

THESE
présentée
DEVANT L'UNIVERSITE PARIS-SUD
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR EN SCIENCES

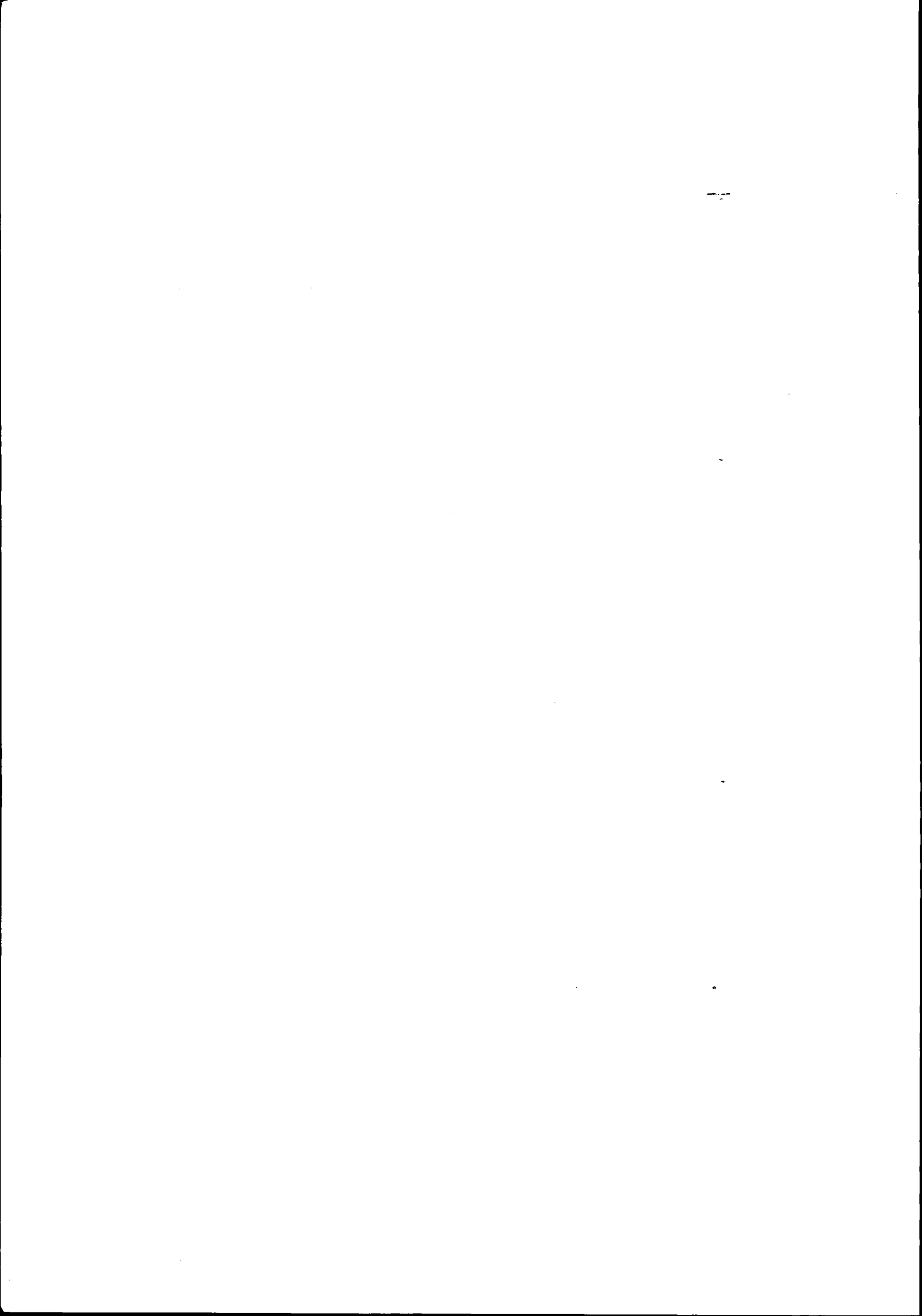
SPECIALITE SCIENCES ALIMENTAIRES

Par
Plinho Francisco HERTZ

CHAINE RESPIRATOIRE ET DESHYDROGENASES FLAVINIQUES CHEZ
***Corynebacterium melassecola* ATCC 17965:**
Contribution à l'étude des voies d'utilisation de
coenzymes intervenant dans les réactions d'oxydo-réduction

Soutenue le 16 novembre 1998 devant la commission d'examen

MM.	J.M. SIMONET	Président
	M. CLAISSE	Rapporteur
	N. LINDLEY	Rapporteur
	A. VERMEGLIO	Examineur
	A. GUYONVARCH	Directeur de thèse



A Mari

en souhaitant que nous soyons plus proche dans les années à venir

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Arnel GUYONVARCH, qui m'a accueilli au Laboratoire d'Ingénierie du Métabolisme et a dirigé mes travaux de recherche.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Maurice CLAISSE et Monsieur le Docteur Nicholas LINDLEY qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Marc SIMONET pour avoir aimablement accepté de participer à la commission d'examen de cette thèse.

*Je voudrais remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur André VERMEGLIO pour son accueil dans le laboratoire au CEA de Cadarrache, ainsi que pour son aide précieuse dans la caractérisation des composés de la chaîne respiratoire de *C. melassecola*.*

Merci Gilles et Marie-Reinne pour votre amitié et pour les moments agréables passés lors des nos entraînements sportifs, littéraires, musicaux, gastronomiques...

Mes remerciements vont à toutes les personnes du Laboratoire d'Ingénierie du Métabolisme et du Laboratoire de Génétique Moléculaire des Bactéries d'Intérêt Industriel. Merci Marie-France, merci pour ton amitié et pour ta lumière. Merci Sylvine et Jacques. Merci chef, tu, tu, tu.....Merci et bon vent Muriel et encore Muriel (des poissons). Merci beaucoup Mumu et Christine, mes hommages et bonne route, n'oubliez pas que l'on n'a jamais été si près. « Saint Clout », Rorô l'Oiseau. Merci Karine, Lynda, Michelle. Je n'oublie pas celles qui sont parties Rose Aimée, Sophie, Emmanuelle et Carole.

Je ne voudrais pas oublier non plus de remercier l'ensemble du personnel de l'IGM qui est parti ou qui y est encore, plus particulièrement, Christine, Anna, Stéphane, Gérard, Manu, Célia, Thomas, Karima, Mark et Luisa (gracias pour votre coeur).

Merci et bonne route Stéphane (Coryneboy de Nancy).

J'exprime mes remerciements à ceux qui pendant leur stage ont contribué à ce travail: Eric et Cédric à qui je souhaite une bonne carrière dans ce domaine.

Merci Nicolas et toute l'équipe du Professeur Shechter qui m'ont toujours accueilli avec sympathie et qui ont été complices quand je venait à la Presse de French pour commettre mes crimes contre les corynebactéries.

Enfin, un grand merci à la France et aux français qui m'ont si bien accueilli et qui m'ont appris tant de choses.

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE.....	1
EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
I. LA PRODUCTION D'ACIDES AMINES PAR LES BACTERIES CORYNEFORMES..	3
I.1. HISTORIQUE.....	3
I.2. TAXONOMIE ET ECOLOGIE.....	3
I.3. IMPORTANCE INDUSTRIELLE.....	4
I.4. LES PROCEDES INDUSTRIELS.....	5
I.5. AMELIORATION DES PERFORMANCES.....	8
I.5.1. Génie microbiologique.....	8
I.5.2. Génie génétique.....	9
II. METABOLISME DES OSES CHEZ LES CORYNEBACTERIES.....	10
II.1. ENTREE DES SUCRES DANS LA CELLULE.....	11
II.2. GLYCOLYSE ET VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES.....	11
II.3. LES VOIES ANAPLEROTIQUES.....	15
II.4. DECARBOXYLATION OXYDATIVE DE L'ACIDE PYRUVIQUE.....	17
II.5. CYCLE DE KREBS ET VOIE DU GLYOXYLATE.....	19
II.6. CALCUL DES FLUX METABOLIQUES CHEZ <i>C. MELASSECOLA</i>	23
III. LA RESPIRATION CHEZ LES BACTERIES.....	29
III.1. ATP SYNTHASE.....	30

III.2. CHAINE RESPIRATOIRE.....	31
<i>III.2.1. Déshydrogénases</i>	33
<i>III.2.2. Succinate déshydrogénase</i>	35
<i>III.2.3. NADH déshydrogénase</i>	36
<i>III.2.4. Lipoamide déshydrogénase</i>	39
<i>III.2.5. Composés intermédiaires transporteurs d'électrons</i>	40
<i>III.2.6. Complexe quinol-cytochrome c réductase</i>	44
<i>III.2.7. Oxydases terminales</i>	45
III.3. CHAINES RESPIRATOIRES RAMIFIEES ET IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE.....	47
MATERIELS ET METHODES.....	51
I. MATERIEL BIOLOGIQUE	52
I.1. SOUCHES BACTERIENNES.....	52
<i>I.1.1. Corynebacterium melassecola</i>	52
<i>I.1.2. Escherichia coli</i>	52
I.2. PLASMIDES.....	53
<i>I.2.1. pGEM-T</i>	53
<i>I.2.2. pUN 121</i>	53
II. CONDITIONS DE CULTURE ET DE TRANSFORMATION.....	53
II.1. CONDITIONS DE CULTURE.....	53
II.2. TRANSFORMATION BACTERIENNE.....	55
<i>II.2.1. Préparation de cellules compétentes de E.coli</i>	55
<i>II.2.2. Electroporation</i>	55
III. METHODES BIOCHIMIQUES.....	56
III.1. PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES DE <i>C. MELASSECOLA</i> ET DOSAGE DES PROTEINES.....	56
<i>III.1.1. Extrait cellulaire brut</i>	56

III.1.2. Fraction cytosoluble et fraction membranaire.....	56
III.1.3. Dosages des protéines	57
III.2. SEPARATION DES PROTEINES ET DETECTION D'ACTIVITES ENZYMATIQUES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE ..	57
III.2.1. Séparation des protéines en gel dénaturant.....	57
III.2.2. Détection d'activités enzymatiques NAD(P)H ₂ dépendantes	58
III.2.2.1. NADH oxydase.....	58
III.2.2.2. Diaphorase.....	58
III.3. DOSAGES ENZYMATIQUES	59
III.3.1. NADH oxydase, NADH déshydrogénase et NADH-DQ réductase	59
III.3.2. Activité transhydrogénase	60
III.3.3. Activité lipoamide déshydrogénase.....	60
III.4. ESTIMATION DE LA RESPIRATION CELLULAIRE PAR OXYGRAPHIE.....	60
III.5. SOLUBILISATION DE PARTICULES SEDIMENTEES PAR ULTRACENTRIFUGATION.....	61
III.5.1. Solubilisation à la phospholipase A	61
III.5.2. Solubilisation au Triton X100 + NaCl.....	61
III.6. PURIFICATION DE L'ACTIVITE NADH OXYDASE DES EXTRAITS CELLULAIRES BRUTS	62
III.6.1. Préparation des extraits cellulaires bruts.....	62
III.6.2. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	62
III.6.3. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	63
III.6.4. Chromatographie d'échange ionique.....	63
III.7. PURIFICATION DE LA LIPOAMIDE DESHYDROGENASE DES EXTRAITS CELLULAIRES,	
FRACTION CYTOSOLUBLE	63
III.7.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	64
III.7.2. Chromatographie d'interaction hydrophobe.....	64
III.8. MESURES SPECTROPHOTOMETRIQUES	65
III.8.1. Spectres d'oxydo-réduction des membranes.....	65
III.8.2. Identification des accepteurs d'électrons utilisés par les enzymes de la fraction cytosoluble.....	65

IV. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	66
IV.1. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE.....	66
IV.2. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE DE <i>E. COLI</i>	66
IV.3. DIGESTION, ELECTROPHORESE, ISOLEMENT ET LIGATURE DE L'ADN.....	67
<i>IV.3.1. Digestion de l'ADN.....</i>	<i>67</i>
<i>IV.3.2. Electrophorèse de l'ADN.....</i>	<i>67</i>
<i>IV.3.3. Isolement et purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'électrophorèse.....</i>	<i>68</i>
<i>IV.3.4. Ligature de deux fragments d'ADN.....</i>	<i>68</i>
IV.4. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR).....	68
IV.5. HYBRIDATION MOLECULAIRE.....	69
<i>IV.5.1. Hybridation sur colonies.....</i>	<i>69</i>
<i>IV.5.2. Hybridation Southern.....</i>	<i>71</i>
IV.6. DETERMINATION DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES.....	71
RESULTATS ET DISCUSSION.....	72
I. INTRODUCTION: ETAT DU SUJET.....	73
II. ETUDE DE L'ACTIVITE NADH OXYDASE DES EXTRAITS CELLULAIRES DE CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA : ESSAIS DE PURIFICATION.....	74
II.1. DETERMINATION DU PH OPTIMAL.....	74
II.2. DETERMINATION DE LA STABILITE DE L'ACTIVITE NADH OXYDASE.....	76
II.3. PURIFICATION PARTIELLE DE L'ACTIVITE NADH OXYDASE.....	78
II.4. MISE AU POINT D'UN NOUVEAU PROTOCOLE D'OBTENTION D' EXTRAITS CELLULAIRES CONTENANT L'ACTIVITE NADH OXYDASE.....	81

II.5. ETUDE DE L'ACTIVITE NADH OXYDASE DE LA FRACTION SEDIMENTEE DES EXTRAITS CELLULAIRES DE <i>C. MELASSECOLA</i>	82
II.5.1. Solubilisation de l'activité NADH oxydase de la fraction sédimentée (PS)	84
II.5.2. Mise en évidence d'une chaîne respiratoire dans la fraction membranaire de <i>C. melassecola</i>	86

III. ETUDE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE DE *CORYNEBACTERIUM*

MELASSECOLA87

III.1. MESURE DE LA RESPIRATION DES CELLULES ENTIERES DE

C. MELASSECOLA..... 88

III.1.1. Effet des effecteurs du complexe I sur la respiration chez *C. melassecola* 90

III.1.2. Effet des effecteurs du complexe III sur la respiration chez *C. melassecola* 93

III.1.3. Effet des effecteurs du complexe IV sur la respiration chez *C. melassecola*..... 96

III.2. ETUDE DE L'OXYDATION DU NADH₂ PAR LES COMPOSES DE LA FRACTION

MEMBRANAIRE DE *C. MELASSECOLA* 98

III.2.1. Confirmation de la présence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle dans la fraction membranaire de *C. melassecola*100

III.2.2. Etude du Complexe I de la chaîne respiratoire de *C. melassecola*.....103

III.2.3. Etude du Complexe II de la chaîne respiratoire de *C. melassecola*.....106

III.2.4. Analyse de la composition en cytochromes de la chaîne respiratoire de *C. melassecola*.....108

III.2.5. Complexe III ou Quinol / cytochrome c réductase chez *C. melassecola*110

III.2.6. Complexe III ou Oxydases terminales chez *C. melassecola*.....111

IV. ETUDE DE L'ACTIVITE NADH OXYDASE DE LA FRACTION

CYTOSOLUBLE DE *CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA* 115

IV.1. EFFET DES INHIBITEURS DE LA CHAINE RESPIRATOIRE SUR L'ACTIVITE NADH OXYDASE

MISE EN EVIDENCE DANS LA FRACTION CYTOSOLUBLE..... 115

IV.2. EFFET DE DIFFERENTS EFFECTEURS SUR L'ACTIVITE NADH OXYDASE

MISE EN EVIDENCE DANS LA FRACTION CYTOSOLUBLE..... 118

IV.3. MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES DIAPHORASE DANS LA FRACTION CYTOSOLUBLE DES EXTRAITS DE <i>C. MELASSECOLA</i>	123
IV.4. PURIFICATION DE L'ENZYME RESPONSABLE DES ACTIVITES TRANSHYDROGENASE ET NADH OXYDASE DE LA FRACTION CYTOSOLUBLE DES EXTRAITS DE <i>C. MELASSECOLA</i>	127
IV.4.1. Identification de l'enzyme purifiée: caractéristiques spectrales et microséquençage de peptides	129
IV.4.2. Détermination des conditions optimales de l'activité lipoamide déshydrogénase de <i>C. melassecola</i>	132
IV.4.3. Autres accepteurs d'électrons utilisées par la lipoamide déshydrogénase.....	134
V. CLONAGE ET ETUDE DU GENE <i>LPD</i> DE <i>CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA</i> CODANT LA LIPOAMIDE DESHYDROGENASE.....	139
V.1. STRATEGIE ENVISAGEE.....	139
V.2. CLONAGE DU GENE <i>LPD</i>	140
V.2.1. Obtention d'une sonde spécifique.....	140
V.2.2. Criblage de la banque d'ADN de <i>C. melassecola</i>	142
V.2.3. Analyse du contenu plasmidique des clones retenus.....	143
V.2.4. Origine des fragments clonés.....	145
V.3. DETERMINATION DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DU LOCUS <i>LPD</i> DE <i>C. MELASSECOLA</i>	145
V.4. ANALYSE DE LA SEQUENCE DU LOCUS <i>LPD</i> DE <i>C. MELASSECOLA</i>	149
V.4.1. Analyse de la phase ouverte de lecture codant la lipoamide déshydrogénase.....	152
V.4.2. Analyse de la partie 5' non traduite du gène <i>lpd</i>	158
V.4.3. Analyse de la partie 3' non traduite du gène <i>lpd</i>	159
CONCLUSION.....	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	163

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

	page
Tableau 1. Longueur d'onde des pics d'absorbance des trois principaux cytochromes.....	43
Tableau 2. Comparaison de l'effet de plusieurs traitements et substances sur l'activité NADH oxydase présente dans l'extrait cellulaire de <i>Corynebacterium melassecola</i>	77
Tableau 3. Essai de purification de l'activité NADH oxydase de <i>Corynebacterium melassecola</i>	81
Tableau 4. Solubilisation de l'activité NADH oxydase de <i>Corynebacterium melassecola</i> présente dans la fraction membranaire.....	85
Tableau 5. Constantes d'inhibition (IC ₅₀) de la Capsaïcine, Antimycine A et NaCN sur l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire et sur la respiration de <i>Corynebacterium melassecola</i>	102
Tableau 6. Activités oxydase et oxydoréductase dans les extraits cellulaires de <i>Corynebacterium melassecola</i>	119
Tableau 7. Action du FAD et du FMN sur les activités enzymatiques catalysées par des enzymes présentes dans la fraction cytosoluble (FS).....	123
Tableau 8. Activité transhydrogénase de la fraction soluble des extraits protéiques de <i>Corynebacterium melassecola</i>	126
Tableau 9. Purification de la transhydrogénase sNADH ₂ / NAD ⁺ de <i>Corynebacterium melassecola</i>	129
Tableau 10. Comparaison entre les activités (d)NADH oxydase et (d)NADH-duroquinone réductase catalysées par les enzymes de la fraction soluble et par la lipoamide déshydrogénase pure.....	138
Figure 1. Schéma métabolique de la sécrétion d'acides aminés.....	7

Figure 2.	Schéma simplifié du métabolisme central des corynébactéries.....	12
Figure 3.	Schéma de la séquence réactionnelle conduisant à la décarboxylation du pyruvate en Acétyl-CoA.....	20
Figure 4.	Organisation générale du métabolisme bactérien conduisant à la formation d'une cellule.....	25
Figure 5.	Distribution des flux au sein des voies métaboliques centrales lors de la croissance de <i>C. melassecola</i> sur glucose.....	27
Figure 6.	Schéma simplifié du couplage entre transfert d'électron et formation d'ATP.....	31
Figure 7.	Chaînes respiratoires bactériennes aérobies.....	46
Figure 8.	Représentation schématique des différents composants de la chaîne respiratoire aérobie chez <i>Escherichia coli</i>	48
Figure 9.	Représentation schématique des différents composants de la chaîne respiratoire aérobie chez <i>Paracoccus denitrificans</i>	49
Figure 10.	Schéma d'obtention des extraits cellulaires de <i>Corynebacterium melassecola</i>	75
Figure 11.	Détermination du pH optimal pour l'activité NADH oxydase des extraits de <i>Corynebacterium melassecola</i>	76
Figure 12.	Chromatographie d'exclusion moléculaire sur une colonne Toyopearl HW 65. Profil d'élution des extraits cellulaires de <i>Corynebacterium melassecola</i>	80
Figure 13.	Schéma d'extraction et de séparation des fractions soluble et sédimentable des extraits protéiques de <i>Corynebacterium melassecola</i>	83
Figure 14.	Effet du cyanure de sodium ajouté en cours de cinétique de mesure de l'activité NADH oxydase dans la fraction membranaire de <i>Corynebacterium melassecola</i>	87

Figure 15.	Consommation d'oxygène des cellules entières de <i>Corynebacterium melassecola</i> avec et sans ajout de succinate.....	89
Figure 16.	Sites d'action des inhibiteurs du transfert d'électrons entre le NADH ₂ ou le TMPD et l'oxygène à travers une chaîne respiratoire de type mitochondrial.....	91
Figure 17.	Effet de la <i>p</i> -benzoquinone à des doses variables sur la consommation d'oxygène de <i>Corynebacterium melassecola</i>	92
Figure 18.	Effet de la Capsaïcine à des doses variables sur la consommation d'oxygène de <i>Corynebacterium melassecola</i>	93
Figure 19.	Effet de l'antimycine à des doses variables sur la consommation d'oxygène de <i>Corynebacterium melassecola</i>	94
Figure 20.	Effet de l'antimycine et du TMPD sur la consommation d'O ₂ par des cellules entières de <i>Corynebacterium melassecola</i>	95
Figure 21.	Effet du TMPD et du Cyanure de sodium sur la consommation d'O ₂ par les cellules entières de <i>Corynebacterium melassecola</i>	97
Figure 22.	Effet du cyanure de sodium à des doses variables sur la consommation d'oxygène de <i>Corynebacterium melassecola</i>	98
Figure 23.	Détermination du pH optimal pour la mesure de l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire de <i>Corynebacterium melassecola</i>	100
Figure 24.	Cinétique d'oxydation du NADH ₂ et du NADPH ₂ par la fraction membranaire de <i>Corynebacterium melassecola</i>	103
Figure 25.	Inhibition de l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire de <i>Corynebacterium melassecola</i> par des ajouts croissants de DCCD.....	104

Figure 26. Inhibition de l'activité NADH déshydrogénase des PS de <i>Corynebacterium melassecola</i> par des ajouts croissants de Capsaïcine.....	105
Figure 27. Mise en évidence de l'activité succinate déshydrogénase dans la fraction membranaire (PS) de <i>Corynebacterium melassecola</i>	107
Figure 28. Analyse spectrophotométrique à basse température (77 °K) de la composition en cytochromes des membranes de <i>Corynebacterium melassecola</i>	109
Figure 29. Inhibition de l'activité NADH déshydrogénase des membranes de <i>Corynebacterium melassecola</i> par des ajouts croissants d'antimycine A.....	110
Figure 30. Inhibition de l'activité NADH déshydrogénase des membranes de <i>Corynebacterium melassecola</i> par des ajouts croissants de cyanure de sodium.....	112
Figure 31. Schéma possible de la chaîne respiratoire chez <i>Corynebacterium melassecola</i> ATCC 17965.....	114
Figure 32. Effet du cyanure de sodium ajouté en cours de cinétique de mesure de l'activité NADH oxydase dans la fraction cytosoluble des extraits cellulaires de <i>Corynebacterium melassecola</i>	116
Figure 33. Effet des différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire sur l'activité NADH oxydase de la fraction cytosoluble (FS) de <i>Corynebacterium melassecola</i>	117
Figure 34. Activité NADH oxydase de la fraction cytosoluble (FS) en fonction de la phase de croissance de <i>Corynebacterium melassecola</i> sur milieu riche.....	118
Figure 35. Détermination du pH optimal pour les activités NADH oxydase et NADH-duroquinone réductase de la fraction soluble des extraits de <i>Corynebacterium melassecola</i>	120

Figure 36. Spectres d'oxydation du NADH ₂ en présence de FAD et FMN par la fraction cytosoluble des extraits de <i>Corynebacterium melassecola</i>	122
Figure 37. Révélation des activités enzymatiques des extraits de <i>C. melassecola</i> capables d'utiliser le NAD(P)H ₂ pour réduire des accepteurs d'électrons artificiels, après électrophorèse sur gel d'acrylamide 7,5%.....	124
Figure 38. Chromatographies de la « transhydrogénase » (TDH) de <i>Corynebacterium melassecola</i>	128
Figure 39. Profils protéiques des étapes de purification de la transhydrogénase de <i>Corynebacterium melassecola</i> par séparation électrophorétique sur gel d'acrylamide 7,5% en conditions dénaturantes(SDS-PAGE).....	130
Figure 40. Caractéristiques spectrales de l'enzyme purifié à partir des extraits cellulaires cytosolubles de <i>Corynebacterium melassecola</i>	131
Figure 41. Détermination des conditions optimales d'activité en fonction du pH et de la température pour la lipoamide déshydrogénase de <i>Corynebacterium melassecola</i>	133
Figure 42. Révélation de l'activité diaphorase de la lipoamide déshydrogénase purifiée de <i>C. melassecola</i> , après électrophorèse sur gel d'acrylamide 7,5%.....	135
Figure 43. Accepteurs d'électrons utilisées par la lipoamide déshydrogénase de <i>Corynebacterium melassecola</i>	136
Figure 44. Mise en évidence d'une activité NADH ₂ / sNAD ⁺ transhydrogénase dans la fraction cytosoluble de <i>Corynebacterium melassecola</i>	137
Figure 46. Hybridation ADN / ADN entre pHL2, pHL3 et la sonde <i>lpd</i> isolée de pHL1.....	144
Figure 47. Hybridation par la méthode de Southern.....	146

Figure 48	Stratégie de séquençage et carte de restriction du locus <i>lpd</i> de <i>Corynebacterium melassecola</i>	148
Figure 49.	Séquence nucléotidique du gène <i>lpd</i> de <i>Corynebacterium melassecola</i> et séquence déduite en acides aminés.....	150
Figure 50.	Comparaison des séquences de lipoamide déshydrogénases bactériennes.....	153
Figure 51.	Utilisation des codons.....	155
Figure 52.	Caractéristiques structurales et fonctionnelles de la lipoamide déshydrogénase de <i>Corynebacterium melassecola</i>	157

ABREVIATIONS

AcPyAD	Acétyl Pyridine Dinucléotide
CCCP	carbonyl-cyanide- <i>p</i> -trichlorophenylhydrazone
CTAB	hexadecyltrimethylammoniumbromide
DCCD	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCIP	2,6-dichlorophenol Indophenol
DQ	tetramethyl- <i>p</i> -benzoquinone (duroquinone)
EMP	voie Entner-Doudoroff-Parnas
HMS	voie des Hexoses Monophosphates
IC ₅₀	Concentration en inhibiteur provoquant 50% de l'inhibition maximale
INT	2- <i>p</i> -iodophenyl-3- <i>p</i> -nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride
MTT	3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADHox	NADH oxydase
dNAD	nicotinamide hypoxanthine dinucléotide (déamino NAD)
sNAD	thionicotinamide adénine dinucléotide (thio NAD)
NBT	2,2'-di- <i>p</i> -nitrophényl-5,5' diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenylene)-ditetrazolium chloride
NDH-1	NADH quinone réductase liée à un site de couplage énergétique
NDH-2	NADH quinone réductase non liée à un site de couplage énergétique
O.R.F.	Phase ouverte de lecture
PC	Pyruvate carboxylase
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PEP	Phospho(énol)pyruvate
PEPC	Phospho(énol)pyruvate Carboxylase
PMS	N-methyldibenzopyrazine methyl sulfate
P/O	Efficacité de la phosphorylation oxydative
P/T	codons préférentiels utilisés dans une O.R.F. / nombre total de codons
PTS	Système Phospho Transférase

SDH	Succinate Déshydrogénase
SSCx20	NaCl 3 M, Na ₃ Citrate.2H ₂ O 0,3 M, pH 7,0
STE	Système de transport d'électrons
TAE	Tris-acétate 0,04 M, EDTA 0,002 M, pH 8,5
TBE	Tris 0,089 M, Borate 0,089 M, EDTA 0,2 mM, pH 8,0
TDH	Transhydrogénase
TE	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine
TPP	Thiamine Pyrophosphate

PREAMBULE

Le thème central des recherches menées au sein du Laboratoire d'Ingénierie du Métabolisme de l'Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris XI, centre d'ORSAY, est l'étude du métabolisme central de *Corynebacterium glutamicum* (*melassecola*), et des mécanismes qui régulent celui-ci.

Cette étude est menée depuis plusieurs années déjà en collaboration avec plusieurs laboratoires français et étrangers, ainsi qu'avec plusieurs firmes industrielles qui mettent en oeuvre cet organisme, ou des espèces proches, pour la production d'acides aminés par voie biotechnologique. Les efforts des différents groupes sont coordonnés actuellement au sein de plusieurs structures et projets, tant au niveau français (GDR 1157, programme PIRGP), qu'au niveau européen (programme Cell Factories). Ce regroupement de compétences permet d'aborder l'étude du métabolisme de *C. glutamicum* par différentes approches impliquant des technologies variées et complémentaires (Microbiologie classique, Analyse macroscopique en fermenteurs, R.M.N., Analyse chimique, Analyse biochimique, Biologie moléculaire, Modélisation mathématique).

Le travail présenté ici s'inscrit entièrement dans cette démarche globale d'étude.

Dans un premier temps, seront résumées un certain nombre de connaissances acquises au cours des années sur le métabolisme central de *C. glutamicum* et des espèces proches. Cet exposé mettra en évidence un déficit d'informations concernant le problème de l'interconversion des métabolites énergétiques dans cette espèce. Les connaissances sur ce sujet, acquises sur d'autres organismes, seront alors exposées.

L'étude détaillée des éléments d'interconversion des cofacteurs chez *C. melassecola*, chaîne respiratoire, oxydoreductases cytosolubles, sera alors présentée, ainsi qu'un travail spécifique d'analyse de la structure d'un gène dont le produit est impliqué à la fois dans le support des flux carbonés au sein des voies métaboliques centrales, et très probablement dans le transfert d'électrons à la chaîne respiratoire.

L'ensemble des données acquises au cours de ce travail de thèse sera analysé en fonction de l'ensemble des connaissances acquises par ailleurs.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La production d'acides aminés par les bactéries corynéformes

I.1. Historique

Adjuvant traditionnel de la cuisine asiatique, le glutamate monosodique est utilisé pour renforcer le goût des aliments et ainsi augmenter l'appétence. Depuis longtemps les japonais utilisaient dans leur alimentation des algues de la famille des laminaires (Kombu, *Laminaria japonica*) qui possèdent cette caractéristique organoleptique. C'est au cours de l'année 1908 que Ikeda a découvert que cette propriété était liée à la présence d'acide glutamique en grande quantité dans ces algues (Kinoshita, 1988). A partir de 1909, cet acide aminé a été produit par hydrolyse acide de protéines végétales. Dans les années 1950, les européens ont commencé eux aussi à produire l'acide glutamique (Renaud, 1983). Il était alors obtenu par extraction à partir de la caséine du gluten de blé, mais surtout à partir des vinasses de distillerie et des mélasses de betterave. C'est en 1957 que Kinoshita *et al.*, isolent et décrivent une souche bactérienne capable de produire par « fermentation » de l'acide glutamique à partir de glucose et de sels d'ammonium (Kinoshita, 1972). Originellement désigné *Micrococcus glutamicus*, le micro-organisme isolé par Kinoshita a été appelée par la suite *Corynebacterium glutamicum* et classé parmi les corynébactéries. En Europe, la demande croissante en glutamate et une diminution de la disponibilité des vinasses ont, dans les années 1960, commandé les débuts de la production industrielle par « fermentation » (Renaud, 1983).

I.2. Taxonomie et écologie

Bien qu'elles ne forment pas de mycelium vrai, les corynébactéries sont classées dans le groupe des Actinomycètes (Jones et Collins, 1986). Ce sont des bactéries à Gram positif, Catalase positif, pléiomorphes et asporogènes. Certaines sont des agents pathogènes de l'homme, des animaux, des plantes (ex.: *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium tritici*). Les corynébactéries sont largement distribuées dans la nature et les souches utilisées industriellement ont été généralement isolées du sol (Pons *et al.*, 1993).

Ce sont des souches aérobies ou anaérobies facultatives et mésophiles (température optimale de croissance d'environ 35 °C).

Les corynébactéries utilisées dans la production d'acides aminés font partie essentiellement des genres *Brevibacterium* et *Corynebacterium*. Une caractéristique importante de ces deux genres est la présence d'acide *meso*-diaminopimélique dans la paroi (Malumbres *et al.*, 1993). La présence d'arabinogalactane dans la paroi des bactéries du genre *Corynebacterium*, les différencie des bactéries du genre *Brevibacterium* (Jones et Collins, 1986). D'autres caractéristiques taxonomiques basées sur des caractères structuraux, telles la présence d'acides mycoliques (Collins *et al.*, 1982), la composition en acides gras, en quinones et en lipides polaires (Collins *et al.*, 1980) sont employées pour la classification.

Les corynébactéries sont hétérogènes en ce qui concerne la composition en G+C de leur génome (46-78%; Yamada et Komagata, 1970). Cependant, les bactéries du genre *Corynebacterium* appartenant au groupe des bactéries dites productrices d'acide glutamique, sont beaucoup plus homogènes (50 à 62% en G+C; Yamada et Komagata, 1970; Malumbres *et al.*, 1993). L'analyse faite par Malumbres *et al.* (1993) de la séquence nucléotidique de sept gènes de *Brevibacterium lactofermentum* et *C. glutamicum* (*hom*, *thrC*, *orfX*, *trpL*, *trpE* et *dapA*) a montré que le contenu en G+C de ces deux bactéries est très similaire: 55,96% pour *B. lactofermentum* et 55,89 pour *C. glutamicum*. Selon ces auteurs, la similarité de l'ADN génomique entre *C. glutamicum* ATCC 13032 et *B. lactofermentum* ATCC 13655 est proche de 100%. Cependant il existe des différences au niveau des propriétés biochimiques et physiologiques de ces deux bactéries (Eikmanns *et al.*, 1991). De plus, des différences lors de l'analyse des profils de restriction de l'ADN génomique de ces micro-organismes ainsi que de *Brevibacterium flavum* ont été observées par Eikmanns *et al.* (1991).

1.3. Importance industrielle

D'une manière générale, différents micro-organismes peuvent être utilisés dans la production industrielle d'acides aminés. Parmi ces micro-organismes on trouve *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, mais aussi, dans des procédés particuliers, d'autres bactéries comme

Bacillus subtilis, plusieurs espèces de *Pseudomonas* ainsi que des levures (Krämer, 1994). Cependant, ce sont les corynébactéries (*Corynebacterium* sp et *Brevibacterium* sp) qui sont utilisées dans la grande majorité des cas.

Outre les acides aminés, les corynébactéries interviennent aussi, dans une moindre mesure, dans la production de nucléotides agents de saveur comme l'acide inosinique, l'acide guanilique et plusieurs autres tels que l'ATP, l'ADP, l'AMP, le GDP, le GTP, le FAD et le NAD (Kinoshita, 1972). Certaines souches de *Brevibacterium linens* sont aussi impliquées dans la maturation de fromages (Boyaval et Desmazeaud, 1983).

Sur le plan mondial, la production industrielle d'acides aminés par la voie microbiologique est d'une grande importance économique. Les principaux acides aminés produits par cette industrie sont le glutamate, la lysine, la thréonine, la phénylalanine, la glutamine, l'arginine, le tryptophane, l'isoleucine, et l'histidine. Ils sont utilisés principalement dans l'alimentation humaine (monosodium-L-glutamate), dans l'alimentation animale (DL-méthionine, L-thréonine et L-lysine), dans les produits pharmaceutiques (sels d'acide glutamique, d'acide aspartique, d'arginine et la L-dihydroxyphénylalanine), dans l'alimentation parentérale (divers acides aminés), dans la cosmétologie (cystéine et hydroxyproline) et d'autres applications (Pons *et al.*, 1993). En termes de production annuelle, c'est l'acide glutamique qui arrive en première place, environ 500 000 t., suivi de la lysine, environ 200 000 t. (Krämer, 1996). L'acide glutamique, de par ses propriétés à renforcer les saveurs, est utilisé par l'industrie alimentaire dans les plats déshydratés, dans les biscuits apéritifs, dans les bouillons et potages, à des doses comprises entre 0,35 et 0,70 % du produit dans l'assiette (Renaud, 1983).

