes of the glutamine synthetase adenylylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **9**: 443-457.

Van Heeswijk, W.C., D. Wen, P. Clancy, R. Jaggi, D.L. Ollis, H.V. Westerhoff et S.G. Vasudevan. 2000. The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers in vivo: fine tuning the nitrogen signal cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 3942-3947.

Van Nuland, A., P. Vandormael, M. Donaton, M. Alenquer, A. Lourenço, E. Quintino, M. Versele et J.M. Thevelein. 2006. Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Mol. Microbiol.* **59**: 1485-1505.

Walter, B., M. Küspert, D. Ansorge, R. Krämer et A. Burkovski. 2008. Dissection of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism of action and energetics of AmtA and AmtB. **190**: 2611-2614.

Wang, G., S. Angermüller et W. Klipp. 1993. Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. *J. Bacteriol.* **175**: 3031-3042.

Wang, H., C.C. Franke, S. Nordlund et A. Norén. 2005. Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**: 273-279.

Weidinger, K., B. Neuhäuser, S. Gilch, U. Ludewig, O. Meyer et I. Schmidt. 2007. Functional and physiological evidence for a rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**: 260-267.

Westhoff, C.M., D.L. Siegel, C.G. Burd et J.K. Foskett. 2004. Mechanism of genetic complementation of ammonium transport in yeast by human erythrocyte Rh-associated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **279**: 17443-17448.

Wiethaus, J., A. Wirsing, F. Naberhaus et B. Masepohl. 2006. Overlapping and specialized functions of the molybdenum-dependent regulators MopA and MopB in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **188**: 8441-8451.

Williams, R., N.P. Cotton, C.M. Thomas et J.B. Jackson. 1994. Cloning and sequencing of the genes for the proton-translocating nicotinamide nucleotide

transhydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the implications for the domain structure of the enzyme. *Microbiology*. **140**: 1595-1604.

Willison, J.C., J. Pierrard et P. Hübner. 1993. Sequence and transcript analysis of the nitrogenase structural gene operon (*nifHDK*) of *Rhodobacter capsulatus*: evidence for intramolecular processing of *nifHDK* mRNA. *Gene*. **133**: 39-46.

Winkler, F.K. 2006. Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia. *Pfluggers Arch.* **451**: 701-707.

Winkler, H.H. 1966. A hexose-phosphate transport system in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **117**: 231-240.

Wittig, I., H.P. Braun et H. Schägger. 2006. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **1**: 418-428.

Wohlheuter, R.M., H. Schutt et H. Holzer. 1973. The enzymes of glutamine metabolism. S.B. Prusiner et E.R. Stadtman, éditeurs. New York: Academic; 1973. pp. 45-64.

Wolfe, D.M., Y. Zhang et G.P. Roberts. 2007. Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. **189**: 6861-6869.

Woodley, P. et M. Drummond. 1994. Redundancy of the conserved His residue in *Azotobacter vinelandii* NifL, a histidine autokinase homologue which regulates transcription of nitrogen fixation genes. *Mol. Microbiol.* **13**: 619-626.

Woolfolk, C.A. et E.R. Stadtman. 1967. Regulation of glutamine synthetase. 3. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **118**: 736-755.

Wright, J.S. 3rd et R.J. Kadner. 2001. The phosphoryl transfer domain of UhpB interacts with the response regulator UhpA. *J. Bacteriol.* **183**: 3149-3159.

Xu, Y., E. Cheah, P.D. Carr, W.C. van Heeswijk, H.V. Westerhoff, S.G. Vasudevan et D.L. Ollis. 1998. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J. Mol. Biol.* **282**: 149-165.

Yakunin, A.F. et P.C. Hallenbeck. 1998A. Purification and characterization of pyruvate oxidoreductase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1409**: 39-49.

Yakunin, A.F. et P.C. Hallenbeck. 1998B. Short-term regulation of nitrogenase activity by NH₄⁺ in *Rhodobacter capsulatus*: multiple in vivo nitrogenase responses to NH₄⁺ addition. *J. Bacteriol.* **180**: 6392-6395.