1.4. Les procédés industriels

La sécrétion des acides aminés est l'étape finale dans une séquence d'événements métaboliques permettant l'utilisation de bactéries comme agents de production (Figure 1). Cette séquence d'événements métaboliques est décrite par Krämer (1994) dans une révision sur la physiologie et les mécanismes de la sécrétion d'acides aminés par les bactéries. Dans un premier

temps, le substrat (source de carbone et d'énergie) est capté par un ou plusieurs systèmes de transport. Le substrat est ensuite converti à l'intérieur du réseau métabolique cellulaire. Au départ le substrat passe par les voies du métabolisme central, (glycolyse, voie des pentoses phosphate, cycle de Krebs) à partir desquelles part la voie de synthèse de l'acide aminé d'intérêt. D'autres voies de biosynthèse peuvent rester fonctionnelles même dans des conditions optimales de production. Lors de perturbations dans la répartition des flux, ces autres voies peuvent prendre une importance significative, et faire ainsi baisser le flux de biosynthèse de l'acide aminé d'intérêt. Le réseau métabolique complet est régulé par des mécanismes de rétroinhibition et/ou par des altérations dans le niveau de l'expression des enzymes impliqués (induction, répression). Finalement l'acide aminé doit traverser la barrière de la membrane cytoplasmique, de manière active ou passive.

La sécrétion de glutamate chez les souches de *Brevibacterium* ou de *Corynebacterium* est obtenue dans les procédés industriels par des altérations au niveau des membranes cellulaires. Dans les premiers procédés industriels, ces altérations de membrane étaient obtenues par la culture des souches dans des conditions de carence en biotine, car elles sont auxotrophes pour cette vitamine, cofacteur essentiel de la synthèse des acides gras (Shiio *et al.*, 1962). Les altérations dans la membrane peuvent aussi être obtenues par addition de surfactants en phase exponentielle de croissance: les acides gras exogènes sont incorporés dans les lipides (Takinami *et al.*, 1968), la synthèse de nouveaux acides gras est inhibée et les cellules perdent environ la moitié de leurs lipides membranaires (Huchenq *et al.*, 1984). Ceci induit une augmentation du contenu en acides gras saturés des lipides (Huchenq *et al.*, 1984) et une grande diminution du contenu en phospholipides des cellules (Huchenq *et al.*, 1984; Clement et Lanéelle, 1986). L'addition des surfactants inhibe la croissance sans que celle-ci s'arrête complètement (Clement *et al.*, 1984). Toutefois, Hoischen et Krämer (1990) ont montré que les altérations de membrane sont nécessaires mais pas suffisantes pour expliquer la sécrétion de glutamate. D'autre part, il a été démontré que les sécrétions d'isoleucine (Zittrich et Krämer, 1994), de thréonine, de lysine et de glutamate (Krämer, 1996) chez *C. glutamicum* ne sont pas purement passives, mais effectuées par des transporteurs. Finalement, selon Krämer (1996), une meilleure connaissance des mécanismes, de la régulation et de l'énergétique des transports

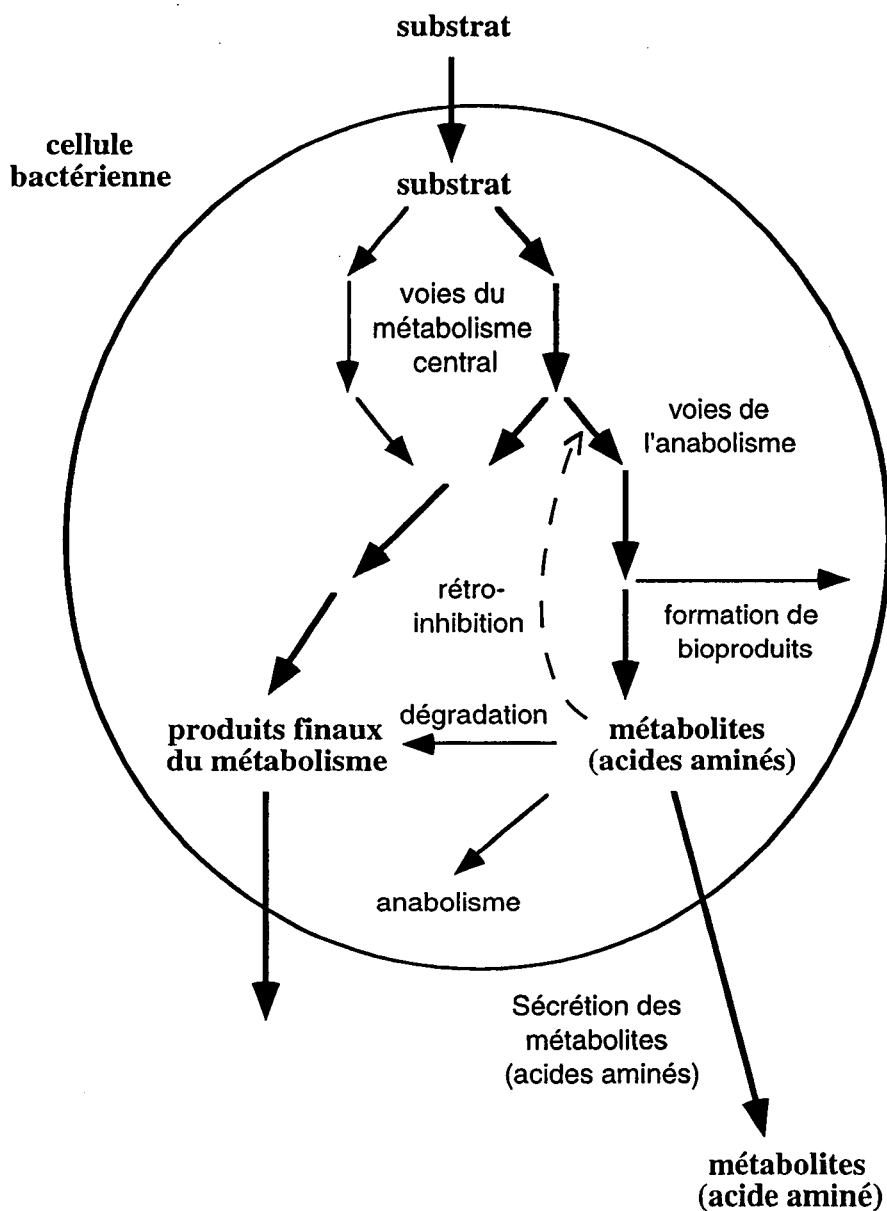


Figure 1. Schéma métabolique de la sécrétion d'acides aminés
(D'après Krämer, 1994).

transmembranaires d'acides aminés, est d'une extrême importance dans la compréhension et l'amélioration des procédés de production .

1.5. Amélioration des performances

Lors des premières tentatives de production par « fermentation » effectuées avec *C. glutamicum*, en présence de glucose, d'ammonium et de sels minéraux, environ 30 g/l de glutamate furent sécrétés dans le milieu par les cellules (Kinoshita, 1972). Depuis, les performances n'ont cessé de croître, elles sont à l'heure actuelle d'environ 100 g/l, avec un rendement de conversion d'environ 65%. Cette augmentation de productivité est le fruit d'améliorations soit au niveau des procédés, soit au niveau des caractéristiques propres du micro-organisme. Ces dernières ont été obtenues dans un premier temps par l'utilisation des techniques de génie microbiologique et plus récemment par les techniques du génie génétique.

1.5.1. Génie microbiologique

Afin d'améliorer les performances des souches industrielles de corynébactéries découvertes par Kinoshita *et al.* en 1957, et de diversifier les produits obtenus, des travaux de mutagenèse et de sélection de mutants ont été entrepris. Ainsi dès 1958 un mutant capable de surproduire la L-lysine a été obtenu par Kinoshita *et al.* Ces améliorations résultent d'une déviation du métabolisme normal de *C. glutamicum*, conséquence de mutations obtenues par l'action d'agents mutagènes (Kinoshita, 1988). Les agents mutagènes les plus utilisés sont soit des agents physiques, type rayons X et UV; soit des agents chimiques comme la N-méthyl-N-nitrosoguanidine (NTG) ou l'éthyl-méthane-sulfonate (EMS) (Pons *et al.*, 1993). Des mutants surproducteurs de glutamine, obtenus après traitement à la NTG de la souche *B. flavum* ATCC 14067 ont été décrit par Tsuchida *et al.* (1987).

La sélection successive de mutants de résistance aux analogues et aussi de mutants d'auxotrophie a été assez performante. Ainsi, parmi les mutant auxotrophes on peut citer les souches de *C. glutamicum* auxotrophes pour la citruline ou l'arginine qui produisent de l'ornithine, ou alors les souches auxotrophes pour la thréonine ou l'homosérine qui

surproduisent la lysine (Kinoshita, 1988). Parmi les mutants de résistance aux analogues, on peut citer les mutants résistants à la S-(-2-aminoéthyl)-D,L- cystéine surproducteurs de lysine (Shiio, 1982).

Les méthodes classiques d'amélioration des souches, basées sur la sélection de mutants surproducteurs, présentent des limitations. D'une part, les mutations obtenues ne sont pas toujours clairement ciblées. Même après sélection du mutant d'intérêt, il n'est pas aisé de connaître la nature exacte de la mutation obtenue. Il est donc peu probable de reproduire à l'identique une telle mutation dans une nouvelle souche lorsque l'on travaille sur des espèces pour lesquelles les méthodes classiques d'échange génétique (transformation, conjugaison, transduction, transposition) ne sont pas disponibles ou maîtrisées. D'autre part, les méthodes de mutagenèse classique conduisent, le plus souvent, à l'obtention de souches présentant des mutations multiples. Si, après une mutagenèse unique, ces mutations collatérales sont le plus souvent silencieuses, elles peuvent, par effet d'accumulation, conduire à des phénotypes non désirables au niveau industriel.

I.5.2. Génie génétique

Etant donnée l'importance des corynébactéries au niveau industriel, de nombreux travaux mettant en oeuvre des techniques de biologie moléculaire ont été entrepris dans les dix dernières années sur les bactéries corynéformes. Ceci est lié essentiellement au développement considérable des outils moléculaires (vecteurs réplicatifs, intégratifs, transposons, etc.) permettant ainsi la manipulation génétique de ces souches (Reyes *et al.*, 1991; Schwartzer et Pühler, 1991; Vertès *et al.*, 1993). Les industriels ont vu dans le développement des outils génétiques, non seulement un moyen pour améliorer les performances des souches dont ils disposent, mais aussi la possibilité d'utiliser ces micro-organismes pour produire de nouveaux métabolites.

Les techniques fastidieuses de préparation de protoplastes et de transformation en présence d'ADN et de polyéthylène glycol (Katsumata *et al.*, 1984) ont permis l'obtention des premiers transformants. La mise au point des techniques d'électro-transformation des corynébactéries par Bonamy *et al.* (1990) a permis des avancées considérables dans le domaine de

la génétique reverse. Cependant, les transformations intégratives étaient limitées par la présence de barrières de restriction très efficaces dans les souches industrielles. Une approche consistant à réaliser l'électrotransformation dans des mutants déficients dans la restriction (Bonnassie *et al.*, 1990) a facilité les transferts de gènes à partir de *E. coli*. Depuis, la connaissance d'une partie des barrières de restriction, liées dans certaines souches à la reconnaissance des bases méthylées dans l'ADN, a permis d'améliorer les fréquences de transfert intégratif (Vertes *et al.*, 1993).

A l'heure actuelle, plusieurs gènes de corynébactéries ont été clonés, séquencés, leurs promoteurs ont été analysés (Jetten et Sinskey, 1995) et des études sur l'usage des codons au sein des phases ouvertes de lecture ont été réalisées (Malumbres *et al.*, 1993). L'accumulation de ces connaissances a d'ores et déjà permis d'améliorer certains procédés biotechnologiques de production d'acides aminés comme le tryptophane, par exemple (Matsui *et al.*, 1988, Katsumata et Ikeda, 1993), et permet d'envisager d'autres progrès. Cependant, selon Krämer (1996), les approches classiques d'obtention de nouvelles souches d'intérêt industriel sont très souvent aussi performantes que les approches modernes de « design » métabolique. Toutefois, le développement de nouvelles stratégies liées au génie génétique ainsi que l'accumulation de connaissances sur le métabolisme bactérien semblent être le début d'un changement de direction vers un « design » métabolique planifié, qui implique le redirectionnement et la reconstruction des voies métaboliques majeures sur la base d'une connaissance suffisamment détaillée du métabolisme et de la régulation de ses voies (Evans *et al.*, 1987, Krämer, 1996).

II. Métabolisme des oses chez les corynébactéries

Il est arbitraire de vouloir diviser le métabolisme cellulaire, alors que celui-ci forme un ensemble de réactions harmonieusement intégrées, les divisions ne sont faites que pour faciliter l'exposé. Ainsi, cette partie est consacrée à l'étude du métabolisme des oses par les corynébactéries, en particulier l'utilisation du glucose chez *Corynebacterium melassecola*. Les

oses doivent leur importance au fait que leur oxydation fournit aux organismes vivants une grande partie de l'énergie qui leur est nécessaire. En outre, les atomes de carbone du glucose sont la base des composés générés dans les voies de biosynthèse.

Depuis quelques années, de nouvelles approches, basées principalement sur l'analyse des concentrations intracellulaires en métabolites, des activités enzymatiques, des flux au sein des voies du métabolisme central des souches du genre *Corynebacterium* (Figure 2), et sur l'établissement de modèles mathématiques, ont permis d'établir un modèle global de répartition des flux de carbone. Ceci a permis de mettre en évidence quelques particularités du métabolisme de ces bactéries. Ainsi l'existence d'un flux carboné élevé dans la voie des pentoses phosphates (Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995; Rollin *et al.*, 1995), la présence de voies anaplérotiques multiples (Cocaign, 1992; Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995; Dominguez *et al.*, 1998; Peters-Wendisch *et al.*, 1997), ainsi que la capacité de ces bactéries à utiliser simultanément plusieurs sources de carbone, en particulier glucose et fructose, sans phénomène de diauxie (Cocaign, 1992; Dominguez, 1994; Dominguez *et al.*, 1998), ont été montrées chez *C. melassecola* ATCC 17965.

II.1. Entrée des sucres dans la cellule

Dominguez (1994) explique le co-métabolisme du glucose et du fructose par la présence, chez *C. melassecola*, de deux systèmes de phosphotransférase constitutifs, le PTS-mannose (qui permet l'entrée du mannose, du glucose, du 2-désoxyglucose et du fructose) et le PTS-fructose (spécifique du fructose, qui permet également l'entrée du xylitol). Ce même auteur a mis en évidence la présence d'un troisième système PTS, le PTS-saccharose (spécifique du saccharose), mais aussi d'une permease à glucose de faible affinité, qui assure de 6 à 19% du transport du glucose.

II.2. Glycolyse et voie des pentoses phosphates

Dès 1959, Shiiro *et al.* ont détecté la présence des enzymes principales de la glycolyse (Hembden-Meyerhof-Parnas ou EMP) chez *B. flavum*. Depuis, cette équipe a

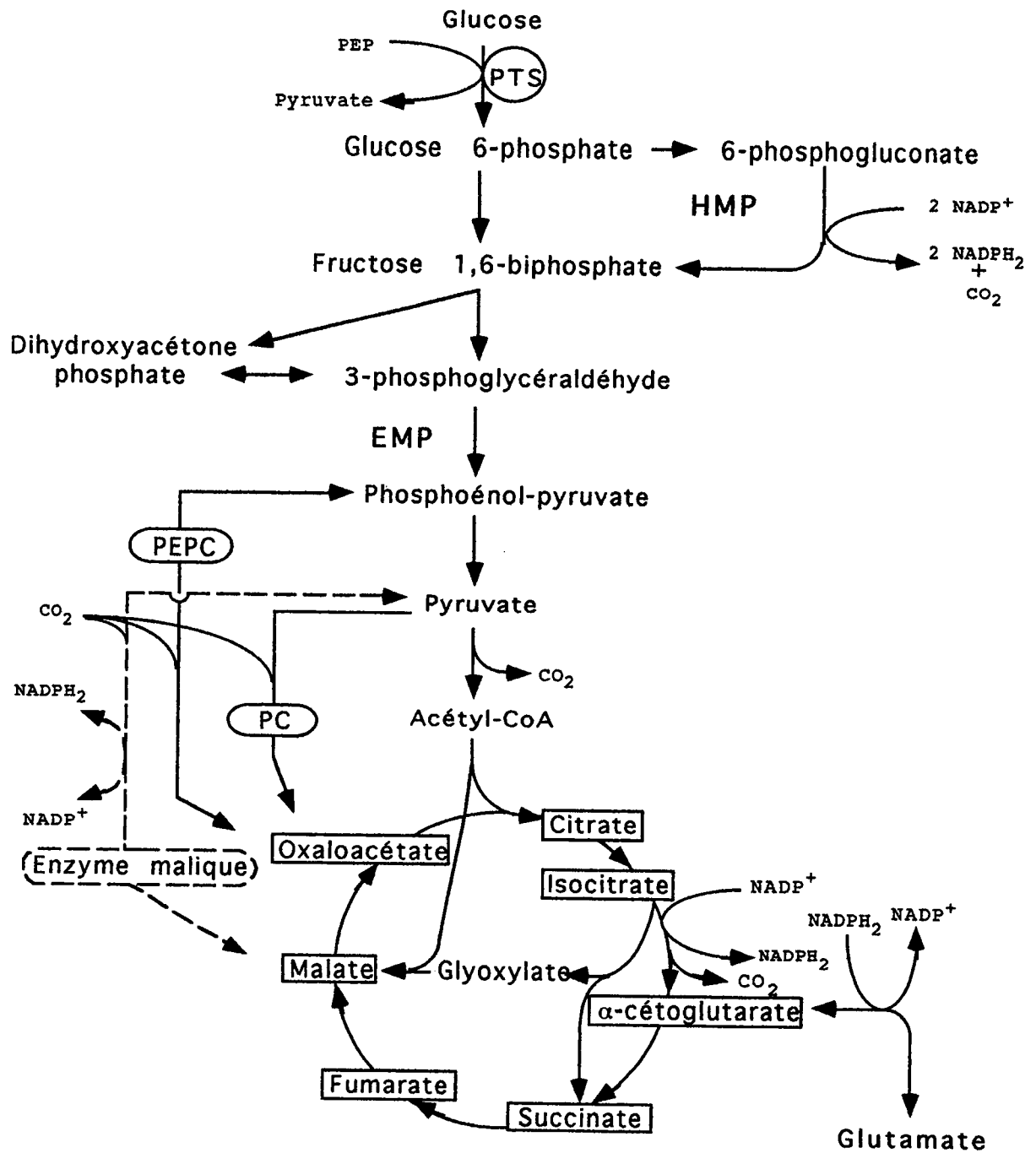


Figure 2. **Schéma simplifié du métabolisme central des corynébactéries**
(D'après Rollin *et al.*, 1995; Jetten et Sinskey, 1995).

EMP: Voie Embden-Meyerhof-Parnas; HMP: Voie des hexoses monophosphates;
PEP: Phosphoénolpyruvate

PTS: Système phosphotransférase

Enzymes anaplerotiques: PEPC - Phosphoénolpyruvate décarboxylase;
PC - Pyruvate carboxylase; Enzyme malique.

réalisé de nombreux travaux sur l'expression et la régulation de ces enzymes, ainsi que sur d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme intermédiaire (Shiio *et al.*, 1960; 1977; 1978; 1979; 1980; Mori et Shiio 1987; Sugimoto et Shiio, 1989). Plus récemment, plusieurs gènes codant différentes enzymes de la glycolyse ont été isolés de *C. glutamicum* et étudiés (von der Osten *et al.*, 1989a; Eikmanns, 1992). Enfin, chez *C. melassecola*, la glycolyse, mise en évidence par des techniques de ^{13}C RMN, apparaît comme la voie majoritaire dans la synthèse du pyruvate, avec une contribution à la synthèse de ce métabolite estimée à 55% en phase exponentielle de croissance sur glucose (Rollin *et al.*, 1995).

La deuxième voie importante dans le métabolisme du glucose chez les bactéries corynéformes est la voie des pentoses phosphates (HMP). Plusieurs gènes codant des enzymes constitutives de cette voie sont en cours d'étude au niveau moléculaire dans l'équipe du Professeur Dunican à Galway (K. Burke, communication personnelle). Chez *C. melassecola*, en phase exponentielle de croissance, la contribution de la voie HMP à la synthèse du pyruvate a été estimée à 45% (Rollin *et al.*, 1995). Chez *C. glutamicum* la distribution des flux de carbone entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates a été estimée, en phase exponentielle de croissance sur glucose, à 59% et 40% respectivement (Sonntag *et al.*, 1995; Krämer, 1996). Il est intéressant de noter que ce rapport entre les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates est variable en fonction de différents paramètres, tels la phase de croissance, le type de métabolite produit, la souche ou encore la source de carbone utilisée. Ainsi, Vallino et Stephanopoulos (1990) estiment que, chez *C. glutamicum*, en phase exponentielle de croissance, le flux de carbone passant par la voie des pentoses est de 54%, tandis qu'en phase stationnaire, la contribution de la voie des pentoses phosphates est diminuée à 35% (Pequignot, 1995). De même, une variation dans la distribution des flux entre les deux voies a été constatée par Sonntag *et al.* (1995), en fonction de l'acide aminé produit. Ces auteurs estiment que pendant la phase de production de lysine par *C. glutamicum* (MH 20-22 B) sur glucose, le flux de carbone passant par la voie des pentoses phosphates est plus élevé (47%), que lorsque l'acide aminé produit est le glutamate (17%). Ishino *et al.* (1991), signalent ce même phénomène pour une autre souche (KY9908) de *C. glutamicum*, avec une variation encore plus importante lorsque l'acide aminé produit est la lysine (60-70% du flux de carbone passant par la

voie des pentoses phosphates). D'autre part, lorsque la source de carbone utilisée est le fructose, une modification dans la distribution des flux est observée et la glycolyse est la voie nettement majoritaire (80%) empruntée dans le métabolisme de ce sucre (Dominguez *et al.*, 1998).

L'augmentation du flux à travers la glycolyse, observée lors des croissances sur fructose, est associée à une augmentation du rapport $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$, susceptible d'inhiber à la fois la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase, avec en conséquence l'augmentation des métabolites dérivés des substrats de ces deux enzymes (Dominguez *et al.*, 1998). Le taux de croissance sur fructose est significativement plus faible que sur glucose, ce qui conduit à l'augmentation des concentrations en dihydroxyacétone et en lactate (Dominguez *et al.*, 1998). Dominguez *et al.* (1998) signalent encore que la production de biomasse, observée expérimentalement, est plus importante que celle estimée à partir de la quantité de NADPH_2 produite par la voie des pentoses et par l'isocitrate déshydrogénase. Les auteurs suggèrent alors la présence d'une réaction additionnelle impliquant la production de NADPH_2 et avancent l'hypothèse d'un flux de carbone modifié dans le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) impliquant l'enzyme anapérotrique pyruvate carboxylase, et l'enzyme malique dont l'expression est nettement augmentée pendant la croissance sur fructose par rapport à la croissance sur glucose. En outre, Ishino *et al.* (1991), suggèrent que la plus grande contribution de la voie HMP lors de la production de lysine est liée au fait que la formation de lysine présente une exigence en NADPH_2 plus importante que la formation d'acide glutamique à partir du glucose. Ces auteurs soulignent que 5 enzymes directement ou indirectement impliquées dans la biosynthèse de la lysine sont NADPH_2 dépendantes chez les corynébactéries. Enfin, en conditions normales de culture (sans surproduction de métabolites), la diminution constatée du flux de carbone passant par la voie HMP en phase stationnaire (Pequignot, 1995) correspondrait à la baisse des exigences en cofacteurs réduits pour l'anabolisme. Une explication possible de l'ensemble des données précédentes repose, d'après différents auteurs (Vallino et Stephanopoulos, 1993; Rollin *et al.*, 1995; Dominguez *et al.*, 1998), sur la prééminence de la voie des pentoses phosphates dans la production du cofacteur réducteur NADPH_2 utilisé dans l'anabolisme chez *C. glutamicum*. La voie des pentoses

phosphates comprend en effet deux des déshydrogénases NADP-dépendantes (glucose 6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase) les plus importantes pour la régénération de NADPH₂ pendant la croissance sur glucose. La seule autre déshydrogénase NADP-dépendante permettant la régénération de NADPH₂ serait alors l'isocitrate déshydrogénase, impliquée dans le cycle de Krebs, aucune activité de type NADH₂/NADP⁺ transhydrogénase n'étant détectable chez les corynébactéries étudiées.

Cependant, selon des résultats récents, des incertitudes semblent exister sur les besoins réels en NADPH₂ dans les différentes voies de biosynthèse. Les différents moyens mis en oeuvre par la cellule bactérienne pour subvenir à ses besoins, dans différentes conditions de croissance et de production de métabolites, sont ainsi motif à controverses. Dans une étude ayant pour but la détermination des exigences en NADPH₂ lors de la croissance et de la phase de production de lysine, et la détermination des quantités de NADPH₂ produites dans ces conditions, Marx *et al.* (1995) trouvent un excès significatif de NADPH₂. De même, Park *et al.* (1997) ont mis en évidence un excès de NADPH₂ lors de cultures sur glucose de souches mutantes de *C. glutamicum* déficientes en pyruvate kinase. Selon ces auteurs, cet excès de NADPH₂ a été provoqué par une forte augmentation des flux par la voie des pentoses phosphates. Dans ces conditions, ces auteurs signalent également la présence d'une activité transhydrogénase capable de catalyser la réaction $\text{NADPH}_2 + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{NADP}^+ + \text{NADH}_2$, pour compenser l'augmentation des réserves en NADPH₂. Cette activité était considéré jusqu'à présent comme absente dans ce micro-organisme. Les auteurs admettent cependant qu'elle peut-être dispensable dans certaines conditions de croissance.

II.3. Les voies anaplérotiques

La phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) a été considérée pendant longtemps comme l'enzyme anaplérotique majoritaire chez les bactéries corynéformes cultivées sur glucose (Mori et Shio, 1987; Vallino et Stephanopoulos, 1993). Ceci a justifié la réalisation de nombreux travaux concernant l'étude de la régulation de l'expression du gène *ppc* (Jetten *et al.*, 1994), de ses caractéristiques moléculaires (O'Reagan *et al.*, 1989; Eikmanns *et al.*, 1989), de

la régulation de l'enzyme PEPC (Shiio et Ujigawa-Takeda, 1979) et de l'impact de la surexpression de ce gène sur la production d'acides aminés (Sano *et al.*, 1987). L'étude moléculaire approfondie du gène *ppc* de *C. glutamicum* (Eikmanns, 1992; Schwinde *et al.*, 1993) a permis de mettre en évidence un couplage possible entre la régulation de la glycolyse et celle des voies anaplérotiques puisque le gène *ppc* fait partie d'un opéron complexe rassemblant également les gènes *gap* (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), *pgk* (3-phosphoglycérate kinase) et *tpi* (triose phosphate isomérase). L'importance supposée de la PEPC dans le métabolisme central et la biosynthèse des acides aminés d'importance industrielle a été totalement remise en cause par les travaux de Gubler *et al.* (1994) et de Peters-Wendisch *et al.* (1993). Ces auteurs montrent clairement que ni les caractéristiques de croissance, ni la capacité de production en lysine de souches de *C. glutamicum* déficientes en PEPC, n'étaient modifiées. Ils ont alors suggéré l'existence d'autres enzymes anaplérotiques pouvant efficacement suppléer la PEPC en conditions de croissance sur glucose. Quasi simultanément, Cocaign-Bousquet et Lindley (1995) et Cocaign-Bousquet *et al.* (1996) ont montré que l'activité de cette enzyme, et donc l'importance du gène *ppc*, avait été probablement surestimée dans les études préliminaires en raison d'une forte activité NADH oxydase présente dans les extraits des souches du genre *Corynebacterium*. Selon ces auteurs, cette activité, qui interfère dans les dosages de la PEPC, n'aurait pas été prise en compte. L'existence d'une deuxième enzyme anaplérotique, la pyruvate carboxylase (PC), chez *C. glutamicum* a été démontrée par Peters-Wendisch *et al.* (1997) et le gène codant cette enzyme a été cloné et caractérisé (Peters-Wendisch *et al.*, 1998). La présence d'une troisième enzyme, l'enzyme malique NADP-dépendante, susceptible de participer aux voies anaplérotiques chez *C. glutamicum* a été démontrée par Cocaign-Bousquet *et al.*, (1995). Le gène codant cette enzyme a été cloné et caractérisé dans notre laboratoire (Baucher, communication personnelle). Cependant, le rôle anaplérotique de cette dernière enzyme semble controversé, car les résultats obtenus par Peters-Wendisch *et al.* (1998) semblent indiquer qu'il n'y aurait pas d'autres enzymes que la PEPC et la PC supportant le flux anaplérotique chez *C. glutamicum* en conditions de croissance sur glucose. Toutefois, la participation des différentes enzymes anaplérotiques présentes chez *C. melassecola* semble varier en fonction des taux de croissance. Les travaux de Cocaign (1992) et Cocaign-Bousquet

et al. (1996) ont montré que la phosphoénolpyruvate carboxylase n'est majoritaire qu'à très faible taux de croissance, tandis que l'enzyme malique est particulièrement active à des taux de croissance supérieurs, alors que la pyruvate carboxylase apparaît comme la plus active pour les taux de croissance les plus élevés.

Pour des raisons historiques qui seront développées ultérieurement, le rôle anaplérotique du shunt glyoxylique n'est ici pas traité.

II.4. Décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique

De manière surprenante, si un grand nombre d'études ont porté sur les voies anaplérotiques chez les bactéries corynéformes, les données sur la décarboxylation oxydative du pyruvate, *via* le complexe multienzymatique pyruvate déshydrogénase (PDH), sont rares. Pourtant, cette réaction est une réaction clef du métabolisme central puisqu'elle permet d'une part la formation d'un groupement acétyle activé indispensable à la métabolisation par le cycle de Krebs de l'oxaloacétate formé par les voies anaplérotiques (Figure 2 et 3), d'autre part la formation de cofacteurs réduits qui sont pris en charge par la chaîne respiratoire, conduisant ainsi à la synthèse d'ATP. Enfin, cette réaction de décarboxylation semble quantitativement importante dans le devenir métabolique du pyruvate chez *C. melassecola*. Rollin *et al.* (1995) ont en effet montré que, lors de la croissance exponentielle de *C. melassecola* sur glucose, 62% du pyruvate emprunte cette voie de décarboxylation, les 38% restants s'engageant dans les voies anaplérotiques.

Chez *B. flavum*, la présence de la pyruvate déshydrogénase a été démontrée par Ozaki et Shiiro (1983). Lors de la croissance d'un mutant de *B. flavum* déficient en citrate synthase, une augmentation de l'activité pyruvate déshydrogénase a été corrélée à une accumulation de pyruvate dans le surnageant de culture (Shiiro et Ujigawa, 1978). Selon Shiiro et Ujigawa (1978) ces résultats permettent de suggérer l'induction par le pyruvate de l'expression des gènes codant les enzymes du complexe PDH. Cependant, selon Cocaign (1992), ceci ne constitue pas une démonstration réelle d'induction, car le pyruvate est métabolisé par *B. flavum* lors de sa croissance. Selon cet auteur, chez de nombreux micro-organismes, le métabolisme du pyruvate

induit un niveau de PDH bien supérieur à celui observé sur glucose. D'autre part, chez *C. melassecola*, en culture avec le lactate comme source de carbone, l'activité spécifique de la pyruvate déshydrogénase augmente rapidement en fonction du taux de croissance, puis reste constante avant de présenter une faible diminution à haut taux de croissance (Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995). Selon les auteurs, ce profil enzymatique et la surproduction de pyruvate observée, indiquent une saturation de la capacité catalytique potentielle de la pyruvate déshydrogénase à haut taux de croissance. Selon Cocaign-Bousquet et Lindley (1995), une corrélation est également observée entre le flux impliquant cette enzyme et la concentration en enzyme. L'accumulation de pyruvate extracellulaire, observée par ces auteurs, correspondrait au fait que l'enzyme est toujours en conditions de saturation par le substrat. Ceci suggère que ce complexe enzymatique, dans les conditions de culture employées, n'est pas soumis à des mécanismes de régulation capables de moduler son activité.

Cocaign (1992), analysant les paramètres de croissance dans différentes conditions de cométabolisme, a tenté de localiser les principales étapes limitantes du métabolisme chez *C. melassecola*. Cet auteur a ainsi suggéré la présence d'un noeud rigide autour du pyruvate et considère que la pyruvate déshydrogénase joue un rôle régulateur de la souplesse ou de la rigidité du métabolisme, selon que son expression est ou n'est pas limitante.

Si elles ne sont pas connues chez les bactéries corynéformes, la composition protéique, l'organisation tridimensionnelle du complexe pyruvate déshydrogénase, la mécanistique de la réaction enzymatique, le sont chez d'autres organismes (Yeman, 1989; Mattevi *et al.*, 1992). La pyruvate déshydrogénase est, de manière générale, un système multi-enzymatique à 3 entités: une décarboxylase (E1) à laquelle sont liés le pyrophosphate et la thiamine, une déshydrogénase aldéhydique (E2) à laquelle est lié l'acide lipoïque, et une (dihydro)lipoamide déshydrogénase (E3) qui est une enzyme à FAD permettant la réoxydation de l'acide dihydrolipoïque en acide lipoïque. Cinq coenzymes sont nécessaires à ce processus de décarboxylation : le TPP, l'acide lipoïque, le coenzyme A, le FAD et le NAD.

Dans tous les organismes étudiés la structure centrale du complexe pyruvate déshydrogénase est composée par plusieurs sous-unités de dihydrolipoamide acyltransférase (déshydrogénase aldéhydique E2). Suivant l'organisme étudié, l'architecture centrale de la

pyruvate déshydrogénase diffère (Mattevi *et al.*, 1992). Chez les bactéries à Gram négatif la partie interne du complexe est composée de 24 sous-unités de l'enzyme E2, arrangées suivant une symétrie octaédrique, tandis que chez les Mammifères et les bactéries à Gram positif, le centre du complexe contient 60 copies de l'enzyme E2 associées en forme d'icosaèdre (Mattevi *et al.*, 1992). Contrairement à E2, E1 et E3 sont des enzymes relativement simples. Dans le complexe pyruvate déshydrogénase, la déshydrogénase proprement dite (E1), est spécifique de la réaction mettant en jeu le pyruvate, et comporte 2 sous-unités d'environ 90.000 Da (Mattevi *et al.*, 1992). La lipoamide déshydrogénase (E3) est en général constituée de deux polypeptides de masse moléculaire apparente d'environ 55 000 Da. C'est une flavoprotéine à FAD, contenant des ponts disulfure qui subissent une oxydo-réduction pendant la catalyse (Sierra *et al.*, 1997).

Il faut noter à ce stade que les enzymes E2 (dihydrolipoamide acyltransférase) et E3 (lipoamide déshydrogénase) présentent la particularité d'être partagées chez les micro-organismes étudiés jusqu'à présent (Smith et Neidhardt, 1983), par au moins deux complexes enzymatiques de grande importance dans les voies métaboliques centrales, la pyruvate déshydrogénase, dont nous venons de parler, et l' α -cétoglutarate déshydrogénase, impliquée spécifiquement dans la décarboxylation oxydative de l' α -cétoglutarate au sein du cycle de Krebs (Yeaman, 1989).

II.5. Cycle de Krebs et voie du glyoxylate

Le cycle de Krebs possède habituellement une double fonction métabolique, d'une part il assure la fourniture d'une partie de l'énergie nécessaire aux réactions anaboliques, d'autre part il constitue le point de départ de la synthèse de nombreux métabolites, en particulier le glutamate et la lysine. Chez *E. coli* (Kornberg, 1966a) comme chez d'autres bactéries étudiées jusqu'alors, le shunt glyoxylique est considéré comme la voie anaplérotique indispensable à la croissance lorsque la source de carbone est l'acétate.

Les premières études menées sur le cycle de Krebs chez les bactéries coryneformes par Shio *et al.* (1960), semblaient indiquer que celui-ci différait du modèle établi chez d'autres micro-organismes. Shio *et al.* (1960) considéraient en effet que l' α -cétoglutarate

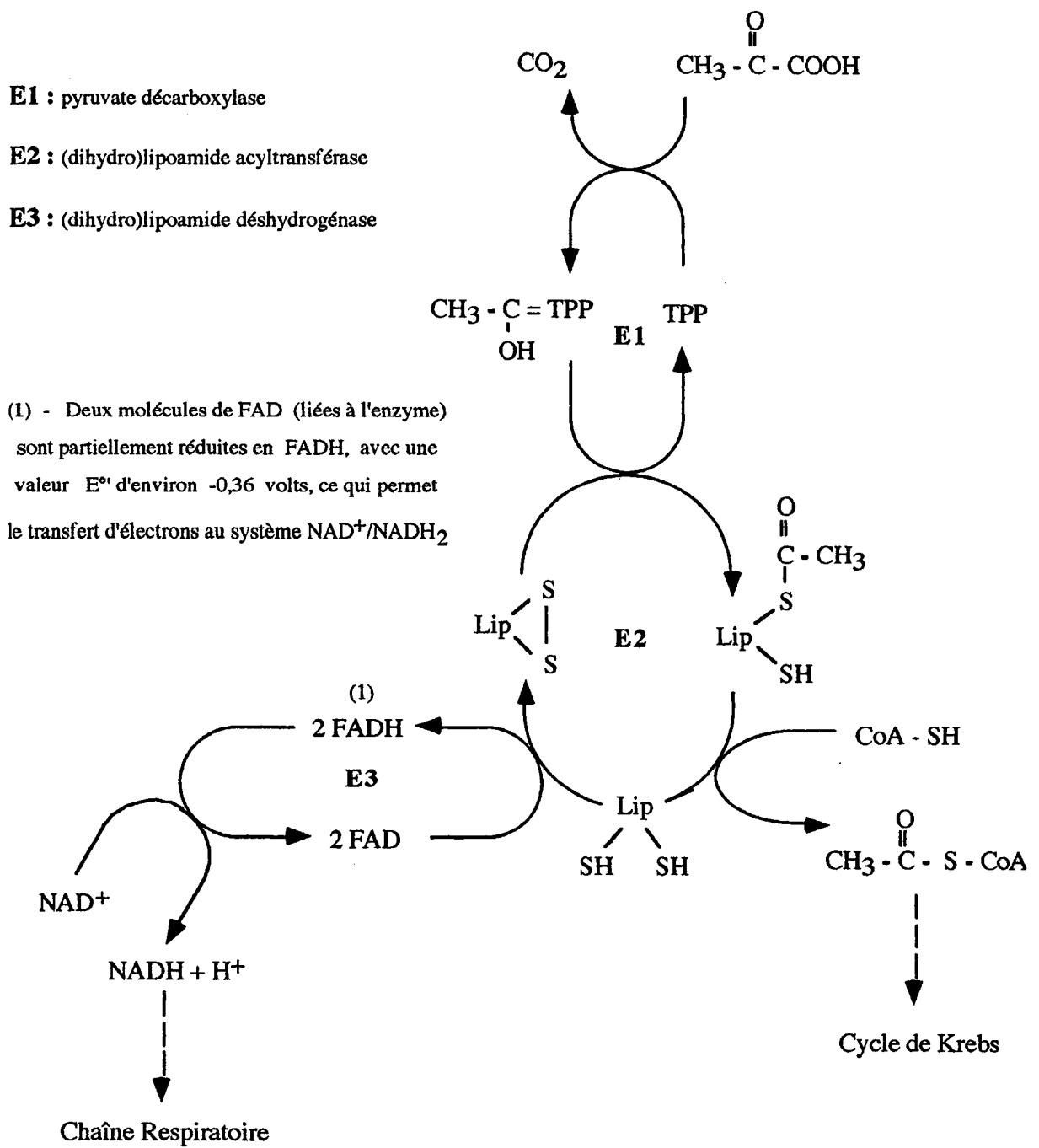


Figure 3. Schéma de la séquence réactionnelle conduisant à la décarboxylation du pyruvate en Acétyl-CoA

déshydrogénase était absente chez *B. flavum*. Ces auteurs suggéraient alors que cette absence d' α -cétoglutarate déshydrogénase expliquait la forte capacité de production de glutamate par cette bactérie. Ils envisageaient l'existence d'un cycle de Krebs modifié, mettant en jeu le shunt glyoxylique, même lors de la croissance sur glucose.

Cette théorie sur la présence d'un cycle de Krebs modifié chez les bactéries corynéformes a été depuis largement remise en question. En effet, l' α -cétoglutarate déshydrogénase a été détectée chez *B. flavum* par Shiiro lui-même (Shiiro *et al.*, 1980). D'autre part, le gène (*odhA*) de *B. lactofermentum*, codant semble-t-il une protéine bifonctionnelle ayant à la fois les activités α -cétoglutarate déshydrogénase (E1) et dihydrolipoamide acyltransférase (E2), a été cloné et analysé par Usuda *et al.* (1996). En outre, des études en ^{13}C RMN ont clairement montré que le cycle de Krebs est bien fonctionnel chez *C. melassecola* (Rollin *et al.*, 1995), et que le shunt glyoxylique est inopérant lors de la croissance de cette souche sur glucose.

A l'heure actuelle, la présence de toutes les enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, ainsi que celles impliquées dans le shunt glyoxylique, voies à présent considérées conformes à leurs descriptions initiales chez *E. coli*, a été démontrée chez les bactéries corynéformes. Certainement pour des raisons liées à des problématiques d'ordre industriel, seules quelques enzymes de ces deux voies ont été étudiées de manière approfondie. Il s'agit essentiellement de la citrate synthase, de l'isocitrate déshydrogénase, de l'isocitrate lyase et de la malate synthase.

La citrate synthase, qui catalyse le transfert du groupement acétyle de l'acétyl-coenzyme A à l'acide oxalo-acétique pour donner l'acide citrique avec libération du coenzyme A, semble ne jouer qu'un rôle modéré dans la régulation du cycle de Krebs chez *C. glutamicum* et *B. flavum* lors de la croissance sur glucose. Cette enzyme, n'est en effet inhibée que faiblement par l'ATP, le cisaconitate, l'isocitrate et le glutamate, et insensible au NADH_2 et à l'oxaloacétate (Shiiro *et al.*, 1977; Shiiro et Ujigawa, 1978; Eikmanns *et al.*, 1994). Le gène *glt A* correspondant a été cloné et analysé au niveau moléculaire (Eikmanns *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 1991), sa surexpression n'entraînant pas de modification notable de la capacité de production en acides aminés.

L'isocitrate déshydrogénase, dont le coenzyme d'oxydoréduction est le NADP⁺, tant chez *B. flavum* (Shiio et Osaki, 1968) que chez *C. glutamicum* (Jetten et Sinskey, 1995), catalyse la décarboxylation oxydative de l'acide isocitrique en acide α -cétooglutarique. De par sa position métabolique dans le cycle de Krebs et la voie de biosynthèse du glutamate depuis le glucose, et l'importance donnée chez les corynébactéries au problème de la régénération du cofacteur NADPH₂, cette enzyme et le gène qui lui correspond ont été très attentivement étudiés (Eikmanns *et al.*, 1995). Les études de Eikmanns *et al.* (1995) ont montré que le gène *icd* était transcrit de manière constitutive, quelle que soit la nature de la source de carbone utilisée pour la croissance de *C. glutamicum*. La surexpression du gène *icd* n'entraîne pas de modification dans la capacité de *C. glutamicum* à synthétiser le glutamate. L'enzyme quant à lui est relativement insensible à l'oxaloacétate, à l' α -cétooglutarate et au citrate, mais est fortement inhibé par la présence simultanée d'oxaloacétate et de glyoxylate (Eikmanns *et al.*, 1995).

Chez les micro-organismes étudiés jusqu'à présent, l'isocitrate déshydrogénase joue un rôle dans la répartition des flux entre le cycle de Krebs et la voie du glyoxylate par compétition avec l'isocitrate lyase pour leur substrat commun, l'isocitrate (Kornberg, 1966a, 1966b). Lors de la croissance de *E. coli* sur glucose, le shunt glyoxylique est inactif, l'isocitrate s'engageant ainsi exclusivement dans le cycle de Krebs *via* l'isocitrate déshydrogénase. Lors de la croissance de *E. coli* sur acétate, il a été montré que l'isocitrate déshydrogénase était inactivée par phosphorylation réversible d'un résidu sérine (Garnak et Reeves, 1979a, 1979b) et que les gènes codant les enzymes du shunt glyoxylique étaient simultanément induits, ces deux événements permettant la réorientation du flux de carbone vers le shunt glyoxylique.

Chez *C. glutamicum*, la situation diffère de celle décrite chez *E. coli* quant à la répartition des flux lors de la croissance sur acétate. En effet, si l'on constate bien une forte induction de l'expression des gènes codant l'isocitrate lyase et la malate synthase par un facteur variant de 45 à 100 fois (Peters-Wendisch *et al.*, 1997; Reinscheid *et al.*, 1994), aucune inactivation de l'isocitrate déshydrogénase n'est constatée (Eikmanns *et al.*, 1995). Il faut noter que l'analyse de la séquence en acides aminés de l'isocitrate déshydrogénase de *C. glutamicum* révèle l'absence du résidu sérine phosphorylable chez *E. coli*, dans une zone pourtant très conservée

entre les deux séquences (Eikmanns *et al.*, 1995). D'autre part, l'affinité de l'isocitrate déshydrogénase pour l'isocitrate est plus élevée que celle de l'isocitrate lyase pour le même substrat (Reinscheid *et al.*, 1994). On peut supposer que le maintien d'un flux passant par l'isocitrate déshydrogénase lors de la croissance sur acétate correspond à la nécessité pour *C. glutamicum* de subvenir à ses besoins en NADPH₂ dans ces conditions, l'isocitrate déshydrogénase pouvant être alors le site majeur de synthèse de ce cofacteur essentiel.

Encore que la plupart des enzymes du cycle de Krebs soient cytosolubles chez *E. coli*, il existe des exceptions qui semblent transposables aux enzymes des corynébactéries en raison des fortes similitudes observées entre les enzymes homologues étudiées chez *E. coli* et chez *C. glutamicum*. Ainsi, la succinate déshydrogénase, sur laquelle nous nous pencherons dans la partie suivante dédiée à la chaîne respiratoire, pourrait être membranaire. Une étude récente indique qu'en plus de la malate déshydrogénase cytoplasmique, une malate-quinone oxydoréductase, associée à la membrane, catalysant l'oxydation du L-malate en oxaloacétate avec un transfert d'électrons directement sur la ménaquinone, existe chez *C. glutamicum* (Molenaar *et al.*, 1998). Chez d'autres organismes que *C. glutamicum*, des interactions entre les enzymes du cycle de Krebs (succinate déshydrogénase, α -cétoglutarate déshydrogénase et malate déshydrogénase) et les enzymes du complexe I de la chaîne respiratoire ont été déjà signalées auparavant (Sumegi et Srere, 1984; Porpaczy *et al.*, 1987). Il se pourrait que ces interactions existent également chez *C. glutamicum*.

II.6. Calcul des flux métaboliques chez *C. melassecola*

Le calcul des flux métaboliques chez *C. melassecola* a été réalisé par les équipes de N. Lindley et A. Guyonvarch (Cocaign, 1992; Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995; Rollin *et al.*, 1995), sur la base de la méthode développée par Holms (1986) pour *E. coli*.

Dans cette méthode, le métabolisme est divisé en plusieurs groupes de réactions conduisant *in fine* à l'obtention des cellules (Figure 4). Les voies du métabolisme central (glycolyse, voie des pentoses, cycle de Krebs) sont ainsi considérées comme un ensemble dont le rôle est de synthétiser les 11 métabolites précurseurs des molécules élémentaires (acides

aminés, sucres, acides gras, nucléotides), fournir l'énergie (ATP) et les cofacteurs d'oxydo-réduction ($\text{NAD}(\text{H}_2)$, $\text{NADP}(\text{H}_2)$) indispensables aux voies de biosynthèse. Les voies de biosynthèse sont regroupées sous la forme de 11 sous ensembles ayant pour origine chacun des 11 métabolites précurseurs. Les polymérisations conduisant à la formation des macromolécules (protéines, ADN, ARN, lipides, etc.) sont considérées comme un ensemble essentiellement consommateur d'énergie (ATP). Les réactions d'assemblage sont considérées dans leur ensemble comme un phénomène spontané.

Le calcul des flux fait appel à des données cinétiques expérimentales, taux de croissance (μ), consommation du glucose (q_{GLUC}), et nécessite la connaissance de toutes les voies métaboliques empruntées chez l'organisme étudié, y compris celles de l'anabolisme. Dans le cas de *C. melassecola*, des données telles que l'absence présumée de transhydrogénase, l'existence d'une voie obligatoire de biosynthèse des acides mycoliques, la demande particulière en cofacteurs d'oxydoréduction (NADH_2 et NADPH_2) de la voie de biosynthèse des acides gras, les particularités des voies de biosynthèse des acides aminés branchés (Shiio *et al.*, 1970) et de la lysine (Schrumpp *et al.*, 1991) ont ainsi été prises en compte. Pour le calcul des besoins en précurseurs pour la synthèse de la biomasse, il est nécessaire de connaître la composition élémentaire d'une cellule, ce qui a été réalisé pour *C. melassecola* (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996). Ces données de base acquises, il est alors possible de calculer les flux au sein des voies métaboliques centrales, en se basant sur le principe de non accumulation. La somme de tous les flux entrant au niveau d'un intermédiaire métabolique doit être alors égale à la somme de tous les flux sortants. Il faut noter que ce principe ne peut s'appliquer que dans des conditions assimilables à celles d'une croissance de type exponentiel. Certains flux sont interdépendants. Ainsi, le flux de carbone de la glycolyse est dépendant de celui de la voie des pentoses. Une partie du flux entre le phosphoenol pyruvate et le pyruvate est fixée par le flux d'entrée du glucose dans les cellules, puisqu'une molécule de phosphoenol pyruvate est consommée à chaque entrée d'une molécule de glucose dans les cellules par le système PTS glucose chez *C. melassecola*. Enfin, le flux anaplérotique est imposé par les sorties vers la biomasse au niveau de l'oxaloacétate et de l' α -cétoglutarate. Le calcul de flux à certains points de branchement

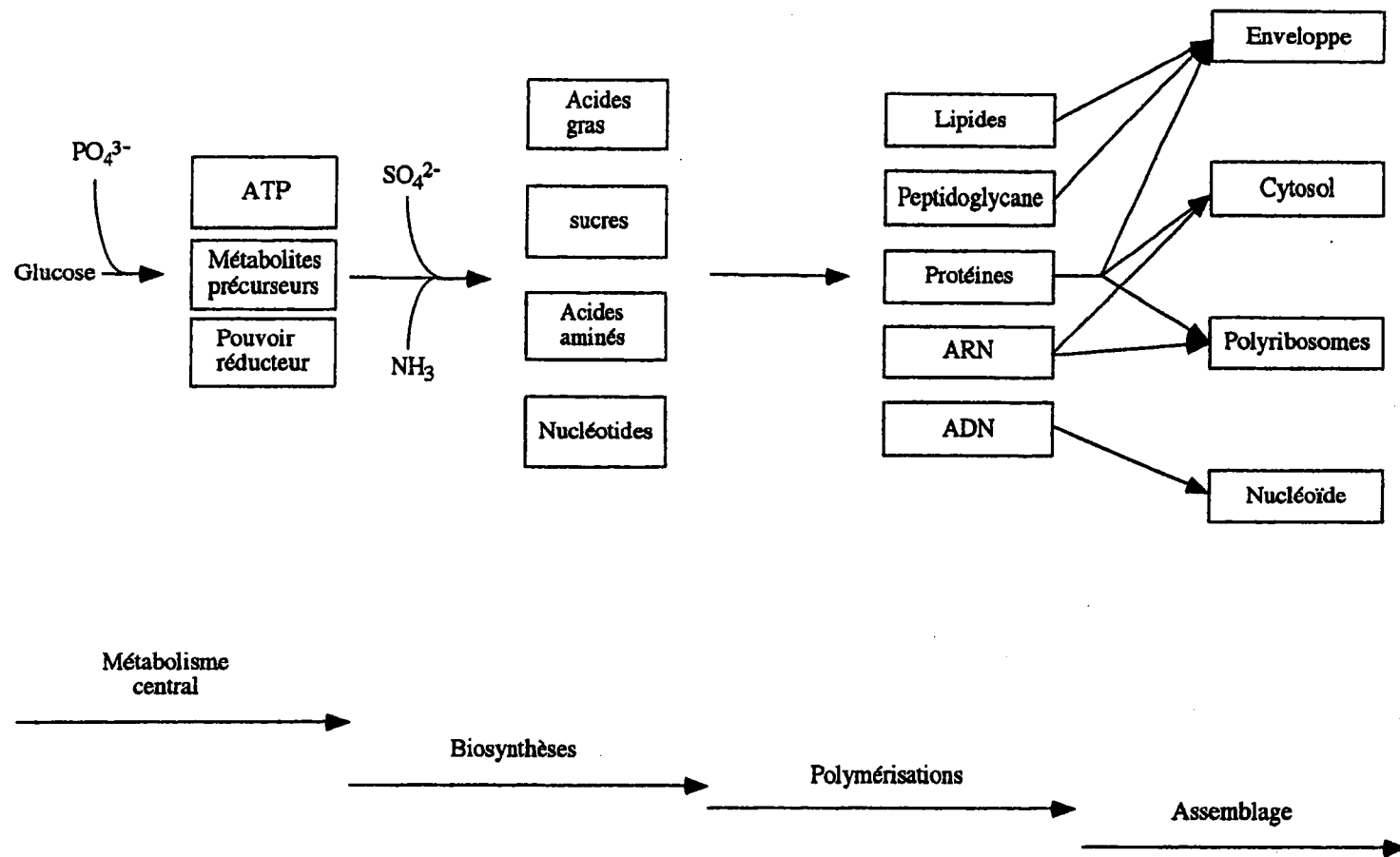


Figure 4. Organisation générale du métabolisme bactérien conduisant à la formation d'une cellule

nécessite soit un choix arbitraire, soit la connaissance de la répartition proportionnelle, accessible par des méthodes de ^{13}C RMN par exemple (Rollin *et al.*, 1995).

Une fois le calcul des flux réalisé, il est possible de comptabiliser le flux total de production des coenzymes NADH_2 , NADPH_2 , FADH_2 , ATP et de comparer ces flux aux valeurs des flux nécessaires à la synthèse cellulaire. On peut également comparer les valeurs calculées de consommation d' O_2 (q_{O_2}) et de production de CO_2 (γ_{CO_2}) avec celles mesurées expérimentalement.

En mettant en oeuvre l'ensemble des méthodes et techniques permettant d'avoir accès aux données de base nécessaires à un tel calcul de flux chez *C. melassecola* (Rollin *et al.*, 1995; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996), un modèle a été établi. Un exemple de distribution des flux au sein des voies métaboliques centrales lors de la croissance exponentielle de *C. melassecola* sur glucose est représenté Figure 5.

Le modèle reflète bien la plupart des observations macroscopiques expérimentales ou déduites des expériences (q_{O_2} , γ_{CO_2} , synthèse de NADPH_2) à l'exception d'un excès apparent de synthèse de NADH_2 .

Ce modèle permet également de mettre en évidence les étapes du métabolisme soumises ou non à un contrôle métabolique (Cocaign, 1992; Guyonvarch, communication personnelle). En effet, il est souvent aisé de mesurer *in vitro* l'activité spécifique d'une enzyme. Dans ces conditions, l'enzyme est supposée travailler dans les conditions optimales de pH, température, force ionique, disponibilité en substrats, cofacteurs, etc.. La détermination du V_{MAX} de l'enzyme reflète alors la capacité maximale de l'enzyme à supporter un flux exprimé en mmoles de substrat / minute / mg de protéines. Connaissant, par l'analyse, la teneur du cytoplasme des cellules de *C. melassecola* en protéines, il est alors possible de traduire ce flux maximal potentiel dans les mêmes unités que celles employées dans le modèle, c'est à dire des mmoles de substrat / heure / g de cellules sèches. Différents cas de figure peuvent alors se présenter. Si le flux maximal pouvant être supporté par l'enzyme *in vitro* est très largement supérieur au flux estimé *in vivo*, l'enzyme est considéré comme non limitante pour le flux au niveau de cette étape métabolique. Le flux réel *in vivo* dépendra alors soit de la disponibilité en substrat ou de tout

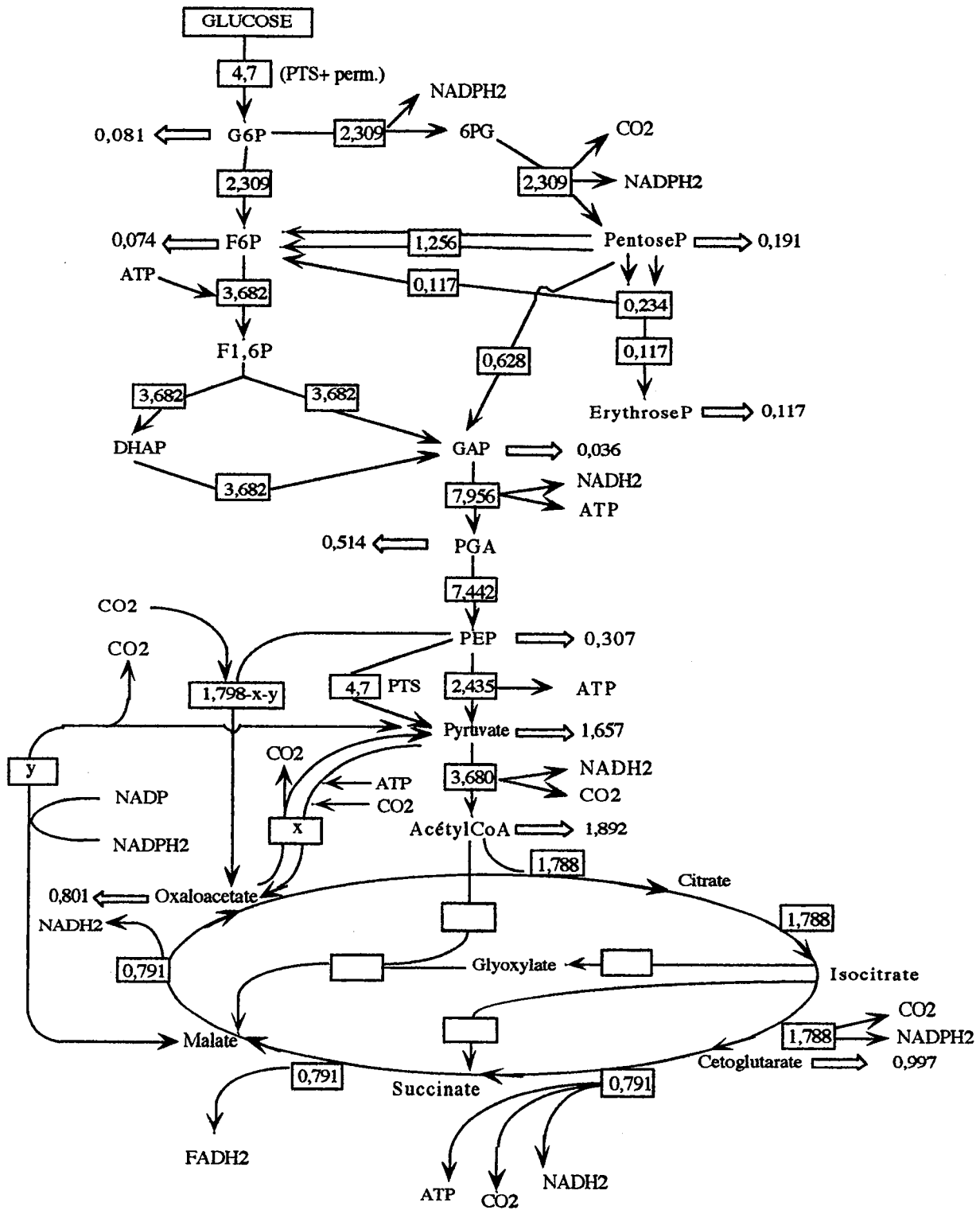


Figure 5. **Distribution des flux au sein des voies métaboliques centrales lors de la croissance expérimentale de *C. melassecola* sur glucose.**

(D'après A. Guyonvarch, 1997)

autre élément de la réaction, soit de la modulation de l'activité de l'enzyme par des inhibiteurs, présents dans la cellule, de la réaction qu'elle catalyse. La citrate synthase chez *C. melassecola* est un exemple caractéristique de cette situation. Le flux maximal supporté par l'enzyme peut être égal ou très proche du flux estimé *in vivo*. Dans ce cas, l'enzyme est considérée comme limitante, et lieu d'un contrôle fin du métabolisme, ce qui semble être le cas pour la pyruvate déshydrogénase. Dans ce cas, la régulation du potentiel de l'enzyme *in vivo* semble dépendre de la régulation de l'expression du gène lui-même, plus que de la régulation de l'activité de l'enzyme. Enfin, la capacité catalytique maximale peut être inférieure à la capacité nécessaire *in vivo*. Dans ce cas, il faut supposer l'existence d'une ou de plusieurs activités enzymatiques, non encore détectées, capables de compléter la capacité de flux de l'enzyme étudiée. Le cas de la phosphoenolpyruvate carboxylase est typique de cette situation, la présence d'au moins une autre enzyme anaplérotique, la pyruvate carboxylase, ayant d'ailleurs été suggérée par cette analyse, puis confirmée par la suite comme nous l'avons vu précédemment.

Il faut noter que la cohérence du modèle, établi pour *C. melassecola*, avec les observations expérimentales dépend de la prise en compte d'un rapport P/O d'une valeur arbitraire de 2 pour la chaîne respiratoire, chaîne respiratoire sur laquelle aucune donnée n'existait au moment de l'établissement du modèle présenté. Avec une telle valeur de P/O, on constate par exemple que le q_{O_2} calculé est de 6,78 mmoles / g / h, le q_{O_2} mesuré étant de 6,8 mmoles / g / h. De même, le γ_{CO_2} calculé est de 6,32 mmoles / g / h, contre 6,5 mmoles / g / h de valeur expérimentale. Ces valeurs peuvent être considérées comme identiques, aux incertitudes expérimentales près.

L'analyse des données issues du modèle, limitée aux voies métaboliques centrales et aux voies de biosynthèse, conduit à constater un excès apparent de synthèse de $NADH_2$ (13,45 mmoles / g / h) et un déficit en ATP (11,5 mmoles / g / h). Avec une chaîne respiratoire permettant la synthèse de deux ATP par $NADH_2$ pris en charge, les besoins en ATP sont couverts par un flux de $NADH_2$ de 5,75 mmoles / g / h. Il reste alors un excès d'énergie sous forme $NADH_2$ (7,7 mmoles / g / h). En vertu du principe de non accumulation, cet excès de flux ne peut qu'être apparent. L'explication de ce surplus apparent de synthèse de $NADH_2$ doit certainement être cherchée dans l'analyse fine des éléments et de l'efficacité de la chaîne

respiratoire de *C. melassecola*, dans la prise en compte de l'énergie de maintenance, et dans l'étude des voies pouvant conduire à un recyclage énergétiquement neutre de ce cofacteur (NADH oxydase, cycles futiles, etc.). La connaissance de ces éléments, sujet central de cette thèse, apparaît indispensable à l'établissement d'un modèle métabolique complet et fiable pour *C. melassecola*.

III. La respiration chez les bactéries

Les corynébactéries, comme la plupart des micro-organismes, sont dépourvues d'appareil et de pigments photosynthétiques. Elles doivent, pour leurs synthèses, utiliser l'énergie libérée au cours de réactions chimiques (chimiotrophie). Ainsi, après le premier groupe de réactions oxydatives que nous venons d'explorer (glycolyse, voie des pentoses, voies anaplérotiques, pyruvate déshydrogénase et cycle de Krebs), l'oxydation finale des combustibles cellulaires est réalisée au cours de la respiration. Le genre *Corynebacterium* présente la caractéristique de regrouper essentiellement des bactéries anaérobies facultatives, et plusieurs espèces, parmi lesquelles *C. glutamicum*, sont nitrate réductase positives (Collins et Cummins, 1986). *C. glutamicum* pourrait ainsi effectuer ses oxydations terminales indifféremment en aérobiose ou anaérobiose, grâce à une chaîne respiratoire adaptée à chaque cas. En aérobiose l'accepteur final d'électrons serait l'oxygène, tandis qu'en anaérobiose les électrons pourraient être canalisés vers d'autres systèmes comme celui de la nitrate réductase, si tant est que la voie de réduction des nitrates dans cette espèce soit du type dissimilatrice. Outre ces systèmes, la présence d'une NADH oxydase, ayant l'oxygène comme accepteur direct d'électrons, a été suggérée par Cocaign (1992). Cette enzyme serait comparable à celles présentes dans plusieurs espèces bactériennes, notamment dans les bactéries lactiques (Lucey et Condon, 1986; Condon, 1987). Elle serait destinée à régénérer les cofacteurs réduits, produits en excès par les voies métaboliques centrales, sans production d'énergie (Cocaign, 1992; Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996). Le niveau d'expression

de cette enzyme serait alors lié essentiellement à l'excès de synthèse de NADH_2 mis en évidence dans plusieurs conditions de croissance de souches de corynébactéries utilisées dans l'industrie de production d'acides aminés. Cependant, les mêmes auteurs suggèrent aussi que ce problème de surcroît de potentiel énergétique pourrait trouver une solution dans l'existence d'un système de chaîne respiratoire branchée, à l'image de celui de *B. flavum* proposé par Shvinka *et al.* (1979). La recherche de transporteurs d'électrons susceptibles d'être à l'origine de cette voie alternative justifie de rappeler les caractéristiques des différents systèmes de transfert d'électrons connus chez les Procaryotes. En utilisation industrielle des corynébactéries, les cultures sont effectuées principalement en conditions d'aérobiose. Nous nous attacherons donc à faire ressortir, dans la partie qui suit, les principales étapes ainsi que les principaux composants des couplages énergétiques lorsque les croissances s'effectuent en présence d'oxygène. Dans ces conditions, la phosphorylation de l'ADP en ATP (ΔG positif) est couplée principalement à l'oxydation du NADH_2 par l'oxygène moléculaire (ΔG négatif). Cette oxydation s'effectue dans un contexte membranaire. La succession d'un couplage chimiosmotique et osmochimique va permettre la phosphorylation de l'ADP en ATP. Les éléments de couplage sont respectivement une chaîne de transfert d'électrons (chaîne respiratoire) et une ATP synthase. L'association de ces deux systèmes de couplage est schématisée dans la Figure 6.

III.1 ATP synthase

La formation d'un champ électrique couplant le transfert d'électrons et la phosphorylation dans les membranes biologiques a été postulée par Mitchell il y a plusieurs années déjà (Mitchell, 1967). Mitchell a suggéré que l'énergie dégagée dans le transfert d'électrons, ou dans l'hydrolyse de l'ATP, peut être convertie sous forme d'une différence de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane.

Selon Pelmont (1992), dans les bactéries l'ATP synthase est composée de deux parties. L'une est encreée dans la membrane et joue le rôle essentiel dans le passage de protons, l'autre est la partie « ATPase » qui dépasse dans le compartiment cytoplasmique. Ce système n'est

pas très différent de celui de la mitochondrie dont la structure est aussi composée de deux parties distinctes : F0 constituée d'un ensemble de chaînes polypeptidiques fortement associées à la membrane et F1 constituée d'un autre ensemble de chaînes polypeptidiques en interaction avec F0, localisée hors de la membrane, du côté matriciel. Le complexe F1 constitue la partie catalytique de l'ATP synthase tandis que F0, en absence de F1, est simplement un canal à protons permettant leur diffusion spontanée.

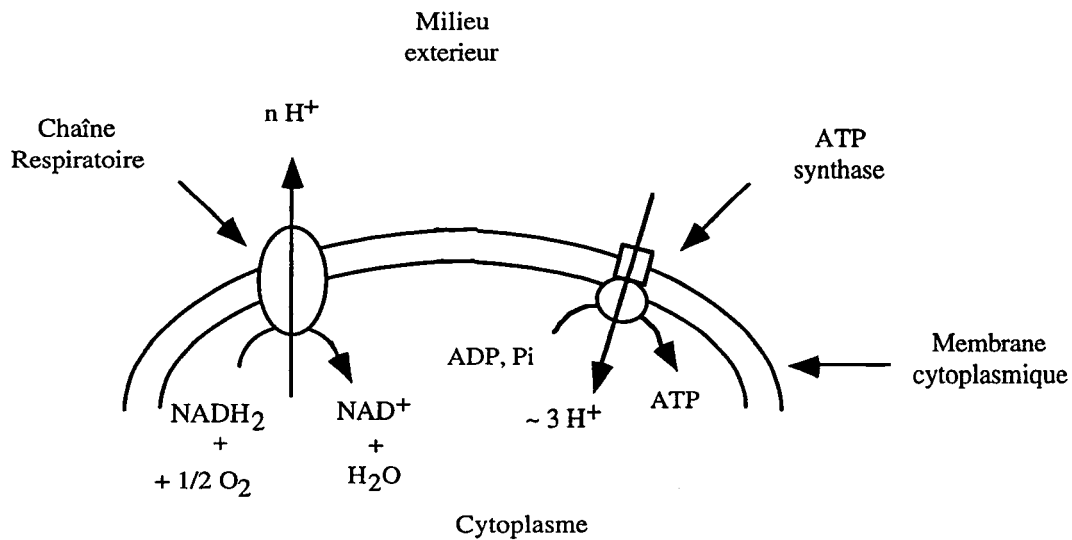


Figure 6. Schéma simplifié du couplage entre transfert d'électron et formation d'ATP.

III.2. Chaîne respiratoire

La chaîne membranaire de transfert d'électrons, ou chaîne respiratoire, est caractérisée par une succession de couples redox liés à la membrane cellulaire et entraînant le flux d'électrons qui va permettre le transport actif de protons de part et d'autre de la membrane. Chez les bactéries, ces couples redox sont composés par des flavoenzymes (déshydrogénases), des

quinones et des cytochromes qui, selon leur arrangement, vont constituer les différentes voies de transfert d'électrons. Ces diverses voies se distinguent en général par:

- la nature des flavoenzymes présentes;
- le type de quinone impliquée;
- le nombre et la nature des cytochromes en jeu.

Il n'est pas rare que l'on trouve dans une même souche bactérienne plusieurs voies de transfert d'électrons fonctionnant éventuellement en alternance. L'arrangement des différents couples redox en systèmes ramifiés permet à la cellule bactérienne d'optimiser l'utilisation de l'accepteur final d'électrons. Ainsi, le couplage entre le transfert d'électrons et le transport actif de protons aura des rendements différents en fonction de la voie suivie par les électrons jusqu'à l'accepteur final. Enfin, il faut bien noter qu'il n'y a pas de cloison étanche entre les différents métabolismes énergétiques au sein d'une même cellule.

La composition de la chaîne respiratoire, ainsi que les différentes associations possibles des composants de celle-ci, constitue l'un des atouts majeurs de la survie des bactéries. La cellule peut ainsi adapter son métabolisme énergétique afin de faire face aux changements de conditions environnementales. D'autre part, suivant le micro-organisme considéré et sa niche écologique, la chaîne respiratoire pourra être simple (« courte ») ou plus complexe (« longue », ramifiée). La diversité des composants et la versatilité dont font preuve les bactéries lorsqu'il s'agit de l'adaptation de leur métabolisme respiratoire, rend donc difficile la présentation d'un schéma généralisable.

Cependant, une organisation des éléments de la chaîne permettant une récupération d'énergie maximale (maximum de points où une paire d'électrons traverse la membrane), peut être envisagée sous la forme de trois principaux complexes successifs et dépendants. Lorsque ces trois complexes sont présents chez les Procaryotes aérobies, ce qui n'est pas toujours le cas, ils présentent de nombreuses similitudes avec ceux décrits dans la mitochondrie. Ainsi, certaines bactéries comme *Paracoccus denitrificans*, ou encore certaines appartenant au genre *Bacillus*, peuvent présenter une chaîne respiratoire contenant des complexes enzymatiques semblables aux complexes I, II et III de la mitochondrie (Berry et Trumpower, 1985; Taber, 1993).