Yakunin, A.F. et P.C. Hallenbeck. 2000. Regulation of nitrogenase activity in *Rhodobacter capsulatus* under dark microoxic conditions. *Arch. Microbiol.* **173**: 366-372.

Yakunin, A.F. et P.C. Hallenbeck. 2002. AmtB is necessary for NH₄⁽⁺⁾-induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **184**: 4081-4088.

Yildiz, O., C. Kalthoff, S. Raunser et K. Kühlbrandt. 2007. Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. *EMBO J.* **26**: 589-599.

Yoch, D.C. 1979. Manganese, an essential trace element for N₂ fixation by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*: role in nitrogenase regulation. *J. Bacteriol.* **140**: 987-995.

Yoshida, K., H. Yamaguchi, M. Kinehara, Y.H. Ohki, Y. Nakaura et Y. Fujita. 2003. Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box. *Mol. Microbiol.* **49**: 157-165.

Zehr, J.P. et L.A. McReynolds. 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2522-2526.

Zehr, J.P., B.D. Jenkins, S.M. Short et G.F. Stewart. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* **5**: 539-554.

Zhang, X., M. Chaney, S.R. Wigneshweraraj, J. Schumacher, P. Bordes, W. Cannon et M. Buck. 2002. Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol. Microbiol.* **45**: 895-903.

Zhang, Y., R.H. Burris, P.W. Ludden et G.P. Roberts. 1996. Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. *J. Bacteriol.* **178**: 2948-2953.

Zhang, Y., R.H. Burris, P.W. Ludden et G.P. Roberts. 1997. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 195-204.

Zhang, Y., E.L. Pohlmann, P.W. Ludden et G.P. Roberts. 2000. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **182**: 983-992.

Zhang, Y., E.L. Pohlmann, P.W. Ludden et G.P. Roberts. 2001. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. *J. Bacteriol.* **183**: 6159-6168.

Zhang, Y., D.M. Wolfe, E.L. Pohlmann, M.C. Conrad et G.P. Roberts. 2006. Effect of AmtB homologues on the post-translational regulation of nitrogenase activity in response to ammonium and energy signals in *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiology.* **152**: 2075-2089.

Zheng, L., D. Kostrewa, S. Bernèche, F.K. Winkler et X.D. Li. 2004. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **101**: 17090-17095.

Zhu, Y., M.C. Conrad, Y. Zhang et G.P. Roberts. 2006. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signals. *J. Bacteriol.* **188**: 1866-1874.

Zimmer, D.P., E. Soupene, H.L. Lee, V.F. Wendisch, A.B. Khodursky, B.J. Peter, R.A. Bender et S. Kustu. 2000. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 14044-14045.