La connaissance de ces complexes et de leur organisation vient en grande partie de la possibilité de bloquer le flux d'électrons passant au travers de la chaîne respiratoire, par addition d'inhibiteurs qui agissent au niveau des différents complexes. Ces inhibiteurs constituent un outil largement utilisé dans l'étude des chaînes respiratoires. Le cyanure est un inhibiteur qui bloque le transfert d'électrons au niveau du complexe cytochrome oxydase des parties terminales des chaînes respiratoires; l'antimycine (un antibiotique) bloque le transfert au niveau du complexe quinol-cytochrome *c* réductase, et la roténone au niveau du complexe NADH-quinone réductase. Ces trois inhibiteurs sont les plus connus, mais d'autres peuvent apporter les mêmes renseignements, voire de plus précis en ayant pour cible l'un des composants d'un des complexes. Tout au long de l'étude bibliographique des différents composants de chaînes respiratoires connues et de leurs particularités, nous aurons l'occasion de discuter plus avant de l'action d'inhibiteurs comme le DCCD, la capsaïcine et le myxothiazol.

III.2.1. Déshydrogénases

Les cellules bactériennes contiennent de nombreuses déshydrogénases qui interviennent dans les voies du métabolisme central, dans les voies fermentatives, diverses autres réactions, et sont à l'origine de la génération du NADH_2 ou du NADPH_2 . Ces enzymes sont en majorité solubles dans le cytoplasme des cellules bactériennes et leur connexion à la chaîne respiratoire se fait le plus souvent par l'intermédiaire du NAD^+ (Gel'man *et al.*, 1967). Ce coenzyme joue un rôle clef dans le transport d'équivalents réducteurs. Le NADH_2 généré dans les voies cataboliques est principalement utilisé dans la génération d'énergie, par transfert de ses électrons à un oxydant, par le biais de la chaîne respiratoire (Dancey *et al.*, 1976). L'oxydation du NADH_2 est catalysée par une enzyme située à l'entrée de la chaîne respiratoire, la NADH déshydrogénase. Cependant, tout en étant très importante dans la chaîne respiratoire bactérienne, cette enzyme semble jouer un rôle moins important que son homologue de la chaîne respiratoire mitochondriale des mammifères (Gel'man *et al.*, 1967; Taber, 1993). En effet, un grand nombre de déshydrogénases primaires, capables d'un transfert d'électrons direct sur la chaîne respiratoire, ont été mises en évidence chez les bactéries. Ainsi, chez *Gluconobacter*

suboxydans, la D-glucose déshydrogénase transfère ses électrons directement sur l'ubiquinone de la chaîne respiratoire (Matsushita *et al.*, 1989). Chez *E. coli*, les D-lactate et D-acide aminé déshydrogénases possèdent un accepteur d'électrons commun dans la chaîne respiratoire, capable de promouvoir une translocation de protons (Haldar *et al.*, 1982). Chez *C. glutamicum*, comme nous l'avons vu dans la partie dédiée à l'étude bibliographique du cycle de Krebs, il existe une malate déshydrogénase capable d'effectuer un transfert d'électrons directement sur les quinones (Molenaar *et al.*, 1998). Des déshydrogénases primaires contenant des groupements prosthétiques du type fer-soufre, des noyaux hèmes, du molybdène, du nickel ou encore des flavines ont été mises en évidence chez *E. coli*, notamment la NADH oxydase, l'hydrogénase, la *sn*-glycerol-3-phosphate oxydase et la formate oxydase (Taber, 1993). Cet auteur divise les déshydrogénases primaires en deux groupes: enzymes membranaires et enzymes associées à la membrane. De manière générale les premières sont liées à un site de transport de protons, les secondes ne le sont pas.

En termes de flux d'électrons traversant la chaîne respiratoire, les deux déshydrogénases les plus importantes sont celles responsables de l'oxydation du NADH₂, la NADH déshydrogénase (enzyme du complexe I), et du succinate d'autre part, la succinate déshydrogénase (enzyme du complexe II) (Gel'man *et al.*, 1967; Anraku, 1988; Yagi, 1991; Taber, 1993). La suite de cette étude bibliographique nous permettra de passer en revue les principales caractéristiques de ces deux complexes enzymatiques. Bien qu'elle ne soit pas considérée comme une déshydrogénase primaire, nous allons également inclure dans cette partie, une analyse des caractéristiques de la lipoamide déshydrogénase (LPDH). Cette enzyme, comme nous l'avons vu précédemment, fait essentiellement partie de deux grands complexes impliqués dans les réactions du métabolisme central (α -cétoglutarate déshydrogénase et pyruvate déshydrogénase). Cependant, nous l'avons placée dans cette section car plusieurs travaux font état de ses propriétés à oxyder le NADH₂ en présence de différents accepteurs d'électrons (Thorpe et Williams, 1976; Templeton et Tsai, 1985; Chenas *et al.*, 1987; Walker *et al.*, 1997), parmi lesquels les quinones, mais aussi des analogues du NAD⁺ (sNAD⁺ et AcPyAD⁺), ce qui fait de la lipoamide déshydrogénase une transhydrogénase potentielle. D'autre part, même si cette enzyme n'est pas liée directement à la chaîne respiratoire, dans la

mitochondrie les deux complexes enzymatiques dont elle fait partie (α -cétoglutarate déshydrogénase et pyruvate déshydrogénase) sont liés au Complexe I (Sumegi et Srere, 1984).

III.2.2. Succinate déshydrogénase

La succinate déshydrogénase (SDH) est une enzyme complexe contenant du fer, du soufre, et du FAD lié de manière covalente (Hederstedt et Rutberg, 1981). La SDH catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et transfère les équivalents réducteurs résultant de la réaction, directement à la chaîne respiratoire. Cette enzyme fait donc partie à la fois du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. Chez *E. coli*, elle est localisée dans la membrane cytoplasmique.

E. coli possède deux flavoenzymes membranaires différentes contenant des groupements fer-soufre, qui catalysent l'interconversion du succinate (succinate déshydrogénase) et du fumarate (fumarate réductase) (Hirsch *et al.*, 1963; Spencer et Guest, 1973). La fumarate réductase, qui peut prendre part à la respiration anaérobie avec le fumarate comme accepteur final d'électrons, serait aussi liée à la membrane (Hederstedt et Rutberg, 1981). Selon Hirsch *et al.* (1963), chez *E. coli*, l'expression du gène codant la fumarate réductase serait réprimée en aérobiose, tandis que celle du gène codant la succinate déshydrogénase serait réprimée en anaérobiose. Structurellement ces deux enzymes sont très similaires mais sont distinctes du point de vue de leur antigénicité (Condon et Owen, 1982).

La SDH de *E. coli* contient 4 sous-unités (SdhA, SdhB, SdhC et SdhD). Selon Yang *et al.* (1997) les deux premières sous-unités constituent la partie déshydrogénase active tandis que SdhC et SdhD contribuent à fixer l'enzyme à la membrane. D'après ces auteurs, ces deux sous-unités (SdhC et SdhD) contiennent 35 nmol de cytochrome *b556* / mg de protéine et, contrairement au cytochrome *b560* de la mitochondrie, ce cytochrome est réduit par le succinate tant sous sa forme complexée que sous sa forme isolée. Chez *Bacillus sp.*(souche YN-2000), la succinate-quinone réductase (complexe II) isolée contient 3 sous-unités renfermant du FAD, un cytochrome *b*, une ménaquinone, du fer et du soufre inorganique (Qureshi *et al.*, 1996).

L'enzyme présente des pics d'absorbance à 556,5 et 554 nm à température ambiante et à 77 K respectivement (Qureshi *et al.*, 1996), pics caractéristiques de la présence de cytochromes.

III.2.3. NADH déshydrogénase

La NADH déshydrogénase est une enzyme membranaire, qui catalyse la réduction des quinones par le NADH₂ au sein du complexe NADH-quinone réductase. L'étude de ce complexe enzymatique est très importante. Non seulement il est le point d'entrée de la plus grande partie des électrons qui traversent la chaîne respiratoire, mais il a été démontré que plusieurs maladies humaines impliquent des défauts structurels et fonctionnels au niveau de ce complexe (Yagi, 1990). Chez de nombreuses bactéries et dans la mitochondrie, le complexe NADH-quinone réductase est aussi un site transporteur de protons. En 1976 Dancey *et al.*, ont étudié les propriétés de la NADH déshydrogénase de *E. coli* partiellement purifiée. Ces auteurs ont constaté que cette enzyme pouvait oxyder le NADH₂ (mais non le NADPH₂) pour réduire des naphtoquinones, la menadione et le DCIP. D'autre part, ces auteurs ont mis en évidence la présence d'une activité NADH déshydrogénase dans la fraction cytosoluble. Cette activité était substantiellement différente de celle retrouvée dans la membrane, à la fois en ce qui concerne la spécificité vis-à-vis du substrat, et en ce qui concerne l'effet des inhibiteurs de la chaîne respiratoire sur celle-ci. La présence d'une deuxième déshydrogénase avait déjà été supposée par Hendler et Burgess (1972) lors de leurs travaux de caractérisation de la chaîne de transfert d'électrons chez *E. coli*.

L'activité NADH déshydrogénase membranaire est beaucoup plus stable en présence de phospholipides (Dancey et Shapiro, 1977). Chez *Bacillus caldotenax*, les lipides protègent partiellement la NADH déshydrogénase membranaire de l'inactivation thermique (Kawada *et al.*, 1981). Les préparations enzymatiques contenant l'activité NADH déshydrogénase, obtenues par Jaworowski *et al.* (1981b), contiennent 70% (w/w) de lipides. Awasthi *et al.* (1970) ont utilisé les phospholipases A et C pour étudier les interactions entre la NADH déshydrogénase et les phospholipides de la membrane mitochondriale. Ces auteurs ont montré une inhibition des activités NADH déshydrogénase et succinate déshydrogénase par l'action des

deux phospholipases sur les membranes. Ils attribuent une partie de cet effet inhibiteur aux produits de dégradation des phospholipides.

Les résultats de Matsushita *et al.* (1987) confirment les observations de Dancey *et al.* (1976) sur la présence de deux NADH déshydrogénases chez *E. coli*. Une de ces enzymes (NDH-dh I) réagit avec le deamino-NADH₂ (d-NADH₂) aussi bien qu'avec le NADH₂, tandis que l'autre (NDH-dh II) oxyde exclusivement le NADH₂. NDH-dh II a été purifiée et le gène *ndh* codant cette enzyme chez *E. coli* a été cloné par Jaworowski *et al.*, (1981a).

Chez *B. subtilis*, une seule NADH déshydrogénase est présente. Ceci a été démontré dans les travaux de Bergsma *et al.* (1981), par l'utilisation de techniques immunologiques. Cette NADH déshydrogénase a été purifiée, elle contient du FAD comme groupement prosthétique, est spécifique du NADH₂ et réduit la ménaquinone (Bergsma *et al.*, 1982). *P. denitrificans* présente un complexe NADH-quinone réductase correspondant à la NADH déshydrogénase de la chaîne respiratoire mitochondriale (Complexe I) (Yagi, 1986). Le même type de complexe NADH déshydrogénase a été purifié chez *Thermus thermophilus*. Il est constitué de 10 polypeptides et contient du FMN lié de manière non covalente (Yagi *et al.*, 1988). Trois groupements Fe-S ont été identifiés comme étant partie intégrante du complexe NADH-quinone réductase (NDH-dh I) de ce micro-organisme (Owen *et al.*, 1980; Meinhardt *et al.*, 1990). Cependant, *T. thermophilus* présente aussi une deuxième NADH déshydrogénase. Cette dernière est constituée d'une seule sous-unité et contient du FAD et non du FMN (Yagi *et al.*, 1988)

L'ensemble de ces résultats permet de diviser les déshydrogénases en deux types:

1 - Des enzymes contenant du FMN au lieu du FAD et présentant des groupements Fe-S. Ces enzymes sont constituées d'une dizaine de sous-unités différentes (Yagi, 1986; Matsushita *et al.*, 1987; Yagi *et al.*, 1988);

2 - Des enzymes constituées d'une seule chaîne polypeptidique et contenant du FAD (Bergsma *et al.*, 1981; Jaworowski, 1981b; Matsushita *et al.*, 1987; Yagi *et al.*, 1988).

L'inhibition de l'activité NADH-quinone réductase par le DCCD (Diciclohexyl carbodiimide) et la corrélation entre cette inhibition et la présence de sites de couplage énergétique a été observée chez plusieurs organismes par Yagi (1987). Ainsi, lorsque la NADH-quinone réductase est liée à un site de couplage énergétique (mitochondrie du coeur de boeuf et du foie de souris, membranes de *E. coli*, de *P. denitrificans*, et de *T. thermophilus*), elle agit comme un inhibiteur de la réduction des quinones par le NADH_2 . Au contraire, lorsque le couplage énergétique est absent (mitochondrie de *Saccharomyces cerevisiae* et membranes de *B. subtilis*), il n'y a pas d'inhibition de la NADH-quinone réductase par le DCCD. A la vue de ces résultats, Xu et Yagi (1991) ont proposé de nouveaux critères pour la séparation des deux types de NADH déshydrogénase. Ainsi, le premier groupe, celui des enzymes contenant du FAD, des groupements Fe-S, à sous-unités multiples, est désigné NDH-1. Il comprend des enzymes liées à un site de couplage énergétique, à l'image de la NADH-quinone réductase de la mitochondrie (Complexe I). Le deuxième groupe, celui des enzymes contenant du FAD et sans groupement Fe-S, désigné NDH-2, comprend les enzymes n'ayant pas de liaison à un site de couplage énergétique.

Chez *T. thermophilus*, NDH-1 est capable de réduire aussi bien l'ubiquinone que la ménaquinone (Meinhardt *et al.*, 1990). Selon Yagi (1990), ceci n'est pas surprenant car la spécificité pour le substrat dans le site actif de NDH-1 est très faible. Ainsi d'autres substrats, comme la rhodoquinone et la duroquinone, sont utilisés comme accepteurs d'électrons dans les essais enzymatiques impliquant le complexe I des mitochondries (Kita *et al.*, 1988, Yagi, 1990).

La NADH-quinone réductase (Complexe I) de *E. coli* a été purifiée et caractérisée. Ce complexe présente une masse moléculaire d'environ 550 000 Da et est composé par 14 sous-unités (Leif *et al.*, 1995). Ces 14 sous-unités sont codées par les gènes de l'opéron *nuo*. Afin d'élucider le mécanisme d'action de la NDH-1, plusieurs travaux sur l'identité, les propriétés et la stoechiométrie des sous-unités périphériques de cette enzyme chez *P. denitrificans* ont été effectués (Crouse *et al.*, 1994; Yano *et al.*, 1995; Takano *et al.*, 1996; Yano *et al.*, 1996).

L'utilisation d'inhibiteurs est apparue comme un outil assez pratique dans l'étude des transferts d'électrons et du transport de protons au niveau de la quinol-cytochrome *c* réductase

(Yagi, 1990). Cet auteur propose l'utilisation de cette méthodologie dans l'étude des NDH-1. La roténone, la Pyericidine A et le DCCD sont des inhibiteurs du complexe I (Yagi, 1987 et 1990; Ahmed et Krishnamoorthy, 1992). Toutefois, c'est l'inhibition par la capsaïcine (substance qui donne le caractère piquant du piment rouge) qui semble être la mieux corrélée à la présence d'une NDH-1, et apparaît comme l'inhibiteur le plus adapté à l'investigation du rôle des quinones dans le couplage énergétique associé aux NDH-1 de plusieurs organismes (Shimomura *et al.*, 1989; Yagi, 1990). Dans une étude récente, Satoh *et al.* (1996) ont montré que des analogues synthétiques de la capsaïcine sont aussi capables d'inhiber la NDH-1, également par compétition au niveau de la liaison de la NDH-1 et de la quinone.

Récemment Bogachev *et al.* (1996) ont étudié le rapport stoechiométrique H^+/e^- pour la NDH-1. Ces auteurs estiment que ce rapport est moins important (inférieur à 1,5) que celui du complexe I mitochondrial qui est de 2.

III.2.4. Lipoamide déshydrogénase

La lipoamide déshydrogénase est un des composants (E3) des deux grand complexes pyruvate déshydrogénase et α -cétoglutarate déshydrogénase. C'est une flavoprotéine de la famille des disulfure oxydoréductases. En général, elle présente une structure homodimérique, contenant une molécule de FAD par sous-unité (Packman et Perham, 1982; Westphal et Kok, 1988; Mattevi *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1991a). Chez *E. coli* et dans la mitochondrie du coeur de porc, chaque sous-unité contient un pont disulfure qui subit la réduction et l'oxydation de manière alternée pendant l'action catalytique de l'enzyme (Packman et Perham, 1982). La réaction catalysée par cette enzyme à l'intérieur du complexe pyruvate déshydrogénase est schématisée dans la Figure 3 (page 21).

Chez *E. coli*, la séquence du gène (*lpd*) codant la lipoamide déshydrogénase a été déterminée (Stephens *et al.*, 1983). Les résultats obtenus par ces auteurs confirment que *lpd* est un gène indépendant, lié, mais sans en faire partie, à l'opéron *ace* qui code E1 et E2 de la

pyruvate déshydrogénase (respectivement la déshydrogénase et la dihydrolipoamide acyltransférase).

En addition à l'activité lipoamide déshydrogénase à proprement parler, chez *Mycobacterium smegmatis*, la LPDH purifiée est capable de promouvoir de fortes activités NADH oxydase (30% du taux de réduction du lipoate), peroxyde réductase (10% du taux de réduction du lipoate), et quinone réductase (naphtoquinone et benzoquinone à 200% des taux de réduction du lipoate) (Marcinkeviciene et Blanchard, 1997). La réduction des quinones par la LPDH a été signalée aussi par Chenas *et al.*, (1987) qui ont vérifié que le transfert d'électrons se fait électron par électron. De même, la réduction du ferricyanure par une LPDH a été démontrée par Berks *et al.* (1993) chez *Rhodobacter capsulatus*, dans une étude sur les déshydrogénases associées à la membrane de ce micro-organisme. En outre, Walker *et al.* (1997) signalent que cette enzyme, présente dans la mitochondrie de *Hymenolepis diminuta* présente, en plus de l'activité lipoamide déshydrogénase, des activités ferricyanure réductase et une activité transhydrogénase $\text{NADH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$ élevée. Dans une moindre mesure l'enzyme présente aussi une activité NADH diaphorase ainsi qu'une activité transhydrogénase $\text{NADPH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$. L'activité transhydrogénase $\text{NADH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$, tant dans la mitochondrie de *H. diminuta* (Walker *et al.*, 1997) que dans la mitochondrie de *Ascaris suum* (Köhler et Saz, 1976; Komuniecki et Saz, 1979), pourrait avoir comme fonction le transport d'équivalents réducteurs à travers la membrane. L'association entre l'activité transhydrogénase $\text{NADH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$ de LPDH et la NADH déshydrogénase de *H. diminuta* a été suggérée par Walker et Fioravanti (1995).

III.2.5. Composés intermédiaires transporteurs d'électrons

Les transporteurs intermédiaires d'électrons peuvent être soit des molécules organiques (flavines, quinones), soit des métalloprotéines (protéines fer-soufre, cytochromes), qui ont pour

particularité d'avoir au niveau de leur groupement prosthétique au moins un ion métallique (fer, cuivre...).

III.2.5.1. FLAVINES-NUCLEOTIDES

Les flavines-nucléotides, FAD (Flavine-Adénine-Dinucléotide) et FMN (Flavine-Mono-Nucléotide) sont des composés organiques dérivés de la riboflavine ou vitamine B2, impliqués dans des réactions d'oxydoréduction. Elles constituent les groupement prosthétiques des protéines appelées flavoprotéines (NADH déshydrogénase, Succinate déshydrogénase, Lipoamide déshydrogénase, Nitrate réductase...), auxquelles elles peuvent être liées ou non par une liaison covalente. La réduction des flavoprotéines s'accompagne d'un blanchiment, facilement mesuré au spectrophotomètre, correspondant à une diminution d'absorbance dans le visible autour de 450 nm. Le FAD et le FMN ont le même coefficient d'absorbance molaire à 450 nm, soit $11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ce coefficient descend à $980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dans la forme réduite (FADH_2 , FMNH_2). Le potentiel d'oxydo-réduction du FAD et du FMN est -0,219 Volt (pH 7,0 à 30°C). Ce potentiel est très sensible à l'environnement chimique et peut, dans la flavoprotéine, être décalé vers des valeurs plus positives (Pelmont, 1993). Les flavines possèdent la propriété particulière de pouvoir subir des réductions soit monoélectroniques, soit diélectroniques. Ceci leur confère le rôle d'intermédiaire indispensable entre des réducteurs donnant deux électrons à la fois (NADH_2 , NADPH_2 ou succinate), et des transporteurs d'électrons acceptant un seul électron à la fois (quinones, cytochromes ou centres fer-soufre).

III.2.5.2. QUINONES

Les quinones sont des composants transporteurs d'électrons et d'hydrogène ubiquitaires dans les chaînes de transport d'électrons (Anraku, 1988). Ce sont des molécules organiques constituées soit d'un noyau 1,4-benzoquinone substitué (ubiquinone, plastoquinone), soit d'un noyau naphthoquinone substitué (ménaquinone). Ces noyaux sont associés à une longue chaîne poly-isoprénoïde. Les quinones sont hydrophobes liposolubles. Elles existent soit libres dans la matrice lipidique, soit associées à des complexes multiprotéiques d'une chaîne membranaire. Le potentiel d'oxydo-réduction dépend de la nature de la quinone. Collins et Jones (1981) utilisent

la composition en quinones des bactéries comme critère de classification. Selon ces auteurs, les bactéries à Gram positif possèdent seulement la ménaquinone dans la chaîne respiratoire, tandis que plusieurs bactéries à Gram négatif possèdent à la fois la ménaquinone et l'ubiquinone. Les ménaquinones majeures du genre *Corynebacterium*, selon Collins et Cummins (1986) sont la MK-8 et la MK-9. Les quinones présentent des spectres d'absorbance entre 260 et 280 nm en fonction de l'état d'oxydo-réduction. Pratiquement, il est difficile de tirer profit de ces différences du fait de l'absorbance importante des protéines dans cette région du spectre.

III.2.5.3. PROTEINES FER-SOUFRE

Les protéines fer-soufre contiennent des centres Fe/S, constitués d'atomes de fer reliés entre eux de manière non covalente par des atomes de soufre. Les atomes de fer du centre sont également liés par liaison covalente à la chaîne polypeptidique, par l'intermédiaire des atomes de soufre de résidus cystéines. Ces centres contiennent ainsi deux types d'atomes de soufre: des atomes « inorganiques », liés uniquement aux atomes de fer, et des atomes « organiques » liés à un atome de fer et au carbone 3 d'une cystéine. Les centres peuvent être plus ou moins complexes: Fe_2/S_2 ; Fe_4/S_4 ; Fe_8/S_8 . Quelle que soit la complexité du centre, la réduction de la forme oxydée du couple ne fait intervenir qu'un seul électron. Le potentiel d'oxydo-réduction dépend de l'environnement protéique. Les protéines fer-soufre sont surtout connues pour leur rôle important dans les mécanismes d'oxydoréduction des chaînes de transport d'électrons. Selon Anraku (1988), dans la chaîne respiratoire bactérienne existent 2 classes de protéines fer-soufre liées au transport d'électrons. La Classe I est liée aux déshydrogénases primaires et la Classe II (protéine de Rieske) est partie intégrante du complexe *bc1*.

III.2.5.4. CYTOCHROMES

Les cytochromes sont présents dans toutes les formes de vie (bactéries, protozoaires, levures et tous les organismes supérieurs). Ce sont des hémoprotéines qui participent à des réactions d'oxydo-réduction dans des métabolismes réactionnels complexes comme la photosynthèse et la respiration, en tant que transporteurs monoélectroniques. Les trois types principaux de cytochromes, *a*, *b*, et *c*, ont été définis en 1925 par Keilin selon leur spectre

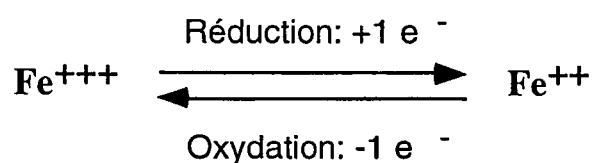
d'absorbance dans le visible (Keilin, 1966). Les différents cytochromes présentent à l'état réduit trois bandes d'absorbance entre 400 nm et 600 nm, dénommées α , β , γ (Tableau 1). Les bandes α et β disparaissent lors de l'oxydation. La bande α est considérée comme la plus caractéristique de chaque type de cytochrome.

Le cytochromes ont des potentiels redox généralement positifs. Mais, il existe des cytochromes ayant des potentiels redox négatifs. Le potentiel redox des cytochromes est ainsi compris entre -0,1 et +0,5 Volt.

Tableau 1. **Longueur d'onde des pics d'absorbance des trois principaux cytochromes**

Groupement hème	Longueurs d'onde des maxima d'absorbance (nm)		
	α	β	γ
<i>a</i>	592 - 604	absente	435 - 443
<i>b</i>	555 - 567	526 - 546	408 - 449
<i>c</i>	550 - 558	521 - 527	415 - 423

Les cytochromes présentent une grande variété structurale mais ont en commun un composé tétrapyrrolique comme groupement prosthétique. Le couple redox est le groupement hème formé de l'association d'une porphyrine et d'un atome de fer qui passe réversiblement de Fe^{+++} à Fe^{++} .



III.2.6. Complexe quinol-cytochrome *c* réductase

Le complexe quinol-cytochrome *c* réductase ou *bcl* (complexe III) fait partie de la chaîne de transporteurs d'électrons dans la respiration mitochondriale (Ubiquinol-cytochrome *c* réductase), mais aussi chez les bactéries et dans la membrane des thylacoïdes. Néanmoins, il n'est pas universel chez les bactéries. La plupart des archaebactéries (Schäfer *et al.*, 1996), ainsi que *E. coli* et *Salmonella typhimurium*. (Poole et Ingledew, 1987) en sont dépourvues.

Il existe deux manières courantes de déceler la présence d'un complexe quinol-cytochrome *c* réductase. La première est d'observer un signal spectral caractéristique en RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) dû à la présence de la protéine de Rieske dans ce complexe. La deuxième est basée sur l'utilisation d'inhibiteurs caractéristiques, comme l'antimycine A et le myxothiazol. Selon Pelmont (1993), de nombreuses espèces de plantes et de champignons produisent des antibiotiques du genre antimycine pour bloquer les oxydo-réductions bactériennes. L'auteur suggère que ceci a pu conduire à la sélection de micro-organismes où la respiration passant par le complexe quinol-cytochrome *c* réductase, très performante pour la conservation d'énergie, est doublée par d'autres voies d'oxydation n'utilisant pas ce type de cytochrome.

Chez *B. subtilis* le complexe *bcl* contient deux hèmes *b*, un hème *c* et un centre Fe/S à haut potentiel (Taber, 1993). Chez une souche thermophile (PS3) de *Bacillus* la présence d'un centre Fe/S similaire à celui de la protéine de Rieske a été détectée, en plus de celle de deux cytochromes du type *b* et d'un cytochrome *c1* (Kutoh et Sone, 1988). Ce complexe serait, selon les auteurs, similaire à celui des chloroplastes et des cyanobactéries (complexe *b6f* équivalent de *bcl*), et catalyserait la réduction du cytochrome *c* avec plusieurs composés quinols, en présence de phospholipides. D'autre part, les trois sous-unités isolées du complexe ubiquinol-cytochrome *c* réductase de *P. denitrificans*, présentent des similitudes importantes à celles du complexe *bcl* de la mitochondrie des eucaryotes, en ce qui concerne le transfert d'électrons (Yang et Trumpower, 1986). Le complexe purifié présente également, deux cytochromes du type *b*, un cytochrome *c1* et une protéine Fe/S du type protéine de Rieske. Selon Yang et Trumpower (1986), l'activité du complexe purifié est inhibée (plus de 95%) par l'antimycine A, le myxothiazol et par des composés analogues des hydroxyquinones.

Selon Anraku (1988), la plupart des bactéries qui possèdent un complexe quinol-cytochrome *c* réductase peuvent s'en passer complètement dans certaines conditions physiologiques, étant pour cela équipées d'une oxydase terminale capable d'oxyder directement le quinol sans passer par le cytochrome *c*.

Les caractéristiques spectroscopiques des différents types de cytochromes *b* et *c* impliqués dans le complexe quinol cytochrome *c* réductase, sont variables d'une espèce à l'autre, et en fonction des méthodologies utilisées dans les différentes études mentionnées ci-dessus.

III.2.7. Oxydases terminales

Selon Anraku (1988), la grande majorité des bactéries possède plus d'une oxydase terminale. De multiples oxydases terminales permettraient à la bactérie de moduler son métabolisme respiratoire afin de répondre à des situations physiologiques particulières (Gennis, 1991). Les oxydases terminales sont classées en deux groupes, l'un est celui des cytochrome *c* oxydases (Classe I), et l'autre celui des quinol oxydases (classe II). Les enzymes des classes I et II peuvent encore être subdivisées en deux groupes schématisés Figure 7. Les enzymes de la classe IA contiennent un hème *a* et Cu^{2+} et ceux de la classe IB un hème *b* (ou hème *o*). Les enzymes de la classe II (A et B), les quinol-oxydases, sont exclusives des bactéries et reçoivent les électrons directement de l'ubiquinol ou du ménaquinol, faisant le transfert directement sur l'oxygène. Les enzymes de la classe IIA contiennent un hème *bo* et Cu^{2+} , tandis que les enzymes de la classe IIB contiennent un hème *bd* (Anraku, 1988; Pelmont, 1993).

E. coli possède deux oxydases terminales du type IIA et IIB (*bo* et *bd* respectivement) dont l'abondance relative dépend des conditions d'oxygénation du milieu (Minghetti *et al.*, 1992). Ainsi, en conditions de faible aération c'est le cytochrome *bd* qui est majoritaire, alors qu'en conditions de forte aération c'est le cytochrome *bo* qui est présent à des niveaux plus élevés. Selon Minghetti *et al.*, (1992), l'une des caractéristiques principales de l'enzyme quinol-oxydase du type *bo* est la présence d'un signal spectral à 562 nm.

Parmi les oxydases terminales, c'est la superfamille des cytochrome *c* oxydases (classe I) qui est la mieux connue (Schäfer *et al.*, 1996). Ces oxydases catalysent la réduction de l'oxygène par 4 H⁺ et 4 électrons pour former une molécule d'eau; simultanément 4 protons sont transportés à travers la membrane générant un gradient de potentiel. Selon Schäfer *et al.* (1996) toutes les cytochromes *c* oxydases contiennent 5 centres métalliques; 2 ferroporphyrines (hème *a* et hème *a*₃) et trois ions Cu²⁺. Dans cette famille des oxydases terminales, on trouve encore deux autres capables d'oxyder le quinol directement, l'oxydase terminale de type *bo* d'*E. coli* (Gennis, 1991) et l'oxydase *aa3* du genre *Bacillus* (Hicks *et al.*, 1991; Santana *et al.*, 1992). En effet, chez *B. subtilis* une oxydase terminale du type *aa3*, capable comme les enzymes de la classe II (*bo* et *bd*), d'oxyder directement le ménaquinol, a été mise en évidence (Santana *et al.*, 1992). Hicks *et al.* (1991) ont démontré chez *Bacillus firmus* la présence de 4 oxydases terminales différentes (*aa3*, *caa3*, *bo* et *bd*). Ces auteurs suggèrent que l'oxydase terminale du type *bd* est similaire à celle présente chez *E. coli*.

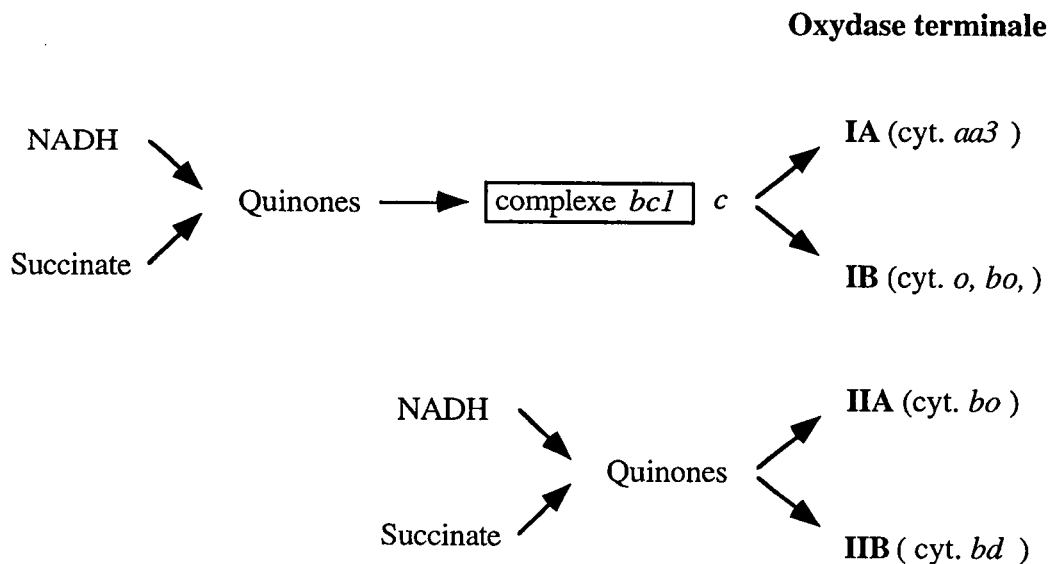


Figure 7. **Chaînes respiratoires bactériennes aérobies**

(D'après Anraku, 1988; Pelmont, 1993)

III.3. Chaînes respiratoires ramifiées et importance physiologique

Comme nous avons eu l'occasion de le voir précédemment, les systèmes transporteurs d'électrons (STE) des bactéries sont potentiellement extrêmement variables, en termes d'organisation et de complexité. Des ramifications à la fois au niveau des déshydrogénases initiales et des oxydases terminales sont fréquentes (Anraku, 1988; Yagi, 1990; Sone et Fujiwara, 1991; Calhoun *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995). Parmi les micro-organismes chez lesquels des STE ramifiées ont été pleinement décrites, on peut citer *E. coli* (Calhoun *et al.*, 1993), *P. denitrificans* (Liu *et al.*, 1995). Quelques études préliminaires ont été menées dans ce sens sur *B. flavum* (Schvinka *et al.*, 1979) et *C. glutamicum* (Trutko *et al.*, 1982). Le nombre de sites de couplage énergétique des STE peut varier considérablement (Liu *et al.*, 1995; Anraku, 1988). Ces variations sont influencées par la concentration en oxygène, le pH, la température, la présence de certains substrats et l'âge de la culture (Anraku, 1988). Cette complexité semble conférer certains avantages adaptatifs en fonction des conditions de croissance. La nature réelle de ces avantages est cependant encore mal connue (Liu *et al.*, 1995).

De manière générale, lorsqu'elles existent, les oxydases terminales de la classe II (*bo* et *bd*) sont de loin moins efficaces dans la production d'énergie que les oxydases terminales de la classe I, et seraient destinées d'avantage à l'adaptation des micro-organismes, qu'à augmenter leur efficacité énergétique (Anraku, 1988). En outre, à l'intérieur de la classe II l'efficacité énergétique n'est pas la même pour les deux oxydases.

Chez *E. coli*, Calhoun *et al.*, (1993) ont démontré que la quinol-oxydase *bd* est moins efficace que la quinol-oxydase *bo*. Dans une étude sur l'efficacité énergétique d'*E. coli*, par l'étude de mutants touchés dans la synthèse de différents composés de la chaîne respiratoire, ces auteurs ont conclu que le degré de couplage de cette chaîne (rapport H^+/e^- ou ATP/O), est fonction de la répartition du flux d'électrons entre les deux déshydrogénases (NDH-1 et NDH-2) et entre les deux oxydases terminales (type *bo* et type *bd*) (Figure 8).