ANNEXE A

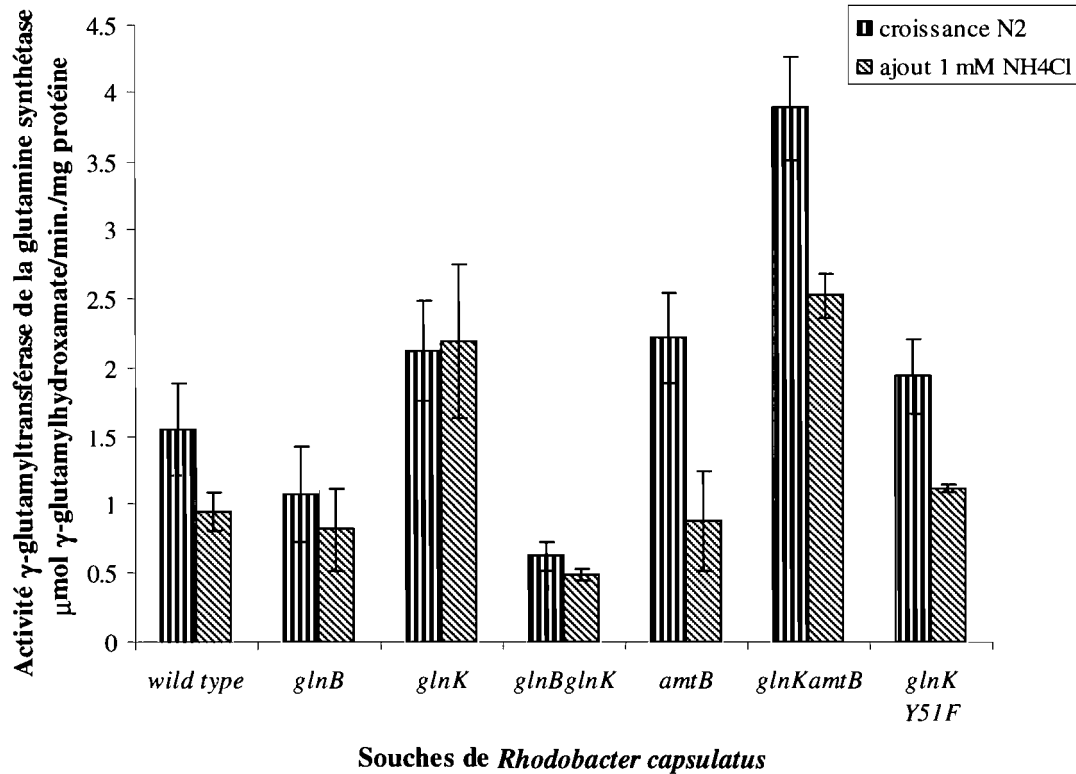


Figure 27. Régulation de l'activité de la glutamine synthétase de différents *Rhodobacter capsulatus* mutants. L'activité γ -glutamyltransférase de la glutamine synthétase a été mesurée en utilisant un protocole décrit par Jouanneau et al., (1984). La souche sauvage (SB1003) et les mutants ont été cultivés à la lumière, sans oxygène et sans source d'azote fixé (N₂). Un premier échantillon a été prélevé avant l'addition de 1 mM de NH₄Cl et un deuxième 5 minutes après cet ajout.

11M11M11M11
410 420 430

```

AmtB_Ecoli AFIGYKLADLTVGLRVPPEEQEREGLD1VNSHG2ENAYNA--
AmtB_Rcap  SIILLYIVKAVTGLRVA1TDDER2GLDLIT3HGESAYHS--
AmtB_Rsph  SVVAFKIADLVVGLRVDTESE1RIG2DDTAHGESAYHG--
AmtB1_Rrub SYVILKVIDLAIGLRVSP1EQE2SEGL3DISLHGERLQ----
AmtB_Abra  SFII1LKVIDVVMGLRVD2EDV3ERDGLDLALHGETIH----
AmtB1_Rpal TYVLLKAVSLFVALRVSREHEIEG1LDIS2HGEALQ----
AmtY_Rcap  TWGIARAVALVFPMEVDKES1ETNG2LDIS3HGERAYDLNS

```

Figure 28. Aligement de séquences en acides aminés de membres sélectionnés de la famille Amt/Mep. L'aligement a été réalisé avec Multalin (Corpet, 1988). La position des hélices α transmembranaires dans AmtB d'*Escherichia coli* est indiquée en rouge. Les résidus hautement conservés sont contenus dans des boîtes grises. Les résidus sujets à l'analyse mutationnelle présentée dans l'article #2 de la section résultats sont en gras. La délétion complète de la queue C-terminale d'AmtB de *Rhodobacter capsulatus* est soulignée alors que la délétion partielle est en italique. Dans l'ordre, les séquences sont: *E. coli* AmtB (AmtB_Ecoli), *R. capsulatus* AmtB (AmtB_Rcap), *Rhodobacter sphaeroides* AmtB (AmtB_Rsph), *Rhodospirillum rubrum* AmtB1 (AmtB1_Rrub), *Azospirillum brasilense* AmtB (AmtB_Abra), *Rhodopseudomonas palustris* AmtB1 (AmtB1_Rpal) et *R. capsulatus* AmtY (AmtY_Rcap).

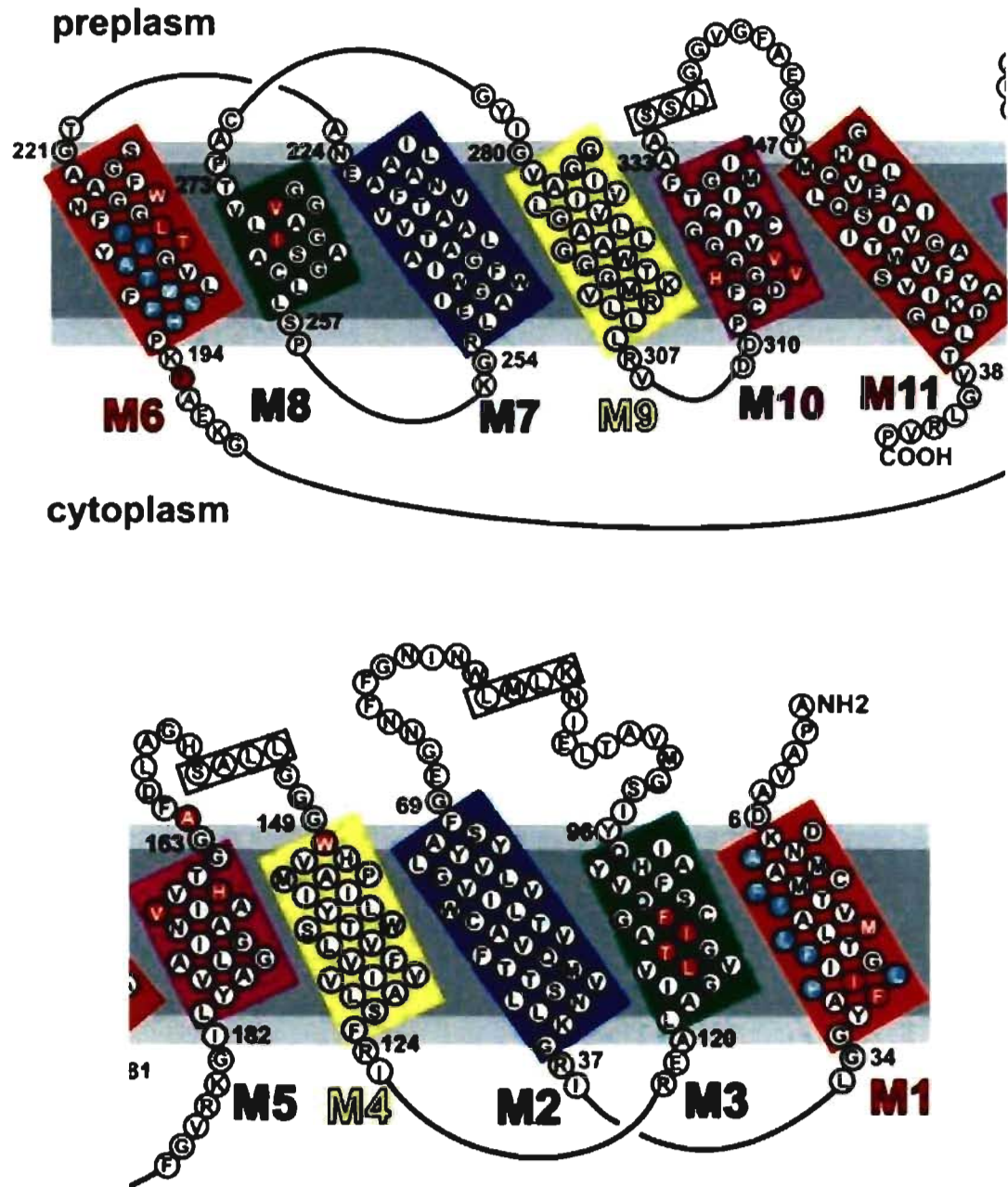


Figure 29. Arrangement topologique de la séquence en acides aminés d'AmtB d'*Escherichia coli*. Les résidus en rouge contribuent à la structure du pore hydrophobe. Les résidus en bleu participent à l'interaction entre les sous-unités de l'homotrimer. À cause de considérations visuelles, la figure a été coupée en deux. Elle débute par l'hélice M6 dans le panneau du haut et se termine par l'hélice M1 dans le panneau du bas. (Figure tirée de Khademi et al., 2004).