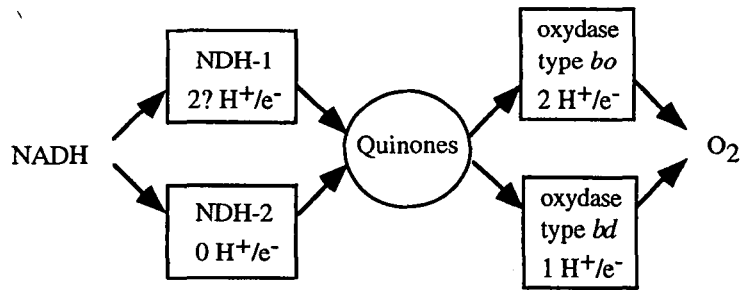


Figure 8. Représentation schématique des différents composants de la chaîne respiratoire aérobie chez *Escherichia coli*.

Le flux d'électrons est distribué entre les deux déshydrogénases et les deux quinol-oxydases. Le nombre de protons transporté (par électron) par chaque complexe est indiqué. (D'après Calhoun *et al.*, 1993)

P. denitrificans présente des voies respiratoires alternatives, la ramification se situant après l'ubiquinol. L'une des voies ressemble fortement à la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans cette voie, l'ubiquinol est oxydé par le super-complexe constitué d'une cytochrome *c* réductase (*bc1*), d'un cytochrome *c552* et d'une cytochrome *c* oxydase (*aa3*) (Berry et Trumpower, 1985). Plus récemment, l'isolement d'une nouvelle oxydase terminale (type *bb3*) chez *P. denitrificans*, a permis à de Gier *et al.* (1994) d'analyser la contribution dans le transport de protons de chacun des complexes impliqués dans les différentes voies possibles. Chez *P. denitrificans*, comme chez *E. coli*, l'efficacité énergétique globale dépend de la voie empruntée par les électrons (Figure 9).

Selon Calhoun *et al.* (1993), la quantification de l'efficacité énergétique des chaînes respiratoires est d'une grande importance, tant sur le plan fondamental que sur le plan de l'application industrielle. Neijssel et Teixeira de Mattos (1994) considèrent que ce n'est pas un maximum de rendement de croissance (maximum d'efficacité énergétique), mais un taux maximum de croissance (flux de génération d'énergie maximal) qui détermine le succès dans la survie d'un micro-organisme. Ceci semble particulièrement vrai lorsque l'on induit un changement rapide dans l'environnement (Neijssel et Teixeira de Mattos, 1994). Selon ces auteurs, un certain degré de découplage peut conduire à l'augmentation de la synthèse d'ATP

(génération de force proton-motrice), au détriment de l'efficacité énergétique de la chaîne respiratoire.

Chez les micro-organismes producteurs d'acides aminés, certaines conditions métaboliques particulières peuvent conduire à une surproduction de métabolites intermédiaires (α -cétoglutarate, pyruvate, acide gluconique, etc.). Ce type de phénomène est observé lors d'un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme, lorsque la croissance est limitée par la carence d'un nutriment essentiel, ou lorsque la source de carbone est présente en excès (Krämer, 1996). Dans une telle situation, Liu *et al.*, (1995) signalent qu'une rapide oxydation des composés carbonés peut générer une haute concentration en équivalents réducteurs. Les cellules bactériennes doivent alors compter sur la flexibilité des STE pour recycler leurs transporteurs d'électrons, éliminer le surplus d'énergie, et prévenir l'accumulation de métabolites « toxiques ».

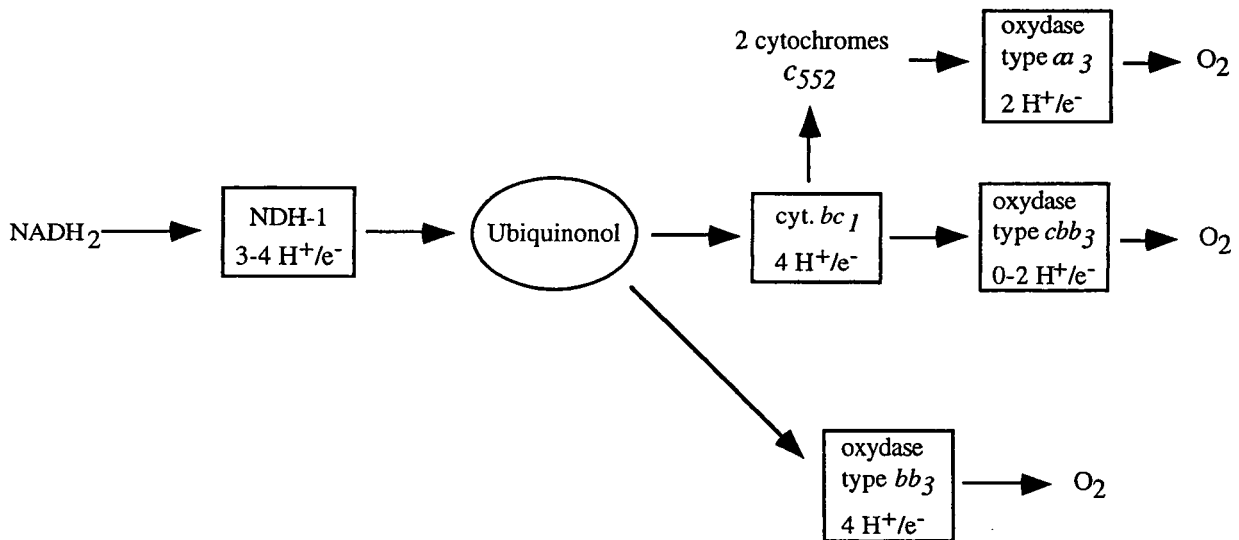


Figure 9. Représentation schématique des différents composants de la chaîne respiratoire aérobie chez *Paracoccus denitrificans*.

Le flux d'électrons est distribué entre les deux quinol-oxydases et les deux cytochrome oxydases terminales. Le nombre de protons transporté (par électron) par chaque complexe est indiqué. (D'après de Gier *et al.*, 1994)

Même si des problèmes liés aux déséquilibres redox chez les corynébactéries, en particulier l'excès de NADH_2 , ont été évoqués en plusieurs occasions (Vallino et Stephanopoulos, 1993; Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1998), les problèmes de déséquilibre énergétique liés à la surproduction d'acides aminés ont été souvent négligés. D'après Krämer (1996), un déséquilibre entre la production et la consommation d'énergie est observé en conditions de surproduction d'acides aminés, lequel peut d'une part, limiter le rendement de la conversion du substrat en produit, d'autre part être la base de surproduction d'un métabolite particulier (Linton, 1990). Krämer (1996), que nous suivons sur ce plan, considère que la connaissance du métabolisme redox et énergétique est un complément indispensable à la connaissance des flux de carbone au sein des voies métaboliques centrales. L'association de ces connaissances permettrait d'envisager une meilleure compréhension du métabolisme global des souches bactériennes productrices d'acides aminés, et ainsi une meilleure planification des stratégies d'amélioration des performances de ces souches.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel Biologique

I.1. Souches bactériennes

I.1.1. *Corynebacterium melassecola*

Ce travail a été réalisé avec *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965. Ses caractéristiques principales sont les mêmes que celles décrites par Jones et Collins (1986) pour les autres espèces du genre *Corynebacterium*. Pléiomorphe, la forme des cellules est variable en fonction des conditions de culture et du stade de la croissance. Généralement associées par paires en forme de V, les cellules peuvent passer de la forme bâtonnet court à la forme de coque ou encore de longs bâtonnets enchevêtrés dans des amas. Le diamètre moyen des cellules est compris entre 0,7 et 1 μm , la longueur entre 1 et 3 μm .

Cultivée sur boîte de Pétri, la souche forme des colonies rondes à bord régulier, de couleur rose, présentant des cercles concentriques et une partie centrale en forme de dôme. La coloration rose s'accroît avec le vieillissement.

Cette souche est capable de croître sur milieu minimum. Comme pour les autres souches appartenant au genre *Corynebacterium*, elle exige la présence de biotine et d'un chélateur de fer dans le milieu de culture (Liebl, *et al.*, 1989; von der Osten *et al.*, 1989b).

I.1.2. *Escherichia coli*

La souche d'*E. coli* DH 5 α a été utilisée pour les travaux de biologie moléculaire:

- *Escherichia coli* DH5 α (*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*,

Δ (*lacZYA-argFV169*), ϕ 80*lacZ* Δ M15, *F*, λ)

I.2. Plasmides

I.2.1. pGEM-T

Ce plasmide est le vecteur de clonage des produits de P.C.R. Ce plasmide est fourni linéarisé, avec une thymidine en simple brin à chaque extrémité 3'. Cette caractéristique permet l'insertion de fragments de P.C.R. dont les extrémités 3' possèdent une adénosine fixée par la Taq polymérase à la fin de l'amplification. Le protocole de clonage suivi est celui préconisé par la société Promega qui commercialise ce vecteur.

I.2.2. pUN 121

Dérivé de pBR322, ce vecteur de 4,41 Kb a été construit par Nilsson *et al.* (1983). Il permet une sélection positive des bactéries transformées par un plasmide recombinant. Il confère une résistance constitutive à l'ampicilline et conditionnelle à la tétracycline. Ce plasmide a été utilisé lors de la construction de la banque d'ADN chromosomique de *C. melassecola* ATCC 17965.

II. Conditions de culture et de transformation

II.1. Conditions de culture

Les souches de *C. melassecola* sont cultivées en milieu riche « Brain Heart Infusion » (BHI, Difco), à une température de croissance de 34 °C et sous agitation constante de 250 tours/min. (agitateur New Brunswick).

Les souches d'*E. coli* sont cultivée à 37 °C en milieu Luria-Bertani (LB).

Les milieux solides sont identiques aux milieux liquides décrits ci-dessous et additionnés d'agar (Difco) à 15 g/l.

Les antibiotiques sont ajoutés extemporanément aux concentrations suivantes: ampicilline à 100 µg/ml, tétracycline à 10 µg/ml.

Milieu riche BHI:

infusion de cerveau de veau	15,8 g
infusion de coeur de boeuf	19,7 g
peptone	0,79 g
glucose	0,16 g
NaCl	0,39 g
NA ₂ HPO ₄	0,20 g
eau Milli-Q®	q.s.p. 1 litre
pH	7,4

Milieu LB:

bacto-tryptone	10 g
extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
NaOH 1M	1 ml
eau Mili-Q®	q.s. p. 1 litre
pH	7,4

La croissance bactérienne est suivie par mesure de la turbidité à une longueur d'onde de 570 nm au spectrophotomètre Beckman DU 7000; elle est exprimée en unités d'absorbance ou densité optique (DO₅₇₀). Pour les souches de *Corynebacterium*, 1 unité de DO₅₇₀ correspond à 400 mg de poids sec de cellules /ml ou 10⁸ U.F.C./ml.

II.2. Transformation bactérienne

La transformation bactérienne consiste à introduire des molécules d'ADN dans les cellules d'une souche réceptrice rendue compétente.

II.2.1. Préparation de cellules compétentes de *E.coli*

La croissance d'une culture de 500 ml de bactéries en phase exponentielle (DO_{600} 0,5), est arrêtée par refroidissement 20 min. dans la glace. Les cellules sont centrifugées à 6 000 g, 10min. à 4°C. Le culot est lavé avec 1 volume d'eau à 0°C, puis avec 1/2 volume d'eau et enfin 50 ml de glycérol 10% à 0°C. Entre chaque lavage, la culture est centrifugée à 6 000 g, 10 min. à 4°C. Les cellules sont enfin reprises dans 1/500^{ème} de glycérol 10% froid, aliquotées par fractions de 100 µl, qui peuvent être utilisées directement ou conservées à -80°C.

II.2.2. Electroporation

Le principe de l'électroporation est la création de pores transitoires dans la membrane des cellules compétentes par un choc électrique. Par ces pores, les molécules d'ADN peuvent pénétrer dans les cellules. L'appareil utilisé est le Gene Pulser de la société Bio-Rad associé au Gene Controller de la même marque.

Les cuves d'électroporation sont refroidies dans la glace. L'ADN est déposé dans la cuve avec 100 µl de cellules compétentes. La cuve est placée entre les électrodes et est soumise à un choc électrique (2500 V, 200 Ω, 25 µF, constante de temps de 4 à 6 ms). Les cellules sont placées dans 900 µl de LB pendant 45 min à 37°C pour l'expression de la résistance aux antibiotiques. Elles sont ensuite étalées sur un milieu sélectif incubé à 37°C.

III. Méthodes Biochimiques

III.1. Préparation des extraits cellulaires de *C. melassecola* et dosage des protéines

III.1.1. Extrait cellulaire brut

Les bactéries sont récoltées en phase exponentielle de croissance, sauf dans des expériences particulières décrites dans le chapitre Résultats et Discussion, par une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min. à 4 °C. Le culot cellulaire est lavé par du KCl 0,2% (p/v), puis mis en suspension dans le tampon d'extraction (phosphate de sodium 25 mM, pH 7,5 contenant: DNase I et RNase A à 1µg/ml et MgCl₂ à 10 mM final). Les bactéries sont cassées par trois passages successifs dans une cellule de Presse de French, à une pression de 16 000 PSI. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (10 000 g / 15 min. à 4°C), le surnageant correspond à l'extrait cellulaire brut (EB).

III.1.2. Fraction cytosoluble et fraction membranaire

A partir de l'extrait cellulaire brut, la fraction cytosoluble et la fraction membranaire de *C. melassecola* sont séparées par une ultracentrifugation à 130 000 g pendant 2 heures à 4 °C. Le surnageant correspond à la fraction cytosoluble (FS). Le culot contenant les membranes (PS) est lavé par du KCl 0,2% (p/v), puis mis en suspension dans un tampon phosphate de sodium 25 mM, pH 7,5.

III.1.3. Dosages des protéines

Les protéines sont dosées par la technique de Lowry *et al.* (1951). Le kit prêt à l'emploi utilisé a été fourni par la société Bio-Rad. La γ -globuline bovine est utilisée comme protéine étalon.

III.2. Séparation des protéines et détection d'activités enzymatiques en gel de polyacrylamide

La séparation et l'analyse des protéines s'effectuent en gel de polyacrylamide en conditions natives ou dénaturantes, selon la méthode décrite par Laemmli (1970). Les gels sont préparés à partir d'une solution d'acrylamide 30%, bisacrylamide 0,8% et d'un tampon Tri-HCl 1,5 M, pH 8,8. Les électrophorèses sont réalisées en gels verticaux d'environ 7 cm x 8 cm x 0,75 mm, dans un appareil « Mini-PROTEAN II ». Le protocole suivi est celui préconisé par la société Bio-Rad qui commercialise cet appareil.

III.2.1. Séparation des protéines en gel dénaturant

Les gels sont composés de deux parties, un gel de concentration de 1 cm (acrylamide 4%, Tris-HCl 125 mM, SDS 0,1% pH 6,8) et un gel de séparation de 5 cm (acrylamide 7,5 %, Tris-HCl 375 mM, SDS 0,1%, pH 8,8). Les échantillon sont dénaturés (95 °C, 4 min.) dans du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 6,8 contenant β -mercaptoéthanol 100 mM, SDS 4% (p/v), 30 % (v/v) de glycérol et 0,05% (p/v) de bleu de bromophénol. L'électrophorèse est conduite dans un tampon Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 % (pH 8,3) sous une tension constante de 200 V, pendant environ 45 minutes.

Après électrophorèse, les protéines sont révélées en colorant le gel dans une solution méthanol / acide acétique / eau (4:1:5, v/v) contenant 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie R250, pendant 30 minutes. Le gel est ensuite décoloré par rinçages successifs dans cette solution dépourvue de colorant, puis séché sous vide (60°C, 2 heures) sur du papier Whatman 3MM.

III.2.2. Détection d'activités enzymatiques NAD(P)H₂ dépendantes

Deux techniques de révélation d'activité enzymatique sur gel d'acrylamide (zymogrammes) en conditions non dénaturantes ont été employées. La première décrite par Schmidt *et al.* (1986) est employée dans la détection de l'activité NADH oxydase. La seconde, est employée dans la détection des enzymes du type diaphorase. Dans un premier temps, la séparation des protéines s'effectue en gel de polyacrylamide 7,5 % en conditions natives, le gel est ensuite incubé en présence d'une solution de révélation .

III.2.2.1. NADH oxydase

Le gel est incubé, sous agitation et dans l'obscurité, pendant 2 heures à 0 °C dans un tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,5, contenant INT (2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride) 0,4 mg/ml, PMS (Phénazine méthosulfate ou N-methyldibenzopyrazine methyl sulfate) 10 µg/ml et NADH₂ ou NADPH₂, 1 mg/ml. L'enzyme apparaît sous forme d'une tache blanche sur fond rouge. Le gel est photographié et/ou séché sous vide (60°C, 2 heures) sur du papier Whatman 3MM.

III.2.2.2. Diaphorase

Le gel est incubé sous agitation dans une solution contenant 1 ml de DCIP (Dichlorophénol indophénol) 10 µg/ml, 2 ml de MTT (thiazolyl blue ou 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 10 µg/ml et 10 mg de NADH₂ dans un tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,5 q.s.p. 40 ml. Les diaphorases apparaissent sous forme de taches bleu foncé sur un fond bleu. Les gels doivent être photographiés ou interprétés immédiatement, le fond devenant de plus en plus foncé avec le temps.

III.3. Dosages enzymatiques

Les dosages enzymatiques ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre DU 700 fabriqué par la société Beckmann, permettant la mesure de l'activité sur 6 cuves simultanément à un intervalle de 12 secondes entre chaque mesure d'activité d'une même cuve. L'appareil est équipé d'un système d'agitation des différentes cuves ainsi que d'un bain-marie permettant de thermostatier les échantillons tout au long des mesures d'activité enzymatique.

III.3.1. NADH oxydase, NADH déshydrogénase et NADH-DQ réductase

Les dosages quantitatifs des activités NADH oxydase (FS) et NADH déshydrogénase (PS) sont réalisés par spectrophotométrie. L'extrait enzymatique à doser est mélangé à un certain volume de tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,5 (pour les expérimentations sur les effets inhibiteurs du cyanure de sodium, un tampon phosphate de sodium à 150 mM est utilisé afin d'éviter les variations de pH possibles par l'ajout de ce composé) dans un volume final de 980 μ l. Pour le dosage de l'activité NADH-DQ réductase les conditions sont les mêmes, à l'exception de la présence de duroquinone (300 μ M concentration finale) dans le mélange tampon plus extrait. Le mélange est pré-incubé pendant 3 minutes à 37 °C, puis 20 μ l de NADH₂ 10 mM sont ajoutés. Eventuellement, NADPH₂ ou déaminoNADH₂ (dNADH₂) peuvent être utilisés au lieu de NADH₂. FAD ou du FMN peuvent être ajoutés au mélange. La concentration de ces composés est indiquée dans le texte lorsque c'est le cas. La cinétique d'oxydation du NADH₂ est déterminée par la variation d'absorbance à 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à 1 nmol de cofacteur oxydé / mg de protéine à 37°C.

III.3.2. Activité transhydrogénase

Le dosage de l'activité transhydrogénase est réalisé par spectrophotométrie à l'aide des analogues structuraux du NAD(H₂) [thionicotinamide adénine dinucléotide ou sNAD(H₂) et acetylpyridine adénine dinucléotide ou AcPyAD(H₂)] ou du NADP(H₂) [thioNADP(H₂)] dont les absorbances maximales sous la forme réduite sont détectées à des longueurs d'onde différentes de celles du NADH₂ et du NADPH₂ (375 nm pour le AcPyADH₂ avec un $\epsilon_{375} = 9,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et 398 nm pour le sNAD(P)H₂ avec un $\epsilon_{398} = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Les cinétiques sont réalisées à 37 °C dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,5. Le suivi de la cinétique est fait à 340 nm ou à deux longueurs d'onde simultanément (dont 340 nm) en fonction de l'analogue utilisé.

III.3.3. Activité lipoamide déshydrogénase

L'activité lipoamide déshydrogénase est dosée par spectrophotométrie. L'extrait enzymatique à doser est dilué dans du tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,5 contenant 400 μM d'acide lipoïque réduit et 100 μM de FAD dans un volume final de 980 μl . Le mélange est pré-incubé pendant 3 minutes à 37 °C, puis 20 μl de NADH₂ 10 mM sont ajoutés. Les cinétiques sont réalisées à 37 °C.

III.4. Estimation de la respiration cellulaire par oxygraphie

La consommation d'oxygène est mesurée par l'intermédiaire d'une électrode à oxygène. Les bactéries, en suspension (200 μg de poids sec des cellules / ml) dans un tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,5, saturé d'air, sont introduites dans une cellule de mesure dans laquelle plonge l'électrode à oxygène. La consommation d'oxygène est suivie sur un enregistreur. Les expériences sont réalisées en présence ou en absence de quantités variables

d'inhibiteurs ou de donneurs d'électrons (précisées dans le chapitre Résultats et Discussion) dans un volume final de 1,5 ml. Le matériel utilisé pour ces mesures est un Oxygraphe Gilson (modèle K-IC).

III.5. Solubilisation de particules sédimentées par ultracentrifugation

III.5.1. Solubilisation à la phospholipase A

Les particules sédimentées par ultracentrifugation (**PS**) sont resuspendues dans un tampon phosphate de sodium pH 7,5, 50 mM contenant CaCl_2 (1 mM), MgCl_2 (0,25 mM) et de la phospholipase A (0,7 unités / mg de protéine). Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 37 °C, sous agitation à 250 tours / min., suivies de 90 minutes à 4 °C.

III.5.2. Solubilisation au Triton X100 + NaCl

La fraction sédimentée (**PS**) est incubée dans un tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,5 en présence de Triton X 100, 3% (v/v) et de NaCl 10 mM pendant 15 heures à 4°C, puis centrifugée à 130 000 g. Le surnageant obtenu contient la fraction solubilisée et est soumis à des tests d'activité enzymatique (NADH oxydase), suivant le protocole décrit précédemment.

III.6. Purification de l'activité NADH oxydase des extraits cellulaires bruts

III.6.1. Préparation des extraits cellulaires bruts

Les purifications sont effectuées à partir des extraits cellulaires obtenus à partir de cultures bactériennes sur BHI. Toutes les étapes ont été réalisées à une température comprise entre 0 et 4 °C. Les bactéries sont collectées par centrifugation (6 000 g, 10 minutes) en fin de phase exponentielle de croissance. Le culot bactérien est lavé trois fois au KCl 0,2% et mis en suspension dans un tampon d'extraction Tris-HCl 50 mM pH 7,5 en présence de DNase I, de RNase A (1µg/ml) et de MgCl₂ (1 mM final), puis cassées à une pression de 16 000 PSI par trois passages successifs dans une presse de French. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation (20 000 g, 30 min.) et le surnageant est récupéré.

Les fractions actives sont identifiées par dosage de l'activité NADH oxydase avec ajout de 200 µM de NADH₂ et mesure de variation de densité optique à 340 nm, à 37 °C.

III.6.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

L'extrait cellulaire brut (16 ml à 8,2 mg de protéines / ml) est soumis à une précipitation fractionnée (0 à 80% de saturation), par addition graduelle de sulfate d'ammonium solide sous agitation. Les mélanges sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. L'activité NADH oxydase est récupérée dans la fraction qui précipite à une saturation en sulfate d'ammonium comprise entre 25 et 55%. Cette fraction est alors reprise dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

III.6.3. Chromatographie d'exclusion moléculaire

La fraction active obtenue (8 ml à 5,7 mg de protéines / ml) après précipitation au sulfate d'ammonium, est déposée sur une colonne de chromatographie d'exclusion moléculaire Toyopearl HW 65 (240 ml). Ce gel est fourni par la société Merck et son domaine de filtration est compris entre 50 000 Da et 5 000 000 Da. Les protéines sont éluées avec 300 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, à un débit de 0,5 ml/min. Les tampons utilisés dans les chromatographies sont préalablement dégazés sous vide. Des fractions de 3 ml sont collectées, celles contenant l'activité NADH oxydase sont réunies et soumises à une deuxième chromatographie.

III.6.4. Chromatographie d'échange ionique

Cette deuxième chromatographie, d'échange ionique, est réalisée à l'aide d'une résine DEAE Sephacel (Sigma), dans une colonne de 18 ml. Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de NaCl (200 ml total de 0 à 500 mM NaCl). Le débit est fixé à 0,5 ml / min. et des fractions de 2 ml sont collectées tout au long de la chromatographie.

Ces deux étapes chromatographiques ont été réalisées avec des colonnes en verre du type K (Pharmacia). L'évolution du profil protéique à 280 nm est suivi à l'aide d'un détecteur UV LKB 2158 Uvicord SD.

III.7. Purification de la lipoamide déshydrogénase des extraits cellulaires, fraction cytosoluble

La purification de la lipoamide déshydrogénase (LPDH) a été effectuée en deux étapes chromatographiques à partir de la fraction cytosoluble obtenue suivant le protocole décrit pour la préparation des extraits cellulaires (III.1.2). Toutes les étapes ont été réalisées à 4°C, à l'aide d'un système « Biologic Chromatography System » (Bio-Rad), les gels étant préparés dans des colonnes en verre du type K (Pharmacia). L'appareil utilisé permet de suivre à la fois l'évolution du profil protéique à 280 nm, et le gradient de concentration en sulfate d'ammonium

(théorique et réel) mis en oeuvre dans la chromatographie hydrophobe, par suivi de la conductimétrie en mS / cm.

Les fractions actives sont identifiées aux différentes étapes par dosage de l'activité NADH oxydase, en présence de 200 μM de NADH_2 , et de l'activité transhydrogénase de la LPDH, en présence de 200 μM de sNADH_2 et 200 μM de NAD^+ . Ces fractions sont ensuite concentrées sur des filtres Centriprep 30 (Amicon). Le contrôle de pureté et l'estimation de la taille de la protéine sont effectués par électrophorèse en conditions dénaturantes.

III.7.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire

L'extrait cellulaire soluble (FS), 4 ml à 17,5 mg de protéines / ml est déposé sur une colonne de gel filtration Toyopearl HW 65 (400 ml). Les protéines sont éluées avec 600 ml de tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,5. Le débit d'élution est fixé à 0,5 ml / min. et des fractions de 5 ml sont collectées tout au long de la chromatographie.

III.7.2. Chromatographie d'interaction hydrophobe

Les fractions actives récupérées (12 ml à 0,7 mg de protéine / ml) sont injectées dans une colonne d'interaction hydrophobe Octyl Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) préalablement équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 5 mM, pH 7,5 contenant du sulfate d'ammonium 1 M. La colonne est lavée avec le tampon ci-dessus (150 ml) à un débit de 1 ml / min., puis les protéines sont éluées au même débit, par deux gradients décroissants de sulfate d'ammonium, d'abord de 1,0 à 0,5 M (100 ml) et ensuite de 0,5 à 0 M (200 ml).

III.8. Mesures Spectrophotométriques

III.8.1. Spectres d'oxydo-réduction des membranes

La fraction membranaire (PS) a été obtenue comme décrit précédemment. Les spectres d'oxydo-réduction de cette fraction sont déterminés à basse température (77 K) à l'aide d'un spectrophotomètre Aminco DW2a. Les échantillons ont été réduits et oxydés par l'addition de dithionite de sodium et de ferricyanure de potassium respectivement.

III.8.2. Identification des accepteurs d'électrons utilisés par les enzymes de la fraction soluble

La détermination des différents accepteurs d'électrons utilisés dans la fraction soluble a été effectuée par spectrophotométrie. Les plages de longueur d'onde utilisées et les intervalles entre chaque balayage spectral sont variables en fonction des différents accepteurs d'électrons utilisés (dichlorophénol indophénol ou DCIP, 2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride ou INT, cytochrome *c*, ferricyanure de potassium) et sont indiquées lors de la présentation des résultats. Ces spectres sont réalisés dans les mêmes conditions de température et de pH que celles utilisées lors des mesures d'activité enzymatique dans un tampon phosphate de sodium 50 mM. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre DU 700 fabriqué par la société Beckmann.

IV. Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes que nous avons utilisées pour les études de Biologie Moléculaire sont décrites dans les manuels : *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1987) et *Molecular cloning, a laboratory manual* (Maniatis *et al.*, 1989).

IV.1. Extraction d'ADN génomique.

Les cellules d'une culture bactérienne de 25 ml, en phase stationnaire, sont centrifugées à 6 000 g pendant 10 min. Le culot bactérien est repris dans 5 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 25 mM pH8,5, EDTA 10 mM, 1% glucose, lysozyme 20 mg/ml). Le mélange est incubé sous agitation à 37°C pendant 1h30 et centrifugé à 6 000 g pendant 10 min. Le culot est repris dans 1 ml de tampon de lyse + 5 ml de TE/SDS 0,5% + protéinase K (20 mg/ml), puis incubé sous agitation à 37°C pendant 30 min. L'incubation est suivie de l'addition de 1 ml de NaCl 5M, de 800µl de CTAB/NaCl 10%, et nouvelle incubation à 65°C pendant 10 min. Le lysat est soumis à une extraction au phénol, deux extractions au phénol/chloroforme. L'ADN contenu dans la dernière phase aqueuse est précipité par l'ajout de deux volumes d'éthanol absolu, puis resuspendu dans H₂O et traité à la RNase (10 µg/µl) à 65°C, 30 min.

IV.2. Extraction d'ADN plasmidique de *E. coli*

Cette extraction est basée sur la méthode de Birnboim et Doly (1979). Pour cette extraction, nous utilisons des kits fournis par la société Promega, et les protocoles correspondants.

-Kit WIZARD Plus Minipreps -

La culture bactérienne de départ est de 4 ml en phase stationnaire. Le volume final d'élution est de 50 µl.

- Kit WIZARD Plus Maxipreps -

Ce kit permet de travailler à partir de volumes de culture plus importants

La culture bactérienne de départ est de 100 à 500 ml en phase stationnaire. Le volume final d'éluion est de 2 ml.

IV.3. Digestion, électrophorèse, isolement et ligature de l'ADN.

IV.3.1. Digestion de l'ADN

Les endonucléases de restriction reconnaissent et coupent des séquences spécifiques d'ADN double brin. Les recommandations du fournisseur (Boehringer ou Promega) sont suivies de sorte que l'activité des enzymes soit optimale.

IV.3.2. Electrophorèse de l'ADN

L'ADN après digestion, est soumis à une électrophorèse sur gel horizontal d'agarose 1%, en tampon TAE 0,5% + bromure d'éthidium 1 µg/ml (BET). Ceci permet de séparer des fragments d'ADN de taille différente. La migration s'effectue à 100 V pendant 20 min. La solution de charge (10 ml de TBEx1 + 3 g de PEG 6000 + 2,5 mg de Bleu de Bromophénol + 2,5 mg de Xylène Cyanol FF + 20 mg d'Orange GG), additionnée au 1/10^{ème} à la solution d'ADN permet le dépôt de l'ADN dans les puits, et le suivi de sa migration.

Le BET permet de visualiser l'ADN sous UV (256 nm). Un marqueur de taille permet d'évaluer la longueur de fragments ADN inconnus (ex: 1 kb Ladder - Promega-). Il est possible d'estimer les quantités d'ADN des fragments digérés en comparant l'intensité de fluorescence émise à une gamme témoin (ex: SmartLadder Data Sheet - Eurogentec-).

IV.3.3. Isolement et purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'électrophorèse

La purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'électrophorèse (agarose 1%) s'effectue en utilisant le kit Jetsorb Genomed (Bioprob). Le fragment d'ADN est purifié grâce à une résine d'affinité. L'élution se fait avec H₂O.

IV.3.4. Ligature de deux fragments d'ADN

Afin de faciliter la ligature entre les molécules, un rapport 1/3 entre les molarités de vecteur et de fragment à insérer est respecté.

Dans un volume total de 10 µl à 20 µl, on ajoute l'ADN à insérer, le vecteur, 2 µl de tampon de ligation (Ligasex10 Buffer, Boehringer), 1 µl de T4 DNA ligase (Boehringer), 2 µl d'une solution d'ATP 10 mM, qsp H₂O. La ligation se réalise en 12 h à 16°C.

IV.4. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Cette technique permet d'amplifier, un grand nombre de fois de l'ADN double brin à partir de deux amorces encadrant la séquence voulue.

Tous les oligonucléotides utilisés ont été choisis spécifiquement et fournis par la société Genosys. Les conditions que nous avons employées sont les suivantes :

Mélange réactionnel : 450 ng d'ADN

5 µl de tampon x 10 (Eurogentec)

4 µl de MgCl₂ 25 mM

4 µl de dNTP (650 µM)

0,5 µl d'oligonucléotides (entre 30 pmol / ml et 60 pmol / ml)

2,5 unités de Taq polymérase (Eurogentec)

H₂O qsp 50 µl

L'amplification est réalisée dans le thermocycleur Crocodile II (Appligène) avec le programme suivant :

30 cycles 1 min. à 94°C
 1 min. à 50°C
 1 min. à 72 °C

IV.5. Hybridation moléculaire

IV.5.1. Hybridation sur colonies

Cette méthode permet de repérer par hybridation ADN/ADN les clones bactériens contenant des plasmides ayant une homologie de séquence avec une sonde d'ADN radioactif.

Obtention des membranes d'hybridation

Dans un premier temps, les clones d'intérêt sont repiqués sur une membrane d'hybridation en nylon (Amersham Hybond N) posée sur une boîte de Pétri contenant le milieu de croissance correspondant à l'espèce bactérienne. Les boîtes sont incubées 1 nuit à 37°C.

Les colonies ayant poussé sur membrane d'hybridation sont traitées alors de la façon suivante:

- Fragilisation de la membrane bactérienne (SDS 10%), 2 min.
- Dénaturation de l'ADN chromosomique (NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M), 5 min.
- Neutralisation (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5/NaCl 1,5 M), 3 min.
- Lavage de la membrane (2xSSC), 20 min.
- Séchage de la membrane à 37°C
- Fixation de l'ADN sur la membrane (sous UV, 5 min.).

Hybridation et révélation

Les sondes d'ADN radioactif sont obtenues par utilisation du kit « T7 Quick Prime » de Pharmacia.

L'ADN linéaire (~25 ng) est dénaturé pendant 5 min. à 100°C. 10 ml de « Reagent Mix » (tampon de dNTP), 1 U de T7 DNA polymérase, 2 µl d' $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (10 µCi/µl), H₂O qsp 50 µl final sont ajoutés. Le marquage se fait en 15 min. à 37°C. L'ADN est précipité pour éliminer les nucléotides radioactifs libres. Dans le mélange réactionnel, on ajoute 25 µl de « Carrier » (ADN de sperme de saumon), 25 µl d'Acétate d'Ammonium 7,5M, 400 µl d'Ethanol absolu froid. On centrifuge à 13 000 g pendant 10 min. à 4°C. Le culot est repris dans de l'eau. La sonde est utilisée immédiatement ou conservée à -20°C si besoin.

Les membranes sont préhybridées pendant 1 à 2 h dans un tampon SSC x 6, Denhardt's x 5, SDS x 0,5%, à 65°C dans un four à hybridation.

La membrane est ensuite soumise à l'hybridation ADN / ADN par addition de la sonde radioactive préalablement dénaturée (5 min. à 100°C) dans la solution de préhybridation. L'hybridation se fait de nuit à 65°C en agitation douce.

Afin d'éliminer les hybrides non spécifiques, les membranes sont alors lavées successivement dans les solutions

2xSSC/0,1SDS,
0,2xSSC/0,1SDS,
0,1xSSC/0,1SDS, pendant 20 min. pour chaque.

La révélation se fait par autoradiographie. Les membranes hybridées sont mises dans une cassette avec un film autoradiographique à -80°C. Le temps d'exposition varie suivant la radioactivité présente.

Si l'on souhaite réutiliser les membranes, celles-ci peuvent être déshybridées. Les membranes sont alors traitées pendant 1h dans du tampon NaOH 0,4M à 45°C en agitation douce, puis, 30 min. dans du tampon Tris (0,2M) / SDS 0,1% / 20SSC à 45°C en agitation douce.

IV.5.2. Hybridation Southern

Cette méthode permet de repérer par hybridation ADN/ADN les fragments d'ADN plasmidiques ou chromosomiques ayant une homologie de séquence avec une sonde d'ADN radioactif.