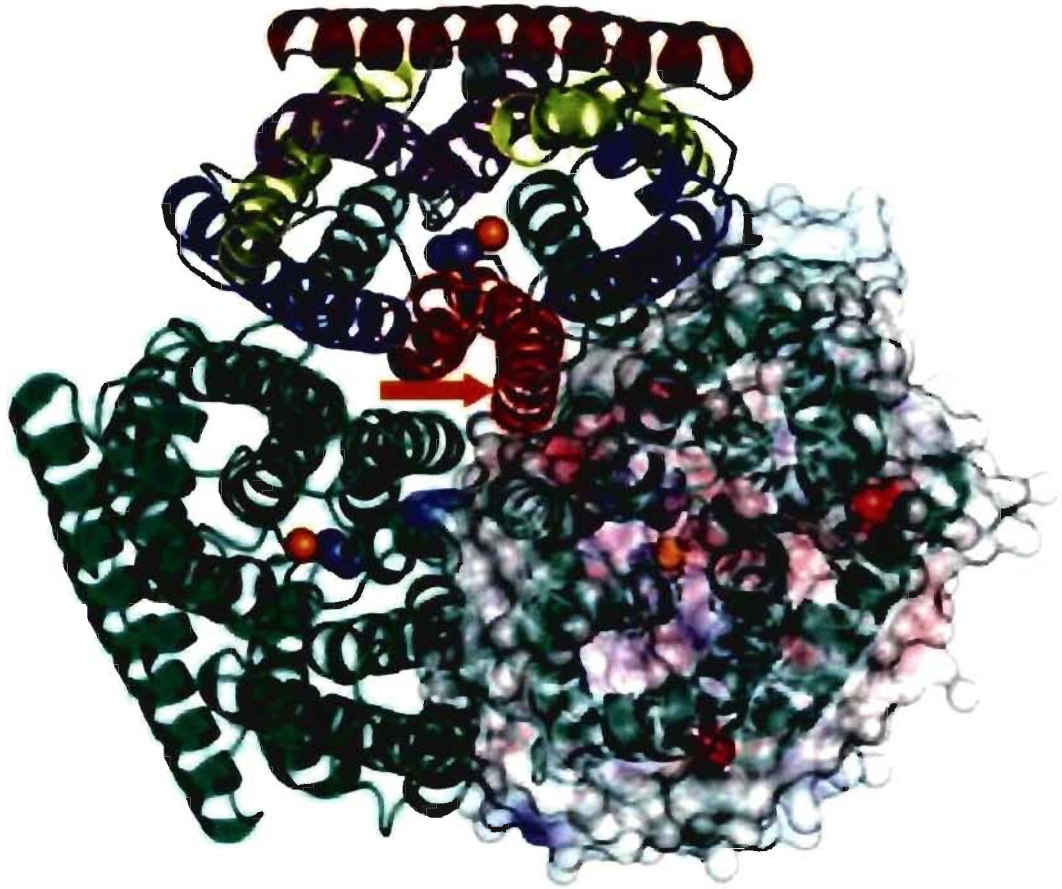


Figure 30. Participation de l'hélice α transmembranaire M1 à la trimérisation d'AmtB d'*Escherichia coli*. La position de l'hélice M1 de l'une des trois sous-unités est indiquée par une flèche orange. Les trois sphères bleues et la sphère orange représentent la localisation potentielle du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. (Figure modifiée à partir de Khademi et al., 2004).