Obtention des membranes d'hybridation

Les ADN à analyser sont dans un premier temps soumis à une digestion par les enzymes de restriction appropriés (IV.3.1.), puis soumis à une électrophorèse (IV.3.2.). L'ADN est ensuite transféré sur une membrane d'hybridation en nylon (Amersham Hybond N). Ce transfert est effectué à l'aide d'un appareil de transfert sous vide VacuGene (Pharmacia LKB). L'ADN est d'abord dénaturé pendant 5 min. par HCl 0,25 N. La neutralisation est effectuée par une solution NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M pendant 5 min., elle est suivie du transfert proprement dit, qui s'effectue par entraînement des molécules d'ADN sur la membrane dans un tampon 20xSSC, pendant 15 min. Après fixation de l'ADN sur la membrane par irradiation UV, la révélation de l'hybridation ADN / ADN suit la procédure décrite en IV.5.1.

IV.6. Détermination des séquences nucléotidiques

La détermination des séquences nucléotidiques a été réalisée par la société E.S.G.S. suivant la méthode de Sanger (1977).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Introduction: état du sujet

Au cours des dernières années, de nombreux efforts ont été fournis par les chercheurs afin de mieux connaître la distribution des flux carbonés chez les corynébactéries (Cocaign, 1992; Vallino et Stephanopoulos, 1993; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996; Rollin *et al.*, 1995; Dominguez *et al.*, 1998). Ces études ont été réalisées dans une optique fondamentale, mais également appliquée, car les connaissances acquises sur la distribution des flux carbonés peuvent être exploitées afin d'augmenter la production industrielle d'acides aminés à l'aide des techniques du génie génétique.

Chez *C. melassecola*, des études physiologiques récentes, faisant appel à des calculs de flux métaboliques, dressent un bilan entre l'énergie produite par le métabolisme et celle consommée par la biosynthèse (Cocaign, 1992, Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996). De ces études, il ressort d'une part la production d'un excès d'énergie, exprimé en équivalent NADH_2 , d'autre part, la présence d'une activité NADH oxydase dans les extraits cellulaires, semble-t-il corrélée à cet excès énergétique (Cocaign, 1992). Cet auteur suggère que l'activité NADH oxydase pourrait-être l'oeuvre d'une NADH oxydase du même type que celles retrouvées chez les bactéries lactiques, sans lien avec la production d'énergie. Cette activité serait alors essentielle à la survie du micro-organisme, car elle permettrait la régénération de cofacteurs si une situation d'excès énergétique venait à se produire *in vivo*. Les NADH oxydases sont des flavoprotéines qui, au contraire des NADH déshydrogénases des chaînes respiratoires, oxydent le NADH_2 avec l'oxygène comme accepteur direct d'électrons, sans la présence de quinones ni de cytochromes. Toutefois, chez *C. melassecola*, l'activité NADH oxydase n'a jamais été caractérisée et le rapport P/O caractérisant l'oxydation du NADH_2 par la chaîne respiratoire de ce micro-organisme n'est pas connu.

Dans ces circonstances, il nous est apparu intéressant d'amorcer une étude sur le devenir de l'excès mesuré de synthèse de NADH_2 , et sur les conséquences d'une activité NADH oxydase sur la régénération des cofacteurs chez *C. melassecola*. Cette étude peut apporter des informations essentielles à la connaissance du métabolisme global de *C. melassecola*.

II. Etude de l'activité NADH oxydase des extraits cellulaires de *Corynebacterium melassecola* : essais de purification

Dans une étude préliminaire, nous avons essayé d'isoler l'enzyme responsable, d'après Cocaign (1992), de l'activité NADH oxydase. Nous souhaitons ainsi déterminer sa structure, sa fonction, sa régulation dans un premier temps, puis procéder au clonage du gène correspondant afin d'en étudier la structure, la régulation, et d'en modifier l'expression afin d'en caractériser l'impact sur le métabolisme central de *C. melassecola*.

Les conditions de culture, de récolte et d'obtention des extraits cellulaires de *C. melassecola* ATCC 17965 ainsi que les conditions de dosage de l'activité NADH oxydase sont décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes. La Figure 10 schématise les principales étapes suivies jusqu'à l'obtention des extraits cellulaires bruts de *C. melassecola*. Ces extraits cellulaires, contiennent entre 10 et 20 mg de protéines / ml selon la préparation. L'activité NADH oxydase est déterminée par mesure de la variation de D.O. à 340 nm. L'unité enzymatique (U) est définie comme 1 nmol de NADH₂ oxydé / mg de protéine. Ainsi, l'activité NADH oxydase mesurée dans ces extraits varie entre 25 et 40 U / min. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur de celles corrélées à l'excès de NADH₂ par Cocaign (1992) et par Cocaign-Bousquet et Lindley (1995).

II.1. Détermination du pH optimal

L'influence du pH sur l'activité NADH oxydase a été analysée dans une gamme de pH comprise entre 6,5 et 9,5 (Figure 11). Le pH optimal déterminé pour l'activité NADH oxydase est de 7,5. L'utilisation d'un tampon phosphate 50 mM pH 7,5 a été retenue comme condition optimale pour mesurer l'activité NADH oxydase. Ce tampon convient également bien à l'extraction et au stockage de l'extrait cellulaire à analyser. Ce dernier peut-être stocké à -20 °C pendant plusieurs semaines sans perte significative d'activité NADH oxydase totale.

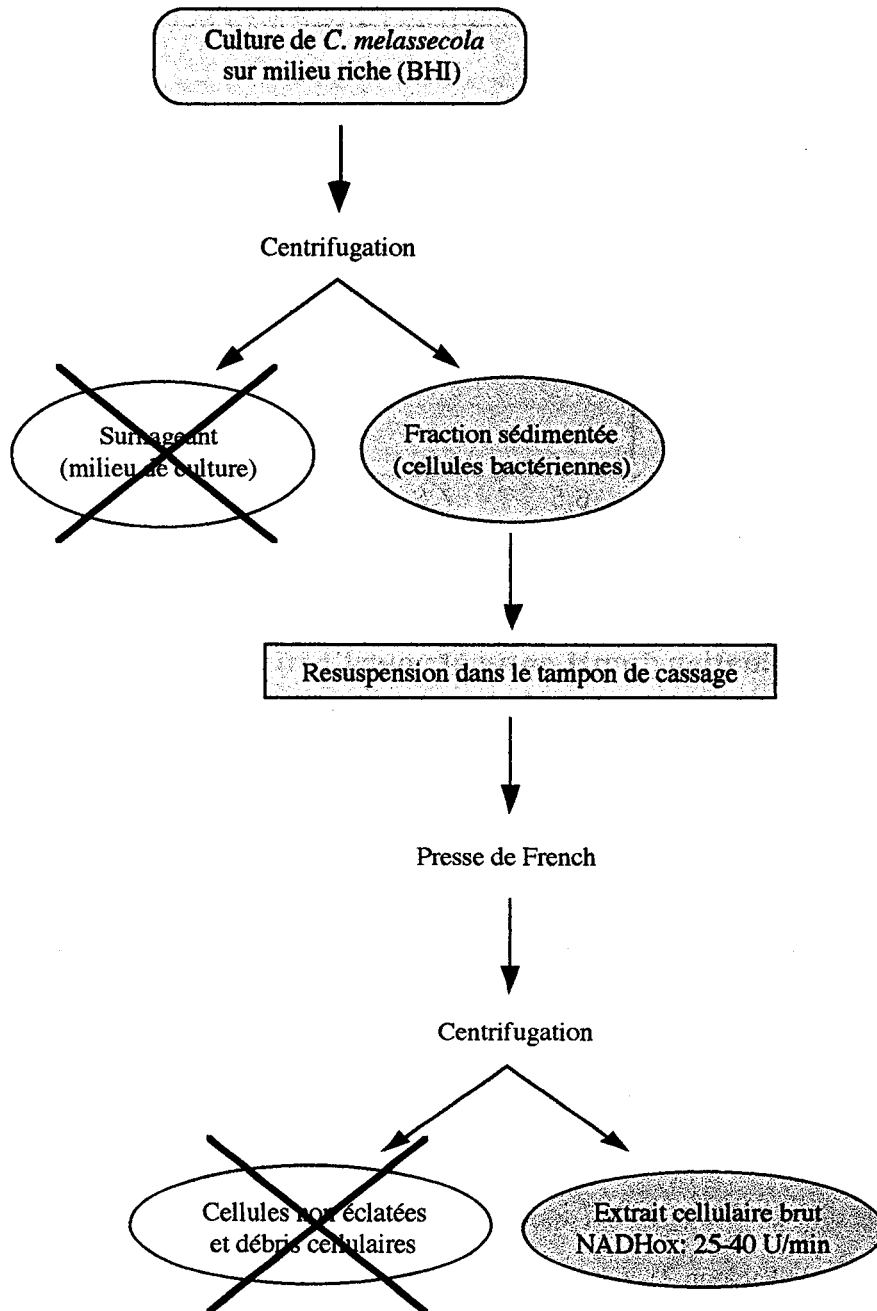


Figure 10. **Schéma d'obtention des extraits cellulaires de *Corynebacterium melassecola*.**

Une unité (U) d'activité NADH oxydase (NADHox) correspond à 1 nmol de NADH₂ oxydé / mg de protéines, à 37 °C.

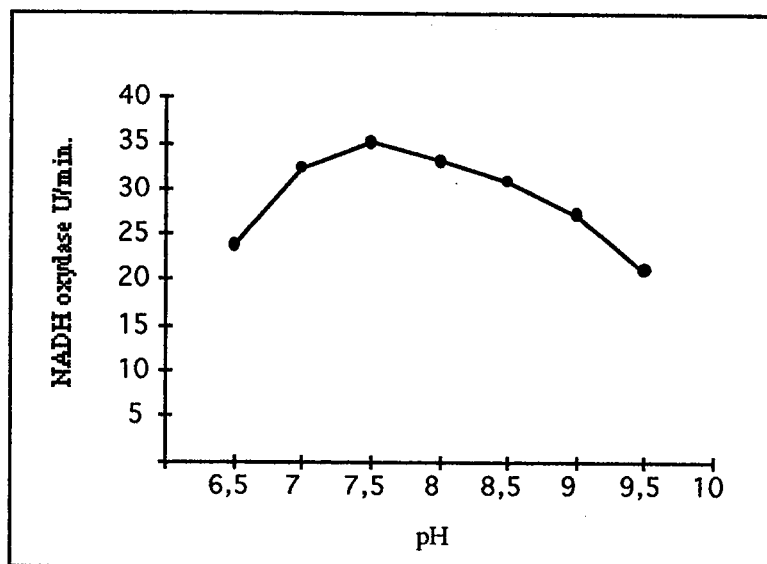


Figure 11. **Détermination du pH optimal pour l'activité NADH oxydase des extraits de *Corynebacterium melassecola***

Une unité (U) d'activité NADH oxydase correspond à 1 nmol de NADH_2 oxydé / mg de protéines, à 37 °C.

II.2. Détermination de la stabilité de l'activité NADH oxydase

Dans l'optique d'une purification de l'enzyme que nous souhaitons étudier, nous avons voulu connaître la stabilité de l'activité NADH oxydase vis-à-vis des conditions de stockage, de température et de dialyse. Nous avons donc soumis l'extrait cellulaire brut de *C. melassecola* à différents traitements (Tableau 2). Différentes substances capables de modifier l'activité NADH oxydase, et susceptibles d'apporter des informations sur la nature de l'enzyme, ont été testées. Nous avons observé ainsi que la stabilité de l'activité NADH oxydase à 0°C est satisfaisante pour de courtes périodes. A 4 °C une perte significative d'activité est observée au bout de 96 heures de conservation. Ce point est gênant, les travaux de purification, y compris les dialyses, étant normalement effectués à 4°C.

Tableau 2. Comparaison de l'effet de plusieurs traitements et substances sur l'activité NADH oxydase présente dans l'extrait cellulaire de *Corynebacterium melassecola*

	Temps ou concentration	Pourcentage d'inhibition
Incubation à 50°C	5 min.	90
Stockage à -20°C	24 h	0
Stockage à 0 °C	96 h	2
Stockage à 4°C	96 h	27
Dialyse	15 h	14

Sulfate de cuivre	3 mM	-43
Acétate de mercure	10 mM	-23
Cyanure de sodium	10 mM	40

L'activité spécifique maximale observée à 37°C, pH 7,5, est de 38,2 nmol de NADH₂ oxydé / mg de protéine / min.

Inhibition (%) = [(activité sans inhibiteur - activité avec inhibiteur) (activité sans inhibiteur)⁻¹] x 100.

La congélation à -20 °C ne semble pas affecter l'activité NADH oxydase. Au contraire, une brève incubation à 50 °C conduit à une perte de 90% de l'activité NADH oxydase. Cette inactivation thermique est probablement liée aux phénomènes de dénaturation protéique.

En ce qui concerne les différents composés chimiques utilisés (Tableau 2), on constate que l'activité NADH oxydase est très résistante au cyanure de sodium (40% d'inhibition en présence de 10 mM de NaCN), inhibiteur des oxydases terminales des chaînes respiratoires.

Des inhibiteurs (CuSO_4 et Acétate de mercure) d'enzymes possédant des groupements actifs du type SH, ont un effet positif sur l'activité NADH oxydase. Ce fait, difficile à comprendre dans le contexte, trouvera une explication dans la suite de cette étude, où l'on met en évidence une enzyme catalysant une activité diaphorase possédant des groupes actifs SH. Les diaphorases sont des enzymes capables d'utiliser le NADH_2 comme donneur d'électrons pour réduire une variété de composés chimiques ou organiques. Dans le cas précis, cette enzyme, une lipoamide déshydrogénase, est aussi capable de catalyser une transhydrogénation $\text{NADH}_2 \rightleftharpoons \text{NAD}$, qui interfère avec la mesure de l'activité NADH oxydase. L'inhibition de cette lipoamide déshydrogénase permet ainsi l'observation d'une augmentation de l'activité NADH oxydase mesurée. L'étude de la lipoamide déshydrogénase est approfondie dans la dernière partie de ce mémoire.

II.3. Purification partielle de l'activité NADH oxydase

Le protocole de purification de l'activité NADH oxydase est décrit en détails dans le chapitre Matériels et Méthodes. Dans la mise au point de ce protocole, nous avons pris en compte les résultats obtenus précédemment. Ainsi, une modification des conditions de centrifugation (20 000 g, 30 min.), a été introduite afin de mieux éliminer les débris cellulaires. Ceci s'est traduit par une baisse de l'activité NADH oxydase mesurée. Cette activité est diminuée d'environ 50% par rapport à l'activité NADH oxydase mesurée par la procédure d'extraction initiale (Figure 10). D'autre part, afin d'éviter une perte d'activité au cours de la dialyse, l'échantillon, précipité au sulfate d'ammonium, resuspendu dans le tampon d'élution, a été directement déposé sur la colonne de filtration sur gel (Figure 12A). Du passage de l'échantillon sur cette colonne, il résulte à la fois une purification partielle et un dessalage. Une deuxième chromatographie, d'échange ionique, permet de récupérer une fraction contenant 32% de l'activité totale, avec un facteur de purification de 89 (Tableau 3). Les fractions actives sont éluées de la colonne d'échange ionique lorsque le gradient de NaCl atteint la concentration de

250 mM. Cependant, ce protocole mis en oeuvre ne permet pas d'isoler une enzyme unique responsable de l'activité NADH oxydase. L'analyse électrophorétique SDS-PAGE de l'échantillon obtenu, après cette chromatographie d'échange ionique, a en effet révélé la présence de plusieurs bandes, correspondant à des polypeptides de poids moléculaire compris entre 30 et 70 KDa. Il est à noter que ces peptides semblent faire partie d'un complexe de masse moléculaire apparente très élevée, supérieure ou égale à 5 000 000 de Da. En effet, ils font partie des premiers composants à être élués du gel de filtration utilisé (Toyopearl HW 65), qui présente un domaine de filtration compris entre 50 000 et 5 000 000 Da.

Ce poids moléculaire semblant très élevé par rapport à ce qui pouvait être attendu pour une NADH oxydase du type de celles des bactéries lactiques, nous avons voulu nous assurer que la précipitation au sulfate d'ammonium n'était pas à l'origine d'un artefact. La Figure 12B représente le profil d'éluion d'un extrait cellulaire brut n'ayant pas été soumis à un fractionnement au sulfate d'ammonium. On constate que l'activité NADH oxydase est encore retrouvée dans les fractions contenant les premières molécules détectées à 280 nm en sortie de colonne. Par conséquent, l'étape de fractionnement au sulfate d'ammonium ne semble pas être à l'origine d'une aggrégation artefactuelle de protéines, parmi lesquelles serait présente la NADH oxydase. Plusieurs variations dans le protocole se sont avérées inefficaces pour l'obtention d'une protéine pure. Ainsi, la chromatographie d'affinité de colorant, connue pour son efficacité dans la purification d'un assez grand nombre de protéines ayant en commun de lier des mono- ou di-nucléotides puriques a été essayée sans succès.

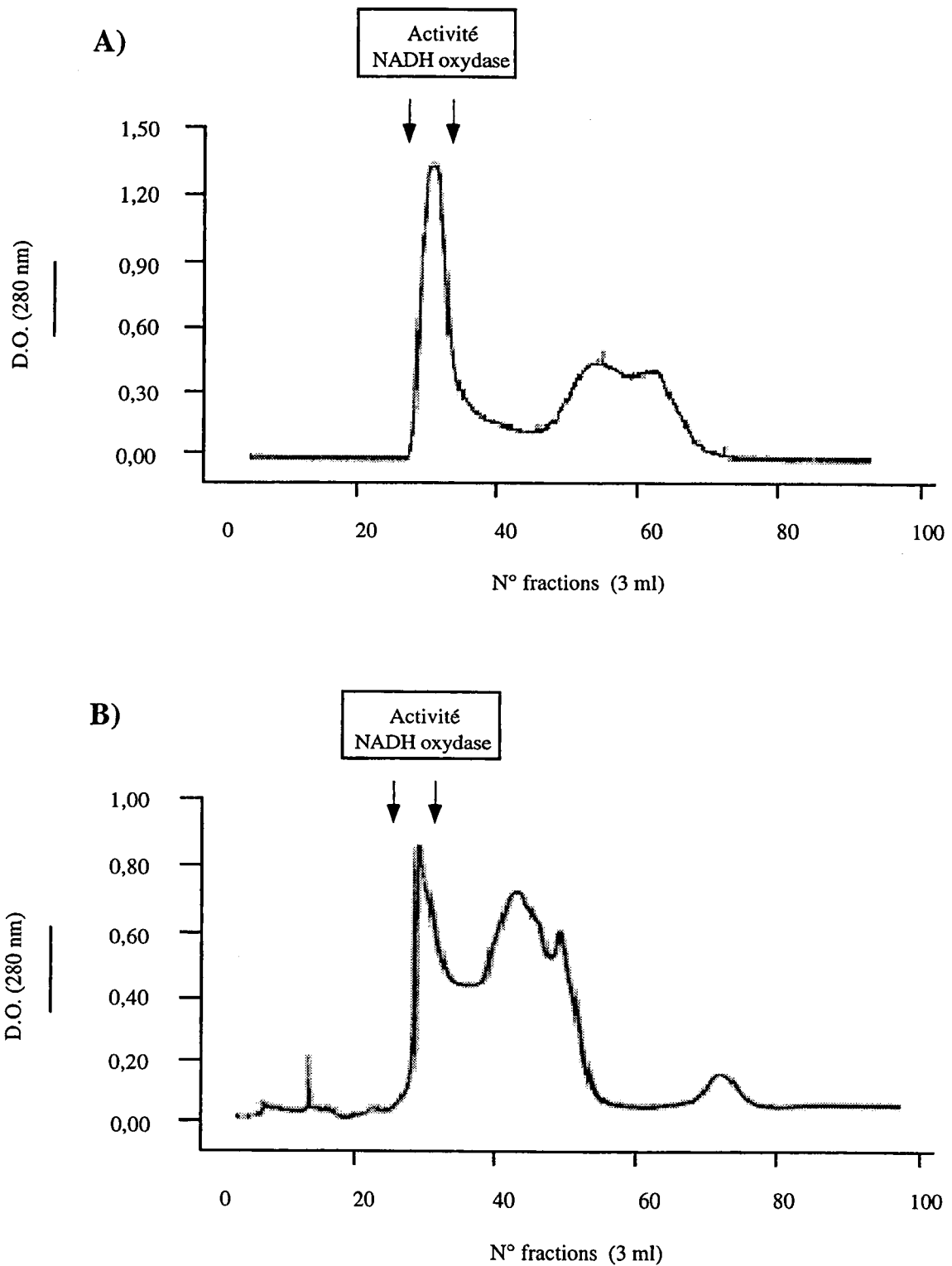


Figure 12. **Chromatographie d'exclusion moléculaire sur une colonne Toyopearl HW 65. Profil d'élution des extraits cellulaires de *Corynebacterium melassecola*. Sans (B) et avec (A) précipitation au Sulfate d'ammonium (25-55%). Les conditions de chromatographie sont décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes.**

Tableau 3. **Essai de purification de l'activité NADH oxydase de *Corynebacterium melassecola***

Etape	Protéines (mg)	*Act. spécifique (U/min.)	Activité Totale	Rendement (%)	Facteur de Purification
Extrait cellulaire brut	131	17	2.230	100	1
Précipitation 25-55% (NH ₄) ₂ SO ₄	45,6	36,7	1.673	75	2,1
Toyopearl HW 65	4,2	371	1.558	70	22
DEAE Sephacel	0,48	1.512	726	32	89

* Une unité d'activité spécifique (U) est définie comme 1 nmol de NADH₂ oxydé / mg de protéine à 37 °C, pH 7,5.

II.4. Mise au point d'un nouveau protocole d'obtention d'extraits cellulaires contenant l'activité NADH oxydase

Les premières expériences de purification de l'activité NADH oxydase nous ont amené à développer un autre procédé d'obtention d'extraits cellulaires. En raison de la taille apparente du complexe obtenu, la question de la présence dans cette fraction de composants actifs d'une chaîne respiratoire a été posée. Sachant que les chaînes respiratoires sont liées aux membranes cytoplasmiques, et que celles-ci peuvent être séparées des protéines cytosolubles par ultracentrifugation, nous avons ajouté à la procédure précédente (Figure 10), une centrifugation supplémentaire à 130 000 g pendant 2 heures (Figure 13). Cette ultracentrifugation permet de séparer deux fractions contenant une activité NADH oxydase. Après ultracentrifugation, ne reste

soluble que 10 % à peine de l'activité NADH oxydase initiale. Il apparaît alors que la fraction sédimentable continue à oxyder très activement le NADH₂. L'activité NADH oxydase de cette fraction est en moyenne de 393 (± 39) nmol de NADH₂ oxydé / mg de protéines / min. Cette valeur correspond à environ 10 fois l'activité spécifique des extraits cellulaires obtenus par le schéma d'extraction adopté initialement (Figure 10).

A partir de ces résultats nous avons adopté l'ultracentrifugation comme pratique systématique dans le traitement des extraits cellulaires bruts, ceci dans le but d'analyser chacune des fractions de manière indépendante. En tenant compte de l'ensemble des résultats obtenus au cours du travail de thèse, et pour clarifier l'exposé qui suit, les fractions obtenues après ultracentrifugation seront nommées désormais **Fraction membranaire** (sédiment d'ultracentrifugation) et **Fraction cytosoluble** (surnageant d'ultracentrifugation).

Ces deux fractions seront ainsi étudiées séparément afin de les caractériser, et d'en étudier la contribution dans l'oxydation du NADH₂ dans les extraits de *C. melassecola*.

II.5. Etude de l'activité NADH oxydase de la fraction sédimentée des extraits cellulaires de C. melassecola

Selon les résultats que nous venons d'exposer, l'activité NADH oxydase détectée chez *C. melassecola* est en majorité liée à la fraction membranaire obtenue après ultracentrifugation. Restait à savoir quelle part de cette activité peut être attribuée à des éléments actifs d'une chaîne respiratoire, et dans quelle mesure la NADH oxydase suggérée par Coccagn (1992) serait impliquée dans cette activité. Nous avons pour cela essayé d'isoler et de purifier une NADH oxydase à partir de la fraction membranaire, en utilisant différentes méthodes de solubilisation suivies de centrifugations à haute vitesse.

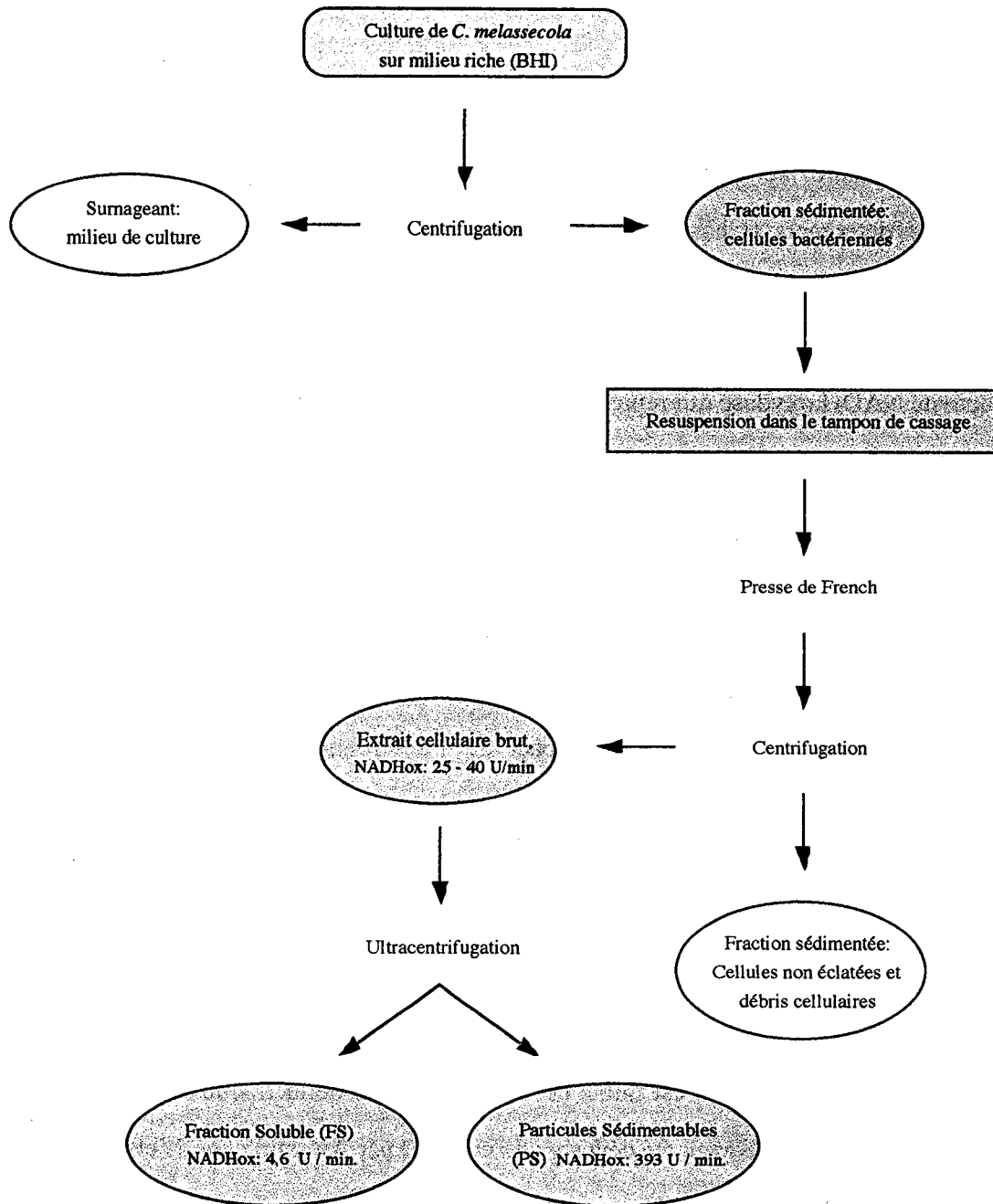


Figure 13. Schéma d'extraction et de séparation des fractions soluble et sédimentable des extraits protéiques de *Corynebacterium melassecola*.

II.5.1. Solubilisation de l'activité NADH oxydase de la fraction sédimentée (PS)

La solubilisation de l'activité NADH oxydase à partir des sédiments d'ultracentrifugation (fraction membranaire) a été entreprise avec l'utilisation de solvants organiques (éthylèneglycol, glycérol), de détergents (Chaps, Triton X100) et par voie enzymatique en utilisant la phospholipase A.

La méthode qui se révèle la plus efficace pour la solubilisation permet la récupération d'une activité NADH oxydase qui représente environ 10 fois l'activité retrouvée dans la fraction soluble (Tableau 4). Cette méthode repose sur l'utilisation simultanée de Triton X100 et de NaCl. Ceci indique l'existence d'interactions hydrophobes et ioniques, entre les protéines impliquées dans l'oxydation du NADH_2 et d'autres molécules, au sein des particules de la fraction sédimentée. On remarquera cependant que l'activité spécifique NADH oxydase mesurée dans cette expérience est 10 fois inférieure à celle mesurée sur la fraction membranaire non traitée. Ceci semble indiquer un fort impact de l'environnement physique des enzymes impliquées dans l'activité mesurée.

L'utilisation de la phospholipase A comme agent de solubilisation de la NADH oxydase de la fraction membranaire, permet de mettre en évidence une forte inhibition de cette activité après traitement.

En effet, l'activité spécifique NADH oxydase de la fraction membranaire solubilisée par traitement à la phospholipase A est faible et identique à celle de la fraction cytosoluble initiale (Tableau 4). Ce phénomène avait été déjà signalé en 1970 par Awasthi *et al.* L'effet inhibiteur de la phospholipase A a été vérifié par ces auteurs sur des préparations de membranes mitochondriales. Ils ont montré que les produits de la digestion de particules membranaires par la phospholipase A, les acides gras et les lysophospholipides, peuvent inhiber l'activité NADH déshydrogénase de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Nous avons ainsi procédé à des mesures d'activité NADH oxydase sur la fraction membranaire n'ayant pas été soumise au traitement à la phospholipase A, en présence ou en absence d'extraits contenant des produits de dégradation de la fraction membranaire par cette enzyme. Ces extraits,

traités à la phospholipase, ont été utilisés directement ou chauffés au préalable à 100 °C pendant 5 min. afin d'éliminer toute activité enzymatique résiduelle. La présence de ces extraits solubilisés à la phospholipase A dans le milieu réactionnel contenant la fraction membranaire, inhibe clairement l'activité NADH oxydase. Ceci est en accord avec les résultats d'Awasthi *et al.* (1970) et suggère que des composants de la chaîne respiratoire seraient à l'origine de la plus grande partie de l'activité NADH oxydase de la fraction membranaire.

Tableau 4. Solubilisation de l'activité NADH oxydase de *C. melassecola* présente dans la fraction membranaire

Fraction	Volume (ml)	Protéines (mg / ml)	Activité spécifique (U / min.)	Activité totale U
F. cytosoluble	15	5,9	2,7	239
F. Solubilisée par le Triton + NaCl	15	5,0	31,7	2.377,5
F. Solubilisée par la phospholipase A	15	4,0	3,2	192

Activité spécifique: 1 unité (U) correspond à 1 nmol de NADH oxydé / mg de protéine.

F. cytosoluble: Fraction de l'extrait cellulaire soluble après centrifugation à 130 000 g

F. solubilisée: Fraction membranaire solubilisée en présence de Triton X 100, 3% (V/V) + NaCl 10 mM ou en présence de phospholipase A, 0,7 unités / mg de protéine.

II.5.2. Mise en évidence d'une chaîne respiratoire dans la fraction membranaire de *C. melassecola*

Des études antérieures ont montré que la membrane cytoplasmique de *C. glutamicum* possède une chaîne respiratoire (Trutko *et al.*, 1982) capable de générer un gradient électrochimique de protons après l'ajout d'un donneur d'électrons adéquat (Bayan *et al.*, 1993; Schrempp *et al.*, 1994). Selon les résultats que nous venons d'exposer, les préparations de membranes de *C. melassecola*, obtenues par notre méthode de préparation, devraient contenir des fragments possédant des éléments d'une chaîne de transfert d'électrons encore active.

Le cyanure de sodium est un composé connu pour inhiber les oxydases terminales des chaînes respiratoires. L'inhibition partielle observée lors des essais sur les extraits cellulaires bruts après l'ajout de cyanure signalait déjà la présence possible d'un complexe membranaire de transfert d'électrons dans ces extraits (Tableau 2). Pour confirmer cela nous avons rajouté du cyanure de sodium en cours de cinétique, lors de mesures de l'activité NADH oxydase, dans un milieu réactionnel contenant la fraction membranaire obtenue (Figure 14). L'activité est instantanément réduite à moins de 20 % de l'activité originale sans la présence de cyanure de sodium.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'ultracentrifugation a permis d'isoler une fraction membranaire de *C. melassecola*, contenant des éléments encore actifs de la chaîne respiratoire.

Il est cependant remarquable que l'activité NADH oxydase, quoique fortement ralentie, ne soit pas complètement inhibée par cette dose de cyanure de sodium. Ceci est cohérent avec les observations de Schvinka *et al.* (1979) selon lesquelles, chez *B. flavum*, bactérie proche de *C. glutamicum*, grâce à la présence d'une oxydase alternative, une partie de l'activité NADH oxydase reste encore active en présence de doses de cyanure de sodium identiques à celles utilisées dans cette étude.

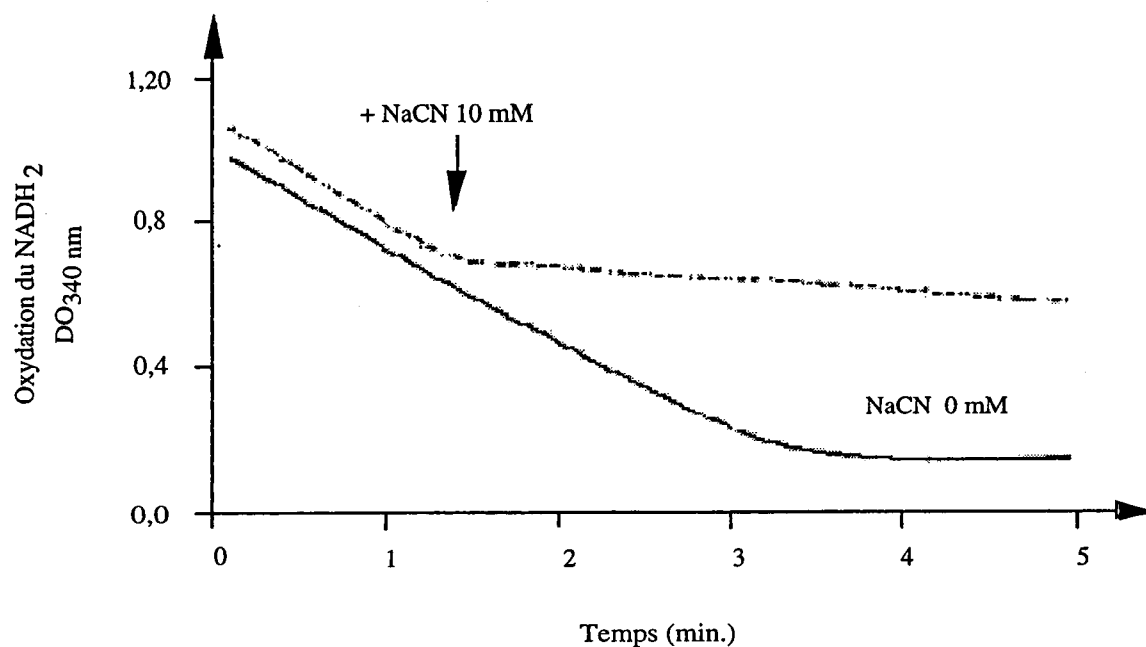


Figure 14. Effet du cyanure de sodium ajouté en cours de cinétique de mesure de l'activité NADH oxydase de la fraction membranaire de *Corynebacterium melassecola*.

Les cinétiques sont réalisées à 37 °C dans 1 ml de tampon phosphate 150 mM, pH 7,5 contenant 200 μ M de NADH₂.

III. Etude de la chaîne respiratoire de *Corynebacterium melassecola*

L'existence chez *C. melassecola* d'une chaîne respiratoire branchée, avec une NADH oxydase alternative, pouvant être l'une des solutions trouvées par la cellule en vue de régénérer ses cofacteurs oxydés, il nous a semblé intéressant de faire une étude sur le métabolisme respiratoire chez *C. melassecola* avant de continuer les essais d'isolement de la NADH oxydase.