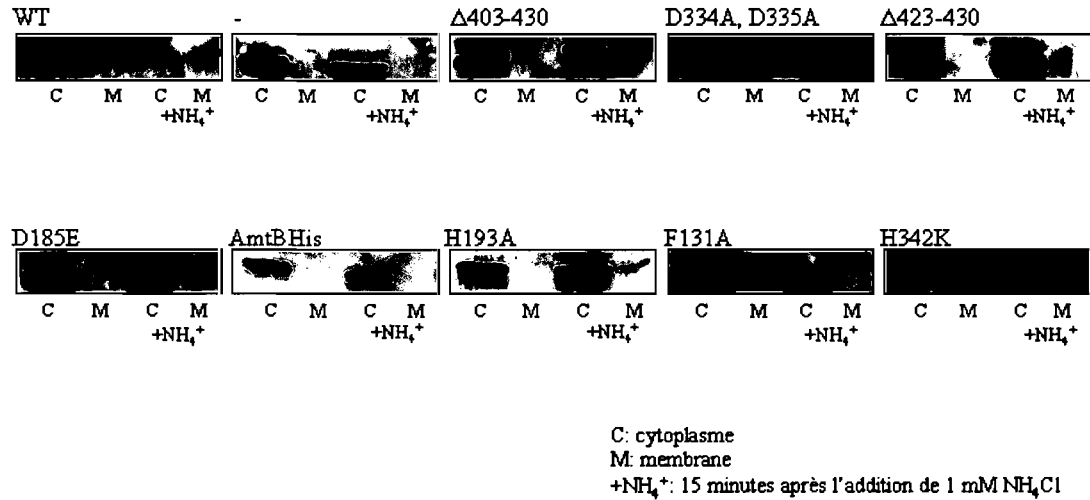


Figure 31. Séquestration de GlnB par des variants AmtB. Deux cultures parallèles de la même souche de *Rhodobacter capsulatus* ont été obtenues dans des conditions de fixation de l'azote. Les souches examinées sont: *R. capsulatus amtB* (-) seul ou complétementée avec un plasmide portant l'opéron *glnKamtB* codant pour AmtB sauvage (WT) ou divers variants AmtB: $\Delta 403-430$, D334A-D335A, $\Delta 423-430$, D185E, AmtBHis, H193A, F131A et H342K. 1 mM de NH₄Cl (+NH₄⁺) a été ajouté 15 minutes avant la récolte à l'une des deux cultures parallèles. Les cellules ont été fractionnées selon un protocole décrit dans l'article #1 de la section résultats. Les fractions cytoplasmiques (C) et membranaires (M) ont été chargées sur un SDS-PAGE (5 ug de protéine par puit). La présence de GlnB a été détectée par Western Blot avec un anticorps polyclonal de lapin Anti-GlnB.