Le rendement énergétique de l'oxydation du NADH₂ par la chaîne de transfert d'électrons est fonction de la composition de cette chaîne. La présence de voies alternatives

implique une possibilité de modification du flux d'électrons, avec par conséquence un rendement énergétique variable lors de l'oxydation du NADH_2 . D'une manière générale, une chaîne respiratoire contient diverses enzymes, cytochromes et transporteurs qui doivent être étudiés par différentes méthodes. Nous avons choisi de commencer notre étude du métabolisme énergétique de *C. melassecola* par des analyses de la respiration sur cellules entières, de manière à avoir un aperçu général de la respiration de cette bactérie en présence de différents inhibiteurs et activateurs de la chaîne respiratoire. Par la suite, des analyses plus fines sur la fraction membranaire ainsi que sur la fraction cytosoluble viendront compléter cette étude.

III.1. Mesure de la respiration des cellules entières de *C. melassecola*

La respiration de cellules entières de *C. melassecola* a été estimée par mesure des variations dans la concentration en oxygène dissous dans le tampon où les cellules sont placées à l'intérieur de la chambre de mesure de l'oxygraphe. Ceci a été réalisé en présence et en absence de différents inhibiteurs ou de donneurs d'électrons. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un oxygraphe et de son électrode de Clark comme indiqué dans le chapitre Matériels et Méthodes. En absence d'effecteurs de la chaîne respiratoire la consommation moyenne d'oxygène a été estimée à $62 (\pm 4,4)$ nmol d' O_2 / min. / mg de poids sec de cellules bactériennes.

Au niveau de la chaîne respiratoire, l'entrée des électrons se fait principalement par l'intermédiaire de deux flavoprotéines, dont l'une accepte des électrons du NADH_2 , la NADH déshydrogénase, et l'autre du succinate, la succinate déshydrogénase (Gel'man *et al.*, 1967; Anraku, 1988; Yagi, 1991; Taber, 1993). Les électrons qui proviennent de l'oxydation du NADH_2 par la NADH déshydrogénase, sont transférés sur la quinone respiratoire. La NADH déshydrogénase liée à la quinone forme un complexe désigné Complexe I, retrouvé dans la mitochondrie et aussi dans la membrane des procaryotes aérobies.

La succinate déshydrogénase de la mitochondrie forme un complexe avec l'ubiquinone, désigné comme complexe II. Bien que l'objet de cette étude soit principalement l'oxydation du NADH_2 , nous avons effectué des études préliminaires sur l'activité succinate déshydrogénase chez *C. melassecola*. La Figure 15 montre la consommation d'oxygène par les cellules entières de *C. melassecola*. L'ajout de succinate accélère la consommation d'oxygène d'un facteur 2. Ceci témoigne de la présence d'une succinate déshydrogénase liée à la chaîne respiratoire de *C. melassecola*.

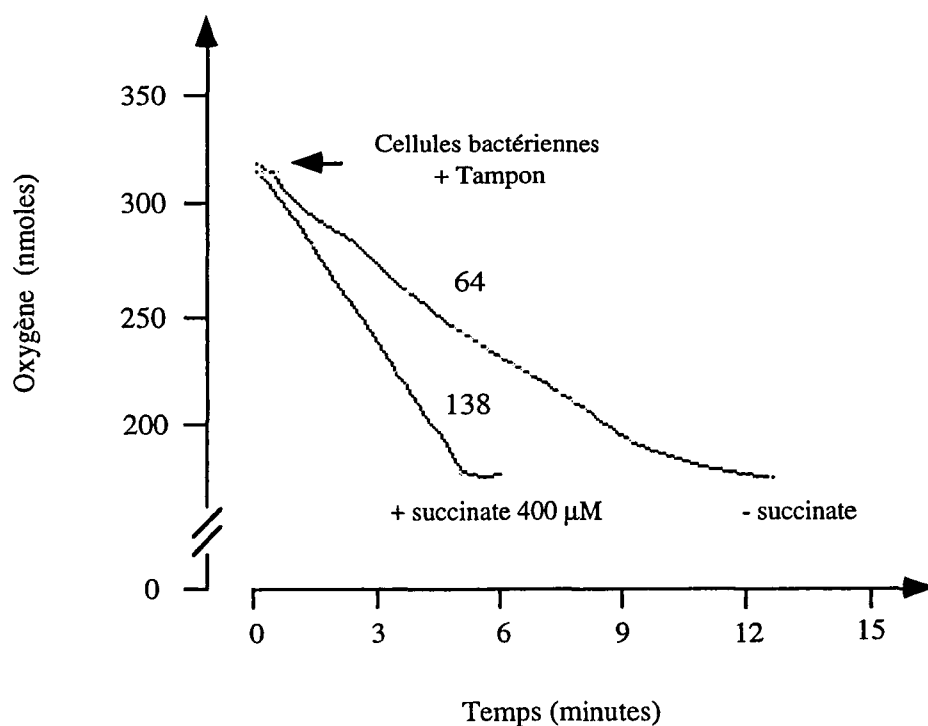


Figure 15. **Consommation d'oxygène des cellules entières de *Corynebacterium melassecola* avec et sans ajout de succinate.** Les chiffres au dessus des courbes représentent la consommation estimée d'oxygène en nmol / mg de poids sec de cellule / min.

La quinone réduite par le NADH_2 ou par le succinate, via les flavoenzymes, peut être oxydée par un transfert d'électrons directement sur l'oxygène. Chez *E. coli*, deux quinol-

oxydases catalysent cette réaction (cytochromes *bd* et *bo*) (Anraku, 1988; Minghetti *et al.*, 1992; Calhoun *et al.*, 1993). L'oxydation de la quinone respiratoire peut aussi être catalysée par un complexe quinol-cytochrome *c* réductase (complexe III), retrouvé dans les membranes mitochondriales et aussi chez certaines bactéries comme *B. subtilis* (Taber, 1993) et *P. denitrificans* (Berry et Trumpower, 1985). Le cytochrome *c* ainsi réduit sera oxydé par des oxydases terminales du type *a*, avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des différents complexes est l'une des méthodes employées dans l'analyse de la composition des chaînes respiratoires. Nous avons ainsi vérifié l'effet de différents composés connus pour leur spécificité dans l'inhibition des 3 grands complexes impliqués dans le transfert d'électrons du NADH₂ ou du TMPD jusqu'à l'oxygène (Figure 16). En plus du mixothyazol, de l'antimycine et du cyanure dont la spécificité d'action dans l'inhibition du transfert d'électrons au niveau des complexes III et IV est bien connue depuis de nombreuses années, nous avons aussi utilisé la Capsaïcine, la *p*-benzoquinone et le DCCD, dont l'effet sur le complexe I a été rapporté dans des publications plus récentes (Yagi, 1987 et 1990, Satoh *et al.*, 1996).

III.1.1. Effet des effecteurs du complexe I sur la respiration chez *C. melassecola*

Le complexe I (NADH-quinone réductase), se situe à l'entrée de la chaîne respiratoire effectuant le transfert des électrons prélevés du NADH₂ jusqu'aux cytochromes. Chez *C. melassecola* nous avons utilisé un inhibiteur du complexe I, la *p*-benzoquinone, afin de vérifier l'impact de celui-ci sur la consommation d'oxygène et d'évaluer la contribution de ce complexe à la respiration de cette bactérie. La Figure 17 présente les résultats d'inhibition obtenus par l'ajout de *p*-benzoquinone. La forte inhibition obtenue par l'utilisation de ce composé confirme la présence d'une structure proche de celle du complexe I des chaînes respiratoires connues et suggère que ce complexe joue un rôle essentiel dans la respiration de *C. melassecola*.

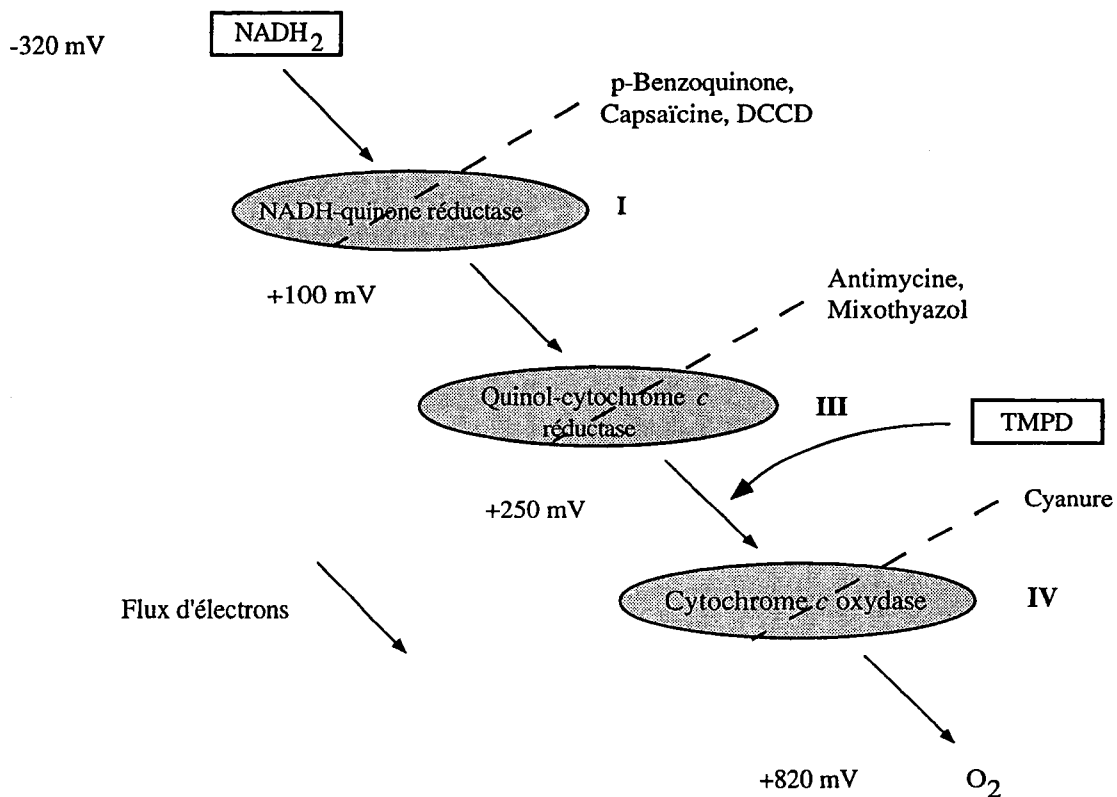


Figure 16. Sites d'action des inhibiteurs du transfert d'électrons entre le NADH_2 ou le TMPD et l'oxygène à travers une chaîne respiratoire de type mitochondriale.

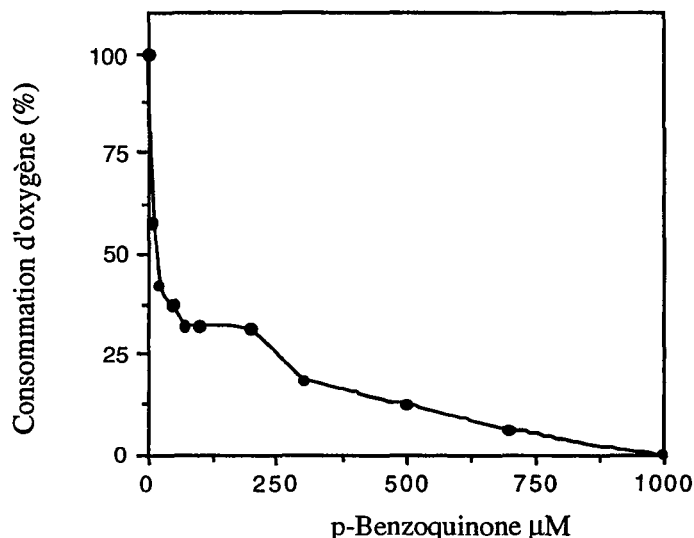


Figure 17. Effet de la *p*-benzoquinone à des doses variables sur la consommation d'oxygène de *C. melassecola*.

L'une des fonctions majeures des chaînes respiratoires est la translocation électrogénique de protons hors de la membrane cytoplasmique, qui sert à la génération d'une force protonmotrice et dirige la formation d'ATP. Au niveau du complexe I se trouve l'un des sites de translocation de protons. L'enzyme qui catalyse cette réaction est le plus souvent désignée comme NDH-1 (Xu et Yagi, 1991). Afin de vérifier si la NADH déshydrogénase présente dans ce complexe chez *C. melassecola*, est liée à un site de couplage énergétique, nous avons testé l'effet de la capsaïcine sur l'activité respiratoire de ce micro-organisme (Figure 18). Ce composé est connu pour inhiber de manière spécifique la NDH-1 qui catalyse à la fois un transfert d'électrons du NADH₂ vers la quinone et une translocation de protons (Shimomura *et al.*, 1989; Yagi, 1990). L'inhibition de la respiration observée chez *C. melassecola* est, par conséquent, le signe de la présence d'une NADH déshydrogénase du type NDH-1, liée à un site de couplage énergétique. Cependant, l'inhibition de la respiration mise en évidence est partielle, signe de la présence d'une enzyme insensible à ce composé dans la chaîne de transfert d'électrons de *C. melassecola*, ou simplement le fait que ce composé ne soit pas adapté à l'analyse sur cellules bactériennes entières. En effet, à notre connaissance, les travaux publiés avec cet inhibiteur

n'ont été effectués que sur des fractions membranaires ou des particules mitochondriales isolées (Shimomura *et al.*, 1989; Yagi, 1990; Satoh *et al.*, 1996). Nous reviendrons sur l'analyse du complexe I dans les parties suivantes de ce mémoire, lors de l'analyse des fractions soluble et membranaire de nos extraits cellulaires.

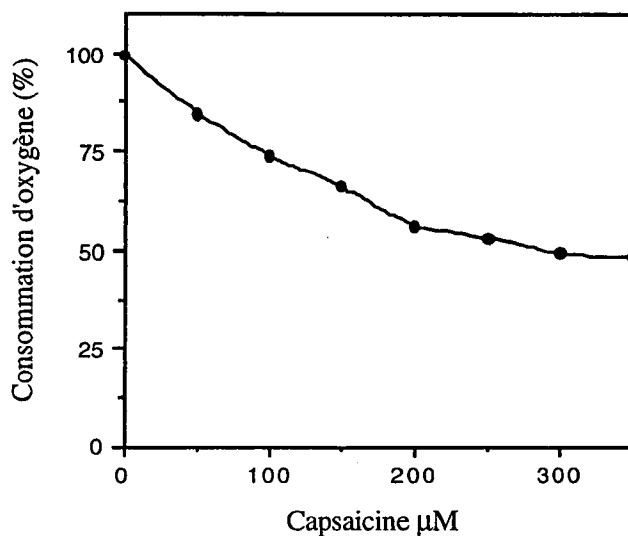


Figure 18. Effet de la Capsaïcine à des doses variables sur la consommation d'oxygène de *Corynebacterium melassecola*.

III.1.2. Effet des effecteurs du complexe III sur la respiration chez *C. melassecola*

L'antimycine A est un fort inhibiteur des chaînes respiratoires possédant un complexe III (quinol-cytochrome *c* réductase), le plus souvent désigné comme complexe *bc1*. La chaîne respiratoire mitochondriale possède un complexe *bc1* et est inhibée par des concentrations d'antimycine A de l'ordre 10^{-9} M, tandis que chez les bactéries il faut une concentration beaucoup plus élevée, qui peut atteindre des valeurs jusqu'à 10^{-3} M (Gel'man *et al.*, 1967). La

consommation d'oxygène mesurée chez *C. melassecola* est inhibée progressivement par l'ajout d'antimycine A (Figure 19). L'inhibition maximale est observée à 40 μM d'antimycine A .

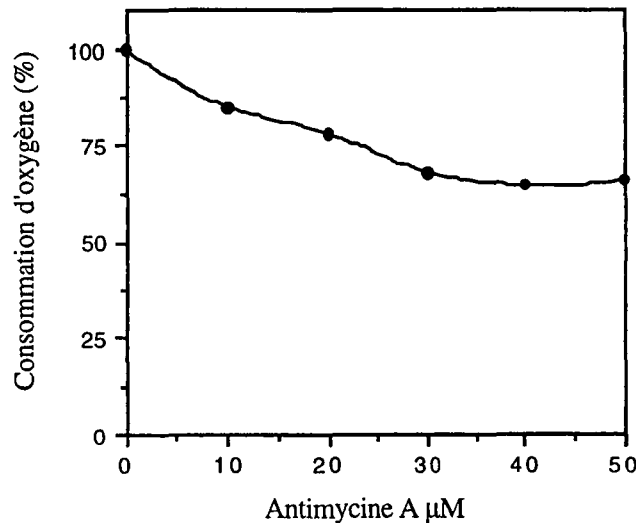


Figure 19. Effet de l'antimycine à des doses variables sur la consommation d'oxygène de *Corynebacterium melassecola*.

Bien que partielle, cette inhibition suggère la présence chez *C. melassecola* d'une structure semblable au complexe *bcI* (quinol-cytochrome *c* réductase). Néanmoins, en raison de l'activité résiduelle en présence de cet inhibiteur, la présence d'une voie alternative, capable de garantir le fonctionnement de la chaîne lorsque les conditions physiologiques l'imposent, ou lorsqu'il y a impossibilité de transfert des électrons par la voie *bcI*, est envisageable. Ceci est cohérent avec l'hypothèse d'une voie alternative d'oxydation du NADH_2 chez *C. melassecola*. En effet, les voies secondaires du type de celle du cytochrome *o* sont pratiquement universelles chez les bactéries qui ont un complexe *bcI* (Anraku, 1988).

Dans une deuxième expérience, le taux de respiration des cellules de *C. melassecola* a été réduit à 60% du taux normal par la présence d'antimycine A (Figure 20). Les valeurs

d'inhibition sont comparables à celles obtenues précédemment. L'ajout de TMPD, donneur d'électrons en aval du complexe *bcl* inhibé, restaure ce taux à un niveau proche de celui observé avant l'ajout de l'inhibiteur.

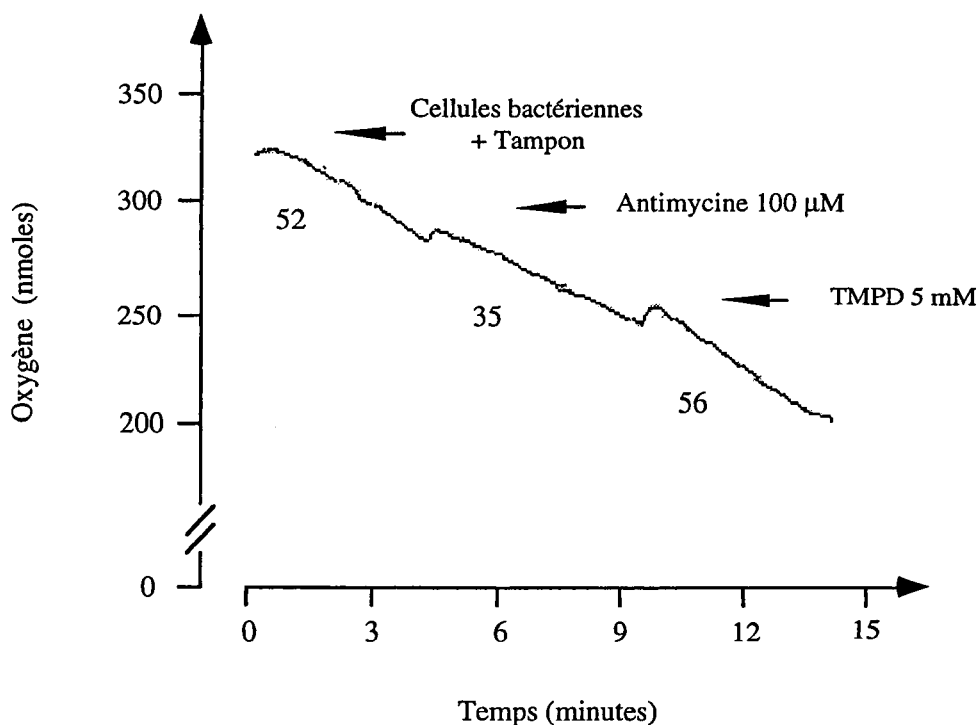


Figure 20. Effet de l'antimycine et du TMPD sur la consommation d'O₂ par des cellules entières de *Corynebacterium melassecola*. Les chiffres sur les courbes représentent la consommation estimée d'oxygène en nmol / mg de poids sec de cellule / min.

D'une part, ceci renforce l'hypothèse de la présence d'une cytochrome *c* oxydase, car les oxydases alternatives du type quinol oxydase ne sont pas sensées d'oxyder le TMPD (Sakamoto *et al.*, 1996). D'autre part, ces résultats confirment que la cible de l'inhibition provoquée par l'antimycine A se situe en amont du cytochrome *c*, probablement un complexe cytochrome *c* réductase du type *bcl*.

III.1.3. Effet des effecteurs du complexe IV sur la respiration chez *C. melassecola*

Nous avons choisi le TMPD, donneur d'électrons au niveau du cytochrome *c*, ainsi que le cyanure de sodium (NaCN), inhibiteur des cytochromes *c* oxydases, pour analyser la contribution des oxydases terminales de la chaîne respiratoire à la consommation d'oxygène par les cellules entières de *C. melassecola*. En effet, si l'on considère que la consommation en oxygène est limitée par le flux d'électrons à l'entrée de la chaîne respiratoire, l'ajout d'un donneur d'électrons comme le TMPD aura un effet accélérateur de cette consommation d'O₂. Ceci est lié à la présence d'une activité TMPD oxydase. L'activité TMPD oxydase peut être catalysée par la même oxydase terminale que celle qui catalyse l'oxydation du cytochrome *c*, car le TMPD possède un potentiel rédox ($E^{\circ} = +260$ mV) proche de celui du cytochrome *c* ($E^{\circ} = +250$ mV) (Mueller et Taber, 1989). La Figure 21 présente un oxygramme qui montre une accélération notable de la consommation d'oxygène par l'ajout du TMPD. Ceci suggère la présence d'une oxydase terminale du type cytochrome *c* oxydase. Toutefois, une faible dose de cyanure (50 μ M) suffit à annuler 80% de cet effet. Ceci suggère que l'oxydase terminale responsable de l'oxydation du TMPD est du type *aa3* ou *caa3*, sensible aux faibles doses de cyanure. Néanmoins, les résultats obtenus sur l'inhibition de la consommation d'oxygène par les cellules entières de *C. melassecola*, par l'ajout de doses croissantes de cyanure, montrent la présence d'une activité respiratoire très résistante à cet inhibiteur (Figure 22). Ces résultats renforcent l'hypothèse émise dans la partie précédente, c'est-à-dire de la présence d'une oxydase autre que celle du type cytochrome *c* oxydase.

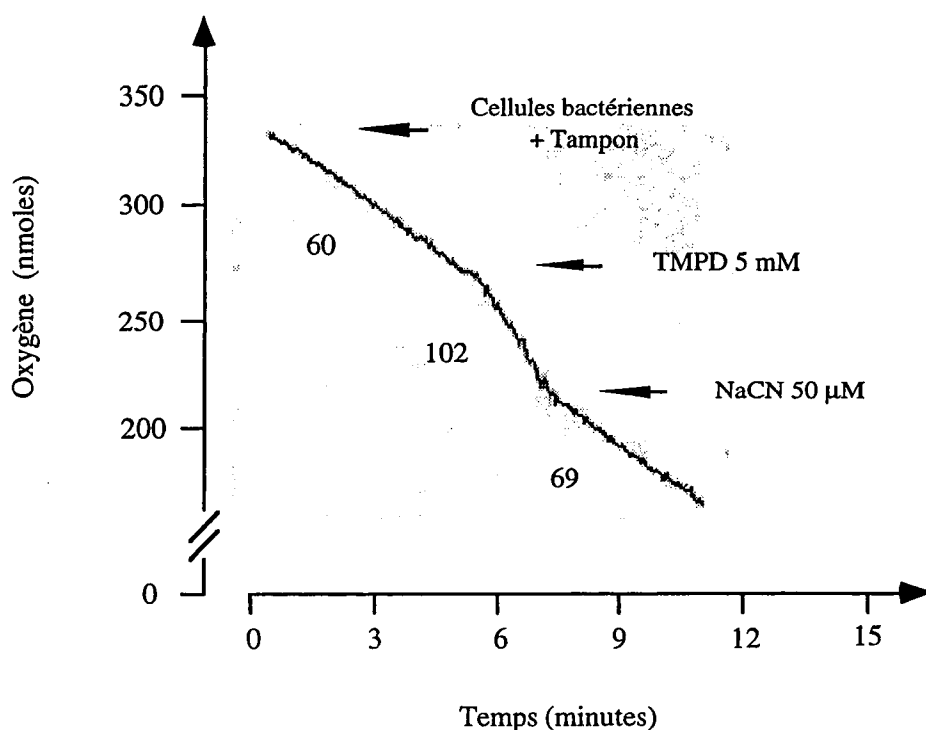


Figure 21. **Effet du TMPD et du Cyanure de sodium sur la consommation d'O₂ par les cellules entières de *Corynebacterium melassecola*.**
Les chiffres au dessous des courbes représentent la consommation estimée d'oxygène en nmol / mg de poids sec de cellule / min.

L'inhibition maximale est atteinte à 1,3 mM de cyanure de sodium et l'IC₅₀ déterminée est de 265 µM (Figure 22). Ces doses de cyanure de sodium sont très élevées en comparaison de celles nécessaires à l'inhibition complète de l'oxydase terminale (cytochrome *c* oxydase) de la mitochondrie par exemple. L'existence de deux oxydases terminales pourrait expliquer ces résultats apparemment contradictoires vis-à-vis de l'inhibition par le cyanure. La coexistence de deux oxydases terminales, *aa3* et *o*, a été mise en évidence chez *P. denitrificans* et *B. subtilis* (van Versenveld *et al.*, 1978; de Vrij *et al.*, 1987). La voie du cytochrome *o* est généralement moins sensible à l'inhibition par le cyanure. Cette voie fonctionnerait comme une quinol-oxydase, avec un potentiel rédox plus négatif que celui du TMPD, ce qui empêche l'oxydation de ce dernier par cette oxydase terminale. Quand cette voie est active, les électrons ne passent

pas par le complexe *bcl*, l'un des sites de translocation de protons, le rendement énergétique devant ainsi être moindre.

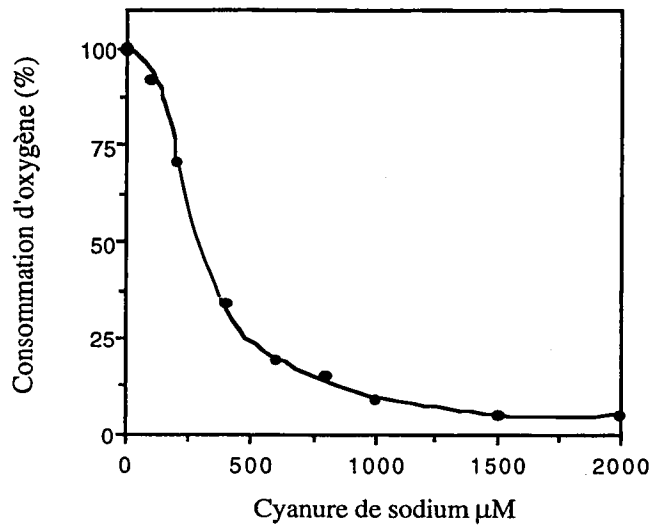


Figure 22. Effet du cyanure de sodium à des doses variables sur la consommation d'oxygène de *Corynebacterium melassecola*.

III.2. Etude de l'oxydation du NADH_2 par les composés de la fraction membranaire de *C. melassecola*

Dans cette étude, nous avons montré que l'oxydation du NADH_2 observée dans les extraits cellulaires de *C. melassecola* est principalement (environ 90%) accomplie par des particules sédimentables par ultracentrifugation (fraction membranaire). Cette activité, estimée par la mesure de disparition du NADH_2 à 340 nm, correspond à 393 U/min. Les résultats obtenus dans la partie précédente, lors de nos études sur la respiration de *C. melassecola*,

laissent présager de la présence de complexes semblables à ceux impliqués dans l'oxydation du NADH_2 par une chaîne respiratoire. Ces complexes, I (NADH-quinone réductase), III (quinol-cytochrome *c* réductase) et IV (cytochrome *c* oxydase), sont connus pour générer un transport de protons. Un flux d'électrons passant par les trois complexes pourrait alors donner un rendement énergétique maximal comparable à celui de la mitochondrie (3 ATP par molécule de NADH_2 oxydée). De plus, la présence du complexe II impliquant la succinate déshydrogénase a été démontré. Ces complexes sont retrouvés tant sur la membrane mitochondriale des cellules eucaryotes, que sur la membrane cytoplasmique de certaines corynébactéries comme *B. flavum* (Schvinka *et al.*, 1979). Cependant, chez *C. melassecola*, nous avons observé une remarquable résistance au cyanure de sodium d'une part et une inhibition partielle par l'antimycine A et par la capsaïcine de l'autre. Ces résultats suggèrent la présence de voies alternatives capables de fonctionner en présence de ces inhibiteurs, par conséquent le rendement énergétique obtenu par l'oxydation d'une molécule de NADH_2 pourrait être variable en fonction de la voie d'oxydation empruntée. Pour vérifier si la chaîne respiratoire détectée dans la fraction membranaire présente les mêmes caractéristiques que celles observées sur les cellules entières et confirmer l'existence des différents complexes respiratoires, ainsi que des voie alternatives, nous avons entrepris l'analyse de l'oxydation du NADH_2 par la fraction sédimentée (fraction membranaire), après l'ultracentrifugation des extraits bruts de *C. melassecola*. Afin d'éviter des ambiguïtés d'appellation entre l'activité NADH oxydase alternative recherchée initialement, et celle attribuée à l'ensemble des composés présents dans la fraction membranaire, que nous allons maintenant analyser, nous considérerons d'ores et déjà que la majorité du NADH_2 oxydé par cette fraction est initialement pris en charge par une NADH déshydrogénase. Ainsi, dans l'analyse de la fraction membranaire nous parlerons de NADH déshydrogénase et non plus de NADH oxydase. L'oxydation du NADH_2 est suivie par mesure d'absorbance à 340 nm en présence ou non d'inhibiteurs. L'influence du pH sur l'oxydation du NADH_2 par la fraction membranaire a été analysée en utilisant différents tampons sur une gamme de pH comprise entre 6,0 et 8,5 (Figure 23). L'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire présente une tolérance assez large vis-à-vis du pH, puisqu'une activité supérieure à 80% de l'activité maximale est maintenue sur une plage de 2,5 unités de pH. De cette manière nous avons gardé

les mêmes conditions de dosage que celles utilisées précédemment, c'est-à dire l'utilisation d'un tampon phosphate à pH 7,5.

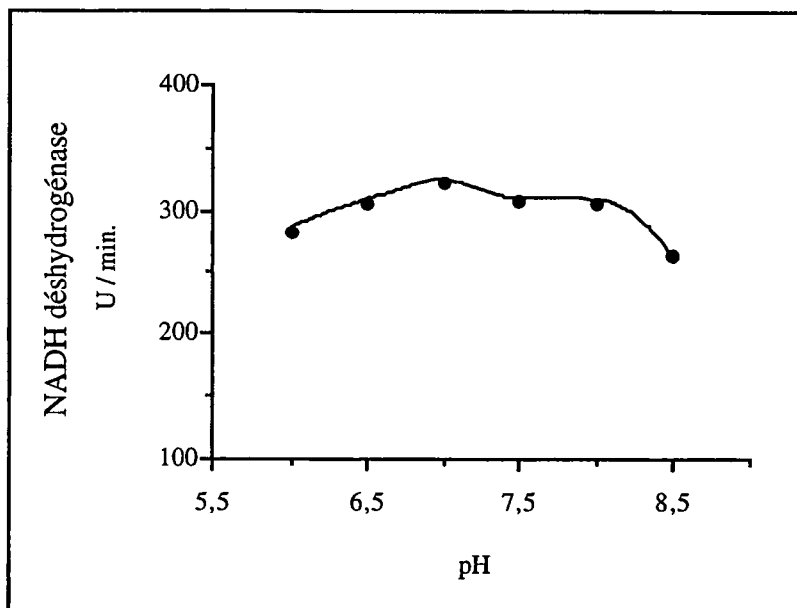


Figure 23. Détermination du pH optimal pour la mesure de l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire de *Corynebacterium melassecola*.

Une unité (U) d'activité NADH déshydrogénase correspond à 1 nmol de NADH₂ oxydé / mg de protéines, à 37 °C.

III.2.1. Confirmation de la présence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle dans la fraction membranaire des extraits de *C. melassecola*

De même que sur les cellules entières, l'activité NADH déshydrogénase mesurée dans cette fraction est sensible à l'inhibiteur du complexe IV, le cyanure de sodium, ainsi qu'aux inhibiteurs des complexes I et III, la capsaïcine et l'antimycine A (Tableau 5). La Tableau 5 indique les concentrations nécessaires pour atteindre 50% de l'inhibition maximale observée lors

d'essais sur la respiration de cellules entières, ainsi que lors de mesures de l'activité NADH déshydrogénase de la fraction sédimentée. Ces résultats sont comparables pour les deux préparations ce qui confirme la présence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle dans la fraction membranaire obtenue après l'ultracentrifugation des extraits bruts des cellules de *C. melassecola*. Fait notable, la tendance à la baisse des IC_{50} sur la respiration par rapport à l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire. Ceci est peut-être le signe que, dans ces conditions de dosage, même si l'oxygène est l'accepteur majeur de ces oxydations, il n'est pas le seul. Ainsi, on pourrait attribuer cette baisse des IC_{50} à la présence dans la fraction membranaire d'enzymes contaminantes du type diaphorase. Les diaphorases sont des flavoenzymes (White *et al.*, 1968) capables d'accepter des électrons du $NADH_2$ pour réduire une large gamme de composés chimiques (DCIP, INT, MTT, Ferricyanure) ou organiques (glutathion, cytochrome *c*, acide lipoïque). De cette manière, une partie de la voie d'oxydation du $NADH_2$ observée dans la fraction membranaire n'aurait pas l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et ne serait pas inhibée par les inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires. D'autre part, la respiration étant estimée directement par mesure de la consommation d'oxygène, l'activité de ces enzymes n'interfère pas. Par conséquent, les inhibitions observées sur les cellules entières reflètent mieux les interactions entre les inhibiteurs et les différents complexes que celles observées sur des fractions membranaires pouvant être contaminées par des enzymes capables d'oxyder le $NADH_2$ en présence d'autres accepteurs que l'oxygène. Ce type d'enzyme pourrait ainsi être à l'origine d'au moins une partie de l'oxydation du $NADH_2$ dans les extraits cellulaires. Nous reparlerons des diaphorases lors des études de l'oxydation du $NADH_2$ catalysée par les enzymes présentes dans la fraction cytosoluble.

Tableau 5. Constantes d'inhibition (IC₅₀) de la Capsaïcine, Antimycine A et NaCN sur l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire et sur la respiration de *Corynebacterium melassecola*:

	Capsaïcine μM	Antimycine A μM	NaCN μM
Activité NADH déshydrogénase (f. membranaire)	73	27	400
Consommation d'oxygène (cellules entières)	78	8	265

Inhibition = [(activité sans inhibiteur - activité avec inhibiteur) x (activité sans inhibiteur)⁻¹] x 100

IC₅₀ = concentration en inhibiteur provoquant 50% de l'inhibition maximale observée.

Au préalable, nous avons essayé d'identifier les composants des différents complexes de la chaîne respiratoire présents dans la fraction membranaire. Ceci a été effectué avec l'utilisation d'inhibiteurs et d'activateurs (donneurs d'électrons) spécifiques aux différents complexes, ainsi que par analyse spectrophotométrique de la fraction membranaire. Ces expériences doivent permettre de confirmer que les inhibitions partielles observées lors des essais sur cellules entières ne sont pas le fruit d'artefacts dus à une difficulté d'accès de ces inhibiteurs à leurs cibles à l'intérieur des cellules entières. Par conséquent, les résultats de ces expériences doivent apporter des éléments nouveaux pour l'analyse des complexes et des voies alternatives détectés lors des études de la respiration des cellules entières.