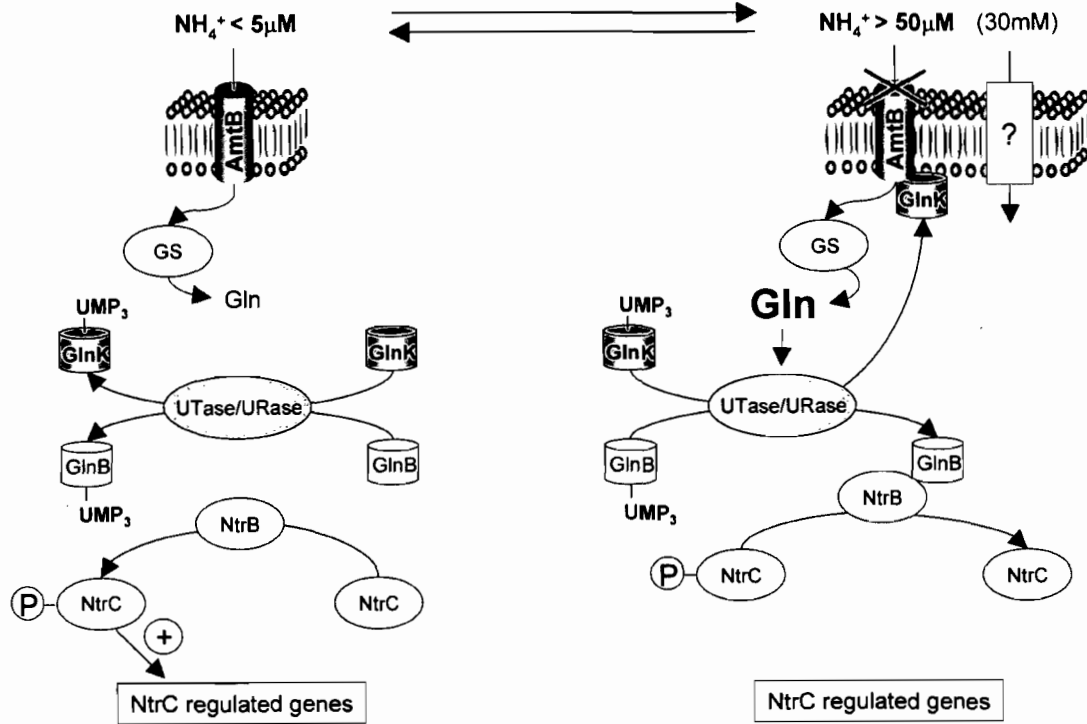


Figure 32. Modèle expliquant la fonction de senseur du niveau d'ammonium d'AmtB d'*Escherichia coli*. (Figure tirée de Javelle et al., 2004). GS = glutamine synthétase, Gln = glutamine, UTase/URase = uridylyltransférase/uridylylremovase (GlnD).

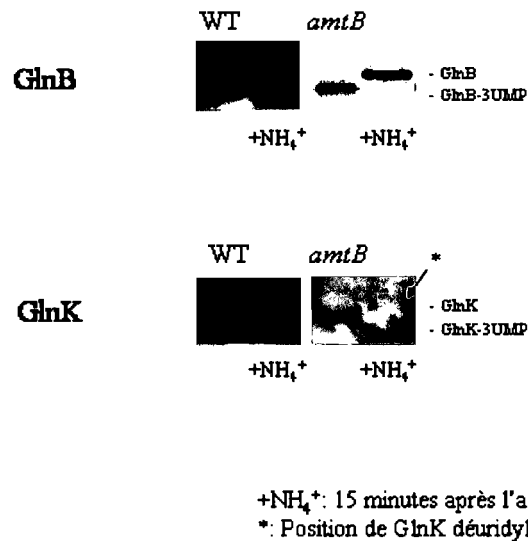


Figure 33. Uridylylation/déuridylylation des protéines PII dans une souche *amtB*. Après exposition ou non durant 15 minutes à 1 mM de NH₄Cl, les extraits cellulaires de la souche sauvage B10S (WT) et de RCA Y63 (*amtB*) ont été récupérés et chargés sur un native-PAGE (5 ug de protéine par puit). Le Western blot a été effectué avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GlnB ou anti-GlnK. À noter, l'inactivation d'*amtB* n'a pas d'effet sur l'accumulation de GlnK. Le résultat présenté ci-haut est la conséquence d'un mauvais transfert. Pour s'en convaincre, voir figure 2B article #1 dans la section résultats.

Souche	Génotype	Temps de doublement (min.)
C43	sauvage	71 ± 8
GT1001 pTRC99a	$\Delta amtB$	206 ± 23
GT1001 pRSG1	$\Delta amtB$ complémente Rc- <i>amtY</i>	107 ± 23

Tableau IV. Temps de doublement de souches d'*E. coli* cultivées dans un milieu minimal M9 à pH 5 en présence de 1 mM NH₄Cl à 37 °C. Le plasmide pRSG1 résulte du clonage d'*amtY* de *R. capsulatus* dans pTRC99A. *amtY* est exprimé à partir d'un promoteur *trc*. Les expériences de croissance ont été effectuées sans IPTG.