III.2.2. Etude du Complexe I de la chaîne respiratoire de *C. melassecola*

L'oxydation du NADH_2 par la chaîne respiratoire est catalysée par la NADH déshydrogénase qui canalise les électrons vers la quinone. Le NADPH_2 n'est oxydé que très faiblement (Figure 24), en moyenne $6,7 (\pm 1,8)$ U/min, contre $393 (\pm 39,0)$ U/min. pour l'oxydation du NADH_2 . Chez la mitochondrie, ce système enzymatique, désigné Complexe I, catalyse à la fois le transfert d'électrons vers l'ubiquinone et la translocation des protons vers la

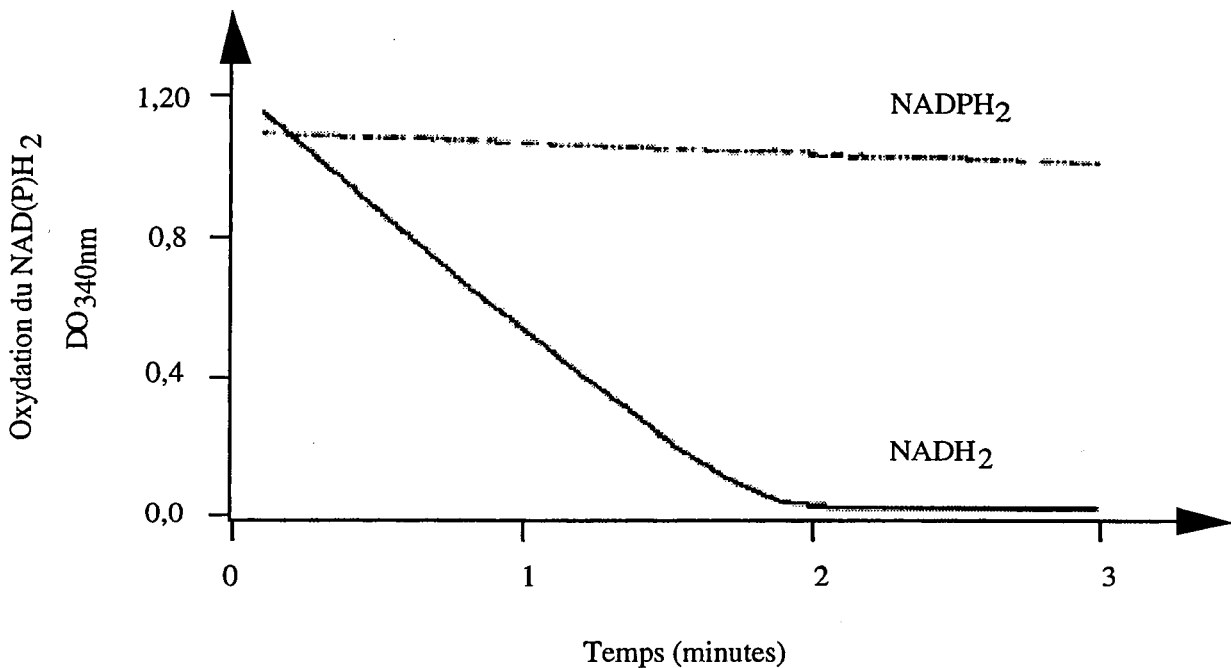


Figure 24. **Cinétique d'oxydation du NADH_2 et du NADPH_2 par la fraction membranaire de *Corynebacterium melassecola*.**

Les cinétiques sont réalisées à 37°C dans 1 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 contenant $200\ \mu\text{M}$ de NADH_2 ou NADPH_2 .

face externe de la membrane. C'est donc un site de couplage énergétique. Chez *C. melassecola*, nous avons vérifié l'effet d'un inhibiteur du transport de protons à travers la membrane sur l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire, le DCCD. Le profil d'inhibition

obtenu par les ajouts de DCCD (Figure 25), indique une forte inhibition par ce composé. Ce profil est à rapprocher de celui de l'inhibition de la consommation d'oxygène des cellules entières par la *p*-benzoquinone (Figure 17), inhibiteur du Complexe I. Des résultats comparables ont été obtenus par Schrempp *et al.* (1994). Après l'ajout de DCCD, ces auteurs ont constaté un ralentissement de la consommation d'oxygène sur une préparation de vésicules membranaires inversées de *C. melassecola*. Cependant, ce ralentissement ne serait pas dû à un contrôle respiratoire, l'ajout de CCCP ne rétablissant pas le taux respiratoire observé sans DCCD. Les auteurs attribuent ce ralentissement à l'interaction du DCCD avec un composant de la chaîne respiratoire. Yagi (1987), a également montré que le transport de protons ainsi que l'activité NADH-quinone réductase sont inhibés en parallèle par le DCCD.

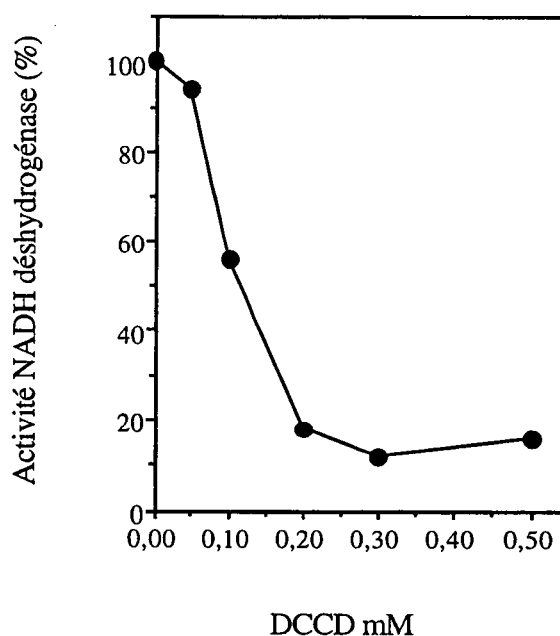


Figure 25. Inhibition de l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire de *Corynebacterium melassecola* par des ajouts croissants de DCCD.

Lors de l'étude de l'impact des effecteurs du complexe I sur la respiration de *C. melassecola*, une inhibition partielle par l'ajout de Capsaïcine, un inhibiteur des NDH-1, a été remarquée. Une courbe d'inhibition proche de celle déjà observée sur les cellules entières a été obtenue pour l'activité NADH déshydrogénase de la fraction membranaire (Figure 26). D'une

part, ces résultats signalent l'intégrité du complexe I présent dans la fraction membranaire par comparaison avec les inhibitions observées sur les cellules entières. D'autre part, ils valident les conclusions tirées de l'étude des effets inhibiteurs de la capsaïcine sur cellules entières. Cette inhibition, encore que partielle, est alors imputée à la présence d'une NADH déshydrogénase du type 1 (NDH-1), liée à un site de couplage énergétique. Toutefois, la présence d'une activité résiduelle non négligeable, environ 50% de l'activité totale sans inhibiteur, semble confirmer la présence d'une deuxième NADH déshydrogénase. Selon Yagi (1991), l'enzyme insensible à l'inhibition par la capsaïcine est une NADH déshydrogénase du type 2 (NDH-2), sans liaison avec le transport de protons. Chez certaines bactéries, la présence de ces deux types de NADH déshydrogénases à l'entrée de la chaîne respiratoire a été démontrée (Matsushita *et al.*, 1987; Yagi *et al.*, 1988).

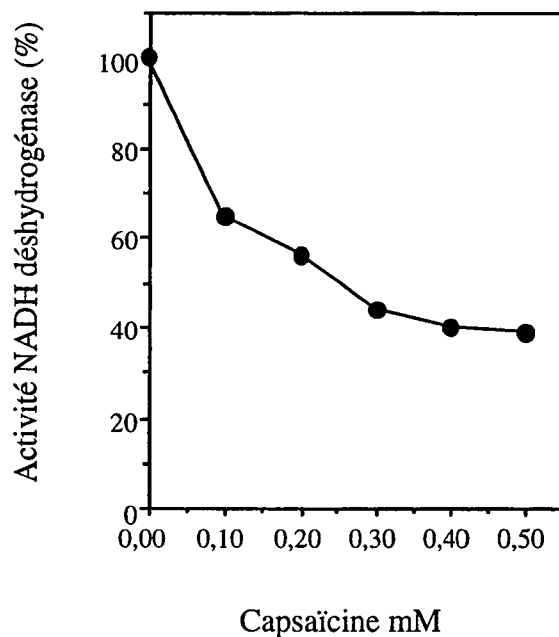


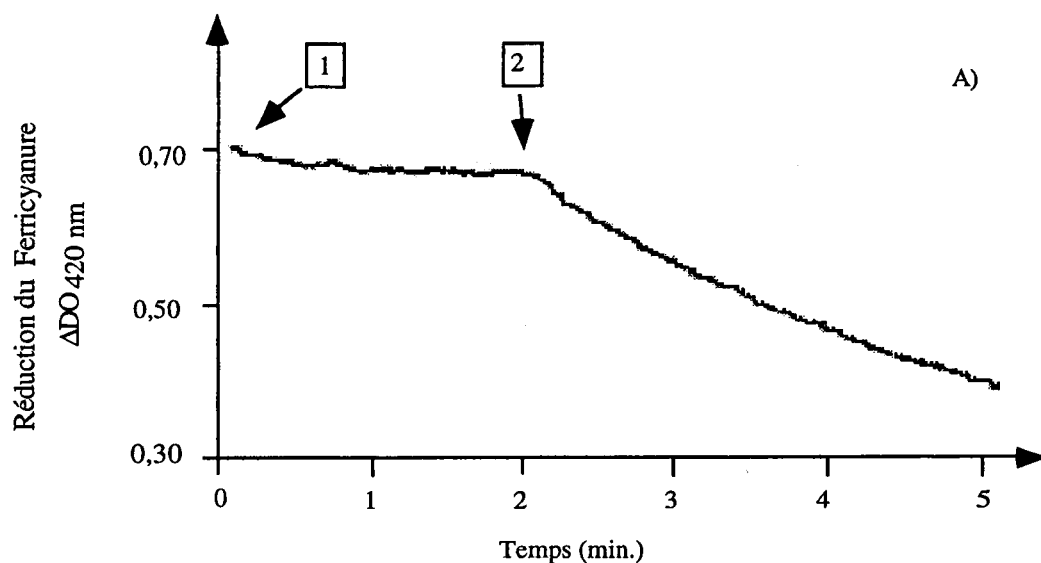
Figure 26. **Inhibition de l'activité NADH déshydrogénase des membranes de *Corynebacterium melassecola* par des ajouts croissants de Capsaïcine.**

Dans ce cas, NDH-1 est liée à un site de couplage énergétique, NDH-2 ne semblant pas participer à la formation d'énergie. Chez *E. coli*, le degré de couplage de la chaîne respiratoire, traduit par le rapport H^+/e^- ou par le rapport ATP/O, est dépendant du partage du flux d'électrons

entre les deux déshydrogénases (NDH-1 et NDH-2) et entre les deux oxidasas terminales (types *bo* et *bd*) (Calhoun *et al.*, 1993). La présence d'une NADH déshydrogénase du type NDH-2 chez *C. melassecola*, correspondrait ainsi à l'existence d'une branche non énergétique potentielle, participant au métabolisme respiratoire de ce micro-organisme. D'autres éléments de discussion concernant l'existence de NDH-2, seront apportés par les études menées sur la fraction soluble des extraits cellulaires de *C. melassecola*. Auparavant, nous allons continuer l'étude de la chaîne respiratoire retrouvée dans la fraction membranaire.

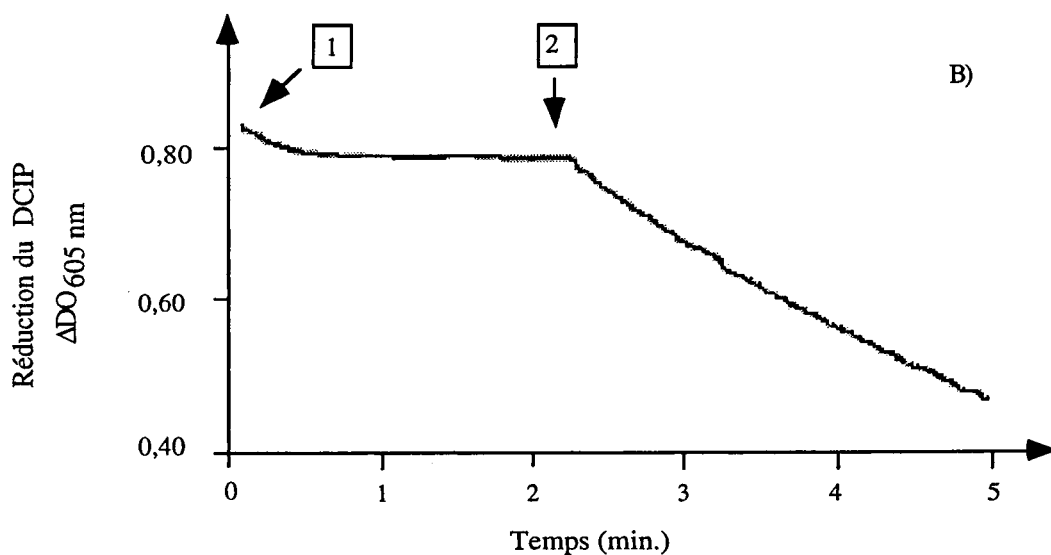
III.2.3. Etude du Complexe II de la chaîne respiratoire de *C. melassecola*

La présence d'une activité succinate déshydrogénase chez *C. melassecola*, déjà suggérée lors des études sur les cellules entières, a été confirmée par mesure de la réduction du ferricyanure de potassium ($E^{\circ} = +430$ mV) à 420 nm et du DCIP ($E^{\circ} = +217$ mV) à 600 nm par la fraction membranaire (Figure 27). Dans les chaînes respiratoires, comme celle de la mitochondrie et celle d'*E. coli*, dont la quinone respiratoire est l'ubiquinone, la succinate déshydrogénase effectue le transfert d'électrons directement sur l'ubiquinone, formant avec celle-ci le complexe II. Cependant, chez les bactéries à Gram positif la quinone respiratoire est constituée d'un noyau naphthoquinone (ménaquinone) (Gel'man, 1967; Taber, 1993), dont le potentiel de demi-réduction est plus négatif que celui de l'ubiquinone (Ubiquinol / ubiquinone $E^{\circ} = +100$ mV, et Ménaquinol / ménaquinone $E^{\circ} = -74$ mV). Malgré cette différence de potentiel rédox, la ménaquinone est aussi l'intermédiaire entre la NADH déshydrogénase et le complexe *bc1*. Bien qu'il puisse être différent selon que la quinone est libre dans la phase lipidique de la membrane ou associée à un complexe lié à la chaîne respiratoire, ce potentiel rédox pose des problèmes dans la localisation de l'entrée des électrons qui proviennent de la succinate déshydrogénase.



1 - Ferricyanure de Potassium 100 μM final + 50 μl de PS à 10 mg/ml de protéines

2 - Succinate 400 μM



1 - DCIP 100 μM final + 50 μl de PS à 10 mg/ml de protéines

2 - Succinate 400 μM

Figure 27. Mise en évidence de l'activité succinate déshydrogénase de la fraction membranaire (PS) de *Corynebacterium melassecola*.

A) Activité Succinate-Ferricyanure réductase. B) Activité Succinate-DCIP réductase. Les cinétiques sont réalisées à 37 °C dans 1 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5.

En effet le potentiel de demi-réduction du couple succinate/fumarate est supérieur d'environ 100 mV (fumarate / succinate $E^{\circ} = +30$ mV) à celui de la ménaquinone. Toutefois, Lemma *et al.* (1991) ont démontré que la ménaquinone peut être le médiateur entre la succinate déshydrogénase et le complexe *bcl* chez *B. subtilis*. Chez *C. melassecola*, comme chez les autres bactéries du genre *Corynebacterium*, la quinone respiratoire est aussi la ménaquinone (Collins et Cummins, 1986). Toutefois, nos résultats ne nous permettent pas de donner la localisation exacte de l'entrée des électrons à partir de l'oxydation du succinate par la succinate déshydrogénase.

Les complexes I et II, ainsi que les autres complexes des chaînes respiratoires, impliqués dans le transfert d'électrons vers l'oxygène, ont pour caractéristique commune la présence de différents cytochromes, dont les signaux spectroscopiques des hèmes, principalement ceux des bandes α , servent à l'identification. L'étude de la composition en cytochromes de la chaîne respiratoire de *C. melassecola* doit ainsi apporter des nouveaux éléments pour la suite de l'examen de cette chaîne.

III.2.4. Analyse de la composition en cytochromes de la chaîne respiratoire de *C. melassecola*

Le spectre différentiel réduit-oxydé des membranes de *C. melassecola*, obtenu à 77 K, a montré des bande α typiques de cytochromes possédant des noyaux hèmes des types *a*, *b* et *c* (Figure 28). Des résultats similaires ont été rapportés pour différentes espèces de corynébactéries (Andinarayana Reddy *et al.*, 1977; Schvinka *et al.*, 1979; Trutko *et al.*, 1982). Chez *C. melassecola*, nos résultats montrent que ces composants élémentaires de la chaîne sont fortement liés aux membranes et ne sont pas présents dans la fraction soluble après ultracentrifugation. En effet, l'analyse spectrale de la fraction soluble ne permet pas de déceler la présence de molécules associées à des noyaux hèmes.

Le pic α d'absorbance à 600 nm est caractéristique des cytochromes oxidases du type *a*.

On observe trois bandes α , typiques des hèmes *b*, à 556, 560 et 562 nm. Un cytochrome présentant un noyau hème du type *c* a été détecté avec un pic d'absorbance à 549 nm. Ces résultats sont cohérents avec les précédents et témoignent de la variété des transporteurs d'électrons présents dans ces préparations membranaires. Le rôle des différents cytochromes mis en évidence sera discuté par la suite, à la lumière des résultats obtenus par l'utilisation des inhibiteurs.

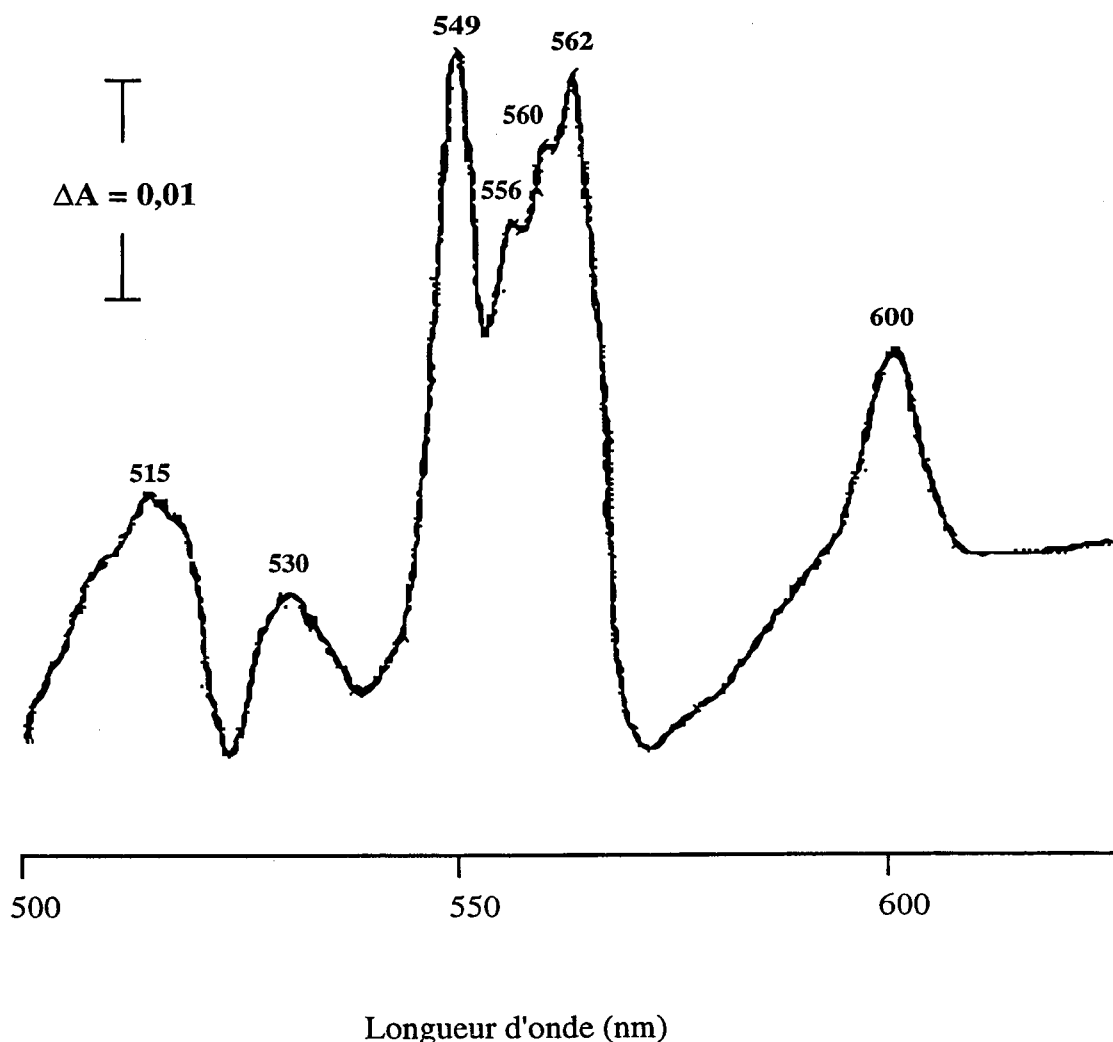


Figure 28. Analyse spectrophotométrique à basse température (77 K) de la composition en cytochromes des membranes de *Corynebacterium melassecola*.

III.2.5 Complexe III ou Quinol / cytochrome *c* réductase chez *C. melassecola*

Les différents cytochromes du type *b* décelés dans la fraction membranaire de *C. melassecola* peuvent faire partie d'un complexe quinol-cytochrome *c* réductase, similaire au complexe *bc1* que l'on retrouve dans la mitochondrie, dans la membrane des thylacoïdes (Shechter et Rossignol, 1997) et dans d'autres bactéries comme *P. denitrificans* (Berry et Trumpower, 1985). Effectivement, l'inhibition observée par l'ajout d'antimycine A, tant sur l'activité NADH déshydrogénase des membranes (Figure 29), que sur la consommation d'oxygène des cellules entières (Figure 19), signale la présence d'un complexe quinol-oxydase du type *bc1*.

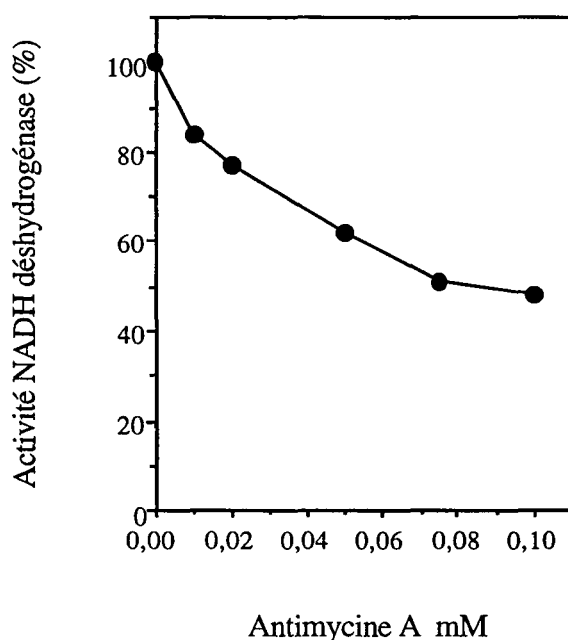


Figure 29. Inhibition de l'activité NADH déshydrogénase des membranes de *Corynebacterium melassecola* par des ajouts croissants d'antimycine A.

De même, le rétablissement de taux respiratoires normaux par l'addition de TMPD en présence d'antimycine A (Figure 20), montre que le passage d'électrons est bloqué par l'antimycine entre la ménaquinone et le cytochrome *c*. Ce complexe serait, juste après le complexe I, le deuxième

capable de transporter des protons par un mécanisme semblable à celui du cycle Q du complexe *bcl* (Gunner *et al.*, 1991).

III.2.6. Complexe III ou Oxydases terminales chez *C. melassecola*

Le spectre d'absorbance de la fraction membranaire (Figure 28), montre un pic d'absorbance α à 600 nm correspondant à un cytochrome *a* et un autre à 549 nm correspondant à un cytochrome *c*. Ces pics d'absorbance α suggèrent la présence d'une cytochrome *c* oxydase du type AI, conformément au classement proposé par Anraku (1988). Selon cet auteur, ces oxydases contiennent *aa3* ou *caa3* et deux atomes de cuivre par mole d'hème *a*. Ces oxydases terminales ont été retrouvées chez plusieurs espèces, et il est généralement accepté que les cytochromes *c* oxydases constituent l'un des sites de couplage énergétique de la chaîne respiratoire (Garcia-Horsman *et al.*, 1994). Par exemple, *B. subtilis* possède deux oxydases terminales (*aa3-600* et *caa3-605*) catalysant l'oxydation du quinol et du cytochrome *c* respectivement (de Vrij & Konings, 1987; Saraste *et al.*, 1991, Lauraeus *et al.*, 1991). Chez *C. glutamicum*, cette oxydase doit être celle responsable des oxydations du cytochrome *c* et du TMPD observées sur les cellules entières. Elle serait ainsi sensible aux faibles doses de cyanure de sodium comme il a été démontré dans les mesures de consommation d'oxygène des cellules entières en présence de TMPD (Figure 21). Cependant, de même que les cellules entières, les préparations membranaires présentent une résistance à des doses relativement hautes de cyanure de sodium (Figure 30). Ceci témoigne de la présence d'une oxydase terminale moins sensible au cyanure que celle du type *a* décrite précédemment. La valeur IC_{50} d'inhibition de l'activité NADH déshydrogénase membranaire (400 μ M), obtenue par l'ajout de cyanure de sodium dans le milieu réactionnel est encore plus élevée que celle observée pour la consommation d'oxygène par les cellules entières en présence de cet inhibiteur. La bande α à 562 nm, observée sur le spectre des membranes de *C. melassecola* (Figure 28) correspond à la présence d'un

cytochrome qui ferait partie d'un complexe quinol-oxydase, susceptible d'être à l'origine de cette résistance au cyanure. Cette bande α peut correspondre alors à la présence d'une oxydase terminale du type *o* dans la chaîne respiratoire de *C. melassecola*. En effet, en raison de la coexistence de deux oxydases terminales - *aa3* et *o* - chez *P. denitrificans* et *B. subtilis*, des valeurs d'inhibition comparables ont été observées (van Versenveld *et al.*, 1978; de Vrij *et al.*, 1987).

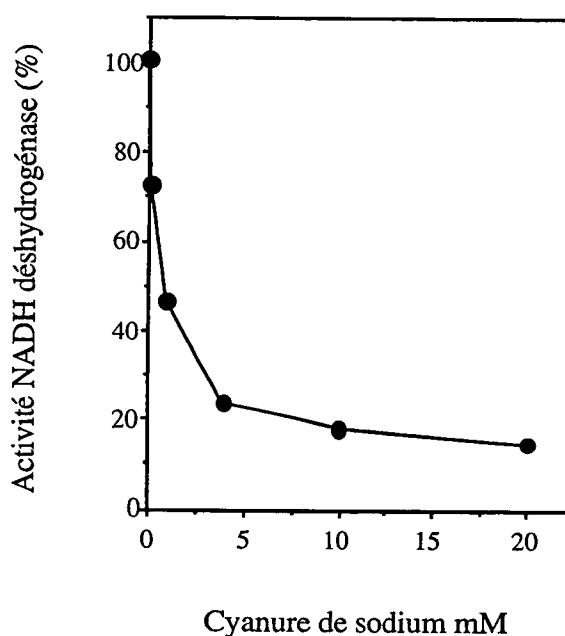


Figure 30. **Inhibition de l'activité NADH déshydrogénase des membranes de *Corynebacterium melassecola* par des ajouts croissants de cyanure de sodium.**

Chez *B. subtilis*, *aa3* et *o* présentent une différence significative quant à la sensibilité au cyanure, avec des IC_{50} d'environ 40 μ M et 200 μ M respectivement (de Vrij *et al.*, 1987). Chez *E. coli* il a été aussi démontré qu'une absorbance aux environ de 562 nm dans un spectre réduit-oxydé est le diagnostique d'un cytochrome directement impliqué dans l'oxydation de l'ubiquinol

(Minghetti *et al.* 1992). Cette enzyme a été purifiée à homogénéité et apparaît comme génératrice d'une force protonmotrice dans des protéoliposomes reconstitués (Matsushita *et al.* 1983).

Il est cependant possible qu'un de ces cytochromes de type *b* soit l'un des composants impliqués dans l'activité succinate déshydrogénase de *C. melassecola*. Chez *E. coli* des essais d'immunoprecipitation indiquent que l'enzyme possède 4 sous-unités, deux grandes et deux petites (Condon *et al.*, 1985). Le cytochrome *b556* est l'une des deux petites sous-unités hydrophobes qui servent à ancrer dans la membrane les deux grandes sous-unités contenant la flavine et les groupes prostétiques fer-soufre (Murakami *et al.*, 1985). Nous avons vérifié que l'activité succinate déshydrogénase déjà mise en évidence dans les cellules entières, est aussi présente dans la fraction membranaire (Figure 27).

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer un schéma possible pour le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire de *C. melassecola* (Figure 31). Cette chaîne contiendrait deux NADH déshydrogénases, un complexe quinone oxydase du type *bc1* et deux oxydases terminales. Ainsi, suivant la voie empruntée le bilan énergétique pourrait varier, puisque, comme pour la chaîne respiratoire de la mitochondrie, trois sites de couplage énergétique seraient possibles dans la voie passant par NDH-1, le complexe *bc1* et la cytochrome *c* oxydase, tandis que la voie la plus courte, passant par NDH-2 et la ménaquinol-oxydase du type *bo*, pourrait ne contenir qu'un seul site de couplage énergétique.

Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires à la détermination de la nature exacte de chacun des complexes proposés ainsi que sur la séquence suivie par les électrons dans différentes conditions physiologiques. Pour cela, des analyses potentiométriques et des mutations dans les gènes codant les différents composants de cette chaîne pourront apporter des informations beaucoup plus précises sur le rendement énergétique du métabolisme respiratoire de *C. melassecola*.

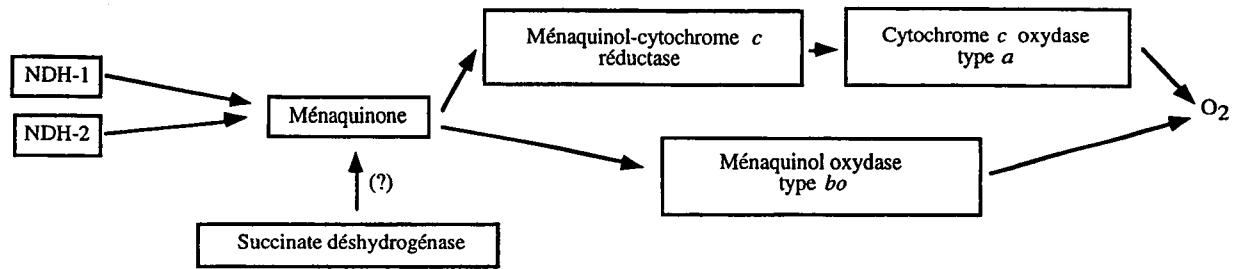


Figure 31. Schéma possible de la chaîne respiratoire chez *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965.

IV. Etude de l'activité NADH oxydase de la fraction cytosoluble de *Corynebacterium melassecola*

Nos résultats précédents sur l'oxydation du NADH₂ dans les extraits bruts (**EB**) de *C. melassecola*, ont permis de montrer que cette activité pouvait être divisée en une fraction membranaire (**PS**) et en une fraction cytosoluble (**FS**). L'activité catalysée par les particules sédimentées par ultracentrifugation correspond à l'oxydation du NADH₂ par la chaîne respiratoire. L'activité NADH oxydase de la fraction cytosoluble, que nous allons maintenant étudier en détails, est beaucoup plus faible (en moyenne 4,6 U / min.) que celle de la fraction membranaire.

IV.1. Effet des inhibiteurs de la chaîne respiratoire sur l'activité NADH oxydase mise en évidence dans la fraction soluble

Afin de confirmer que l'activité NADH oxydase détectée dans la fraction soluble n'est pas due à une contamination par des fragments de membrane contenant une chaîne respiratoire encore active, nous avons encore eu recours à l'utilisation des inhibiteurs des chaînes respiratoires. Nous avons ainsi vérifié qu'une forte dose de cyanure de sodium, ajoutée en cours de cinétique, n'a pas d'effet sur l'activité NADH oxydase (Figure 32). De plus, les courbes d'inhibition obtenues montrent que cette activité est insensible à l'antimycine et au DCCD (Figure 33; B, D). Une faible diminution d'activité est observée lors de l'ajout de doses croissantes de capsaïcine (inhibiteur de la NADH déshydrogénase couplée, NDH-1), ou de cyanure de sodium à des doses très supérieures à celles nécessaires à l'inhibition des oxydases terminales des chaînes respiratoires (Figure 33; C, A). D'autres inhibiteurs, comme l'acide salyxidromique (inhibiteur des oxydases alternatives), la roténone (inhibiteur du complexe I) ou encore le myxothiazol se sont avérés ne pas inhiber cette activité. Ces résultats confirment la non implication de la chaîne respiratoire membranaire dans l'oxydation du NADH₂ observée dans

cette fraction cytosoluble. Nous avons donc mis en avant l'existence possible d'une NADH oxydase lors de ces expériences préliminaires.

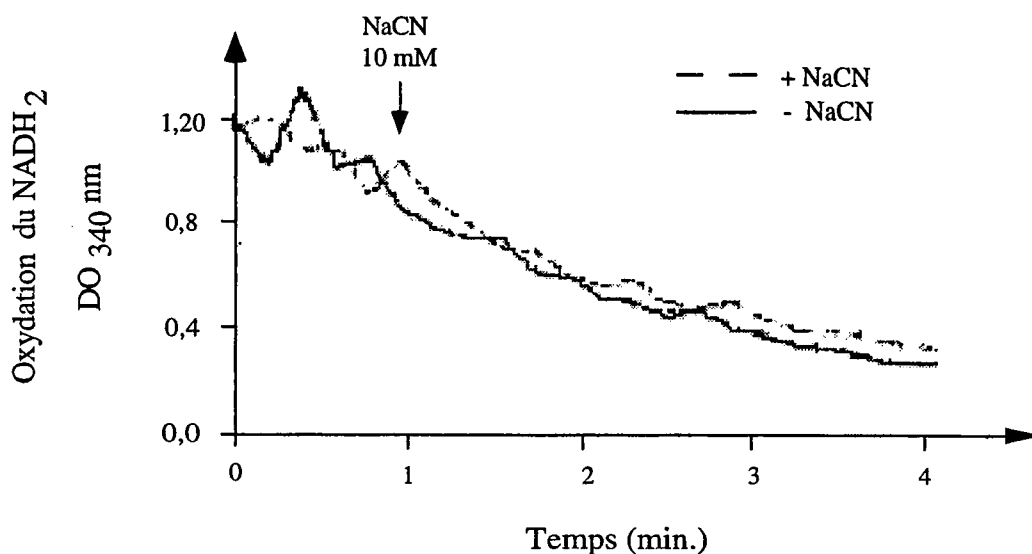


Figure 32. **Effet du cyanure de sodium ajouté en cours de cinétique de mesure de l'activité NADH oxydase dans la fraction cytosoluble des extraits cellulaires de *Corynebacterium melassecola*.**

Les cinétiques enzymatiques sont réalisées à 37 °C, en présence de 200 μ M de NADH₂ dans un volume total de 1 ml dans une cuve agitée.

Ces résultats peuvent alors être rapprochés de ceux obtenus par Schvinka (1979) chez *Brevibacterium flavum*. Cet auteur suggère que l'activité NADH oxydase cytoplasmique qu'il détecte, serait destinée à jouer un rôle régulateur de la capacité respiratoire, en modulant le rapport P/O. D'autre part, et contrairement aux observations de Trutko *et al.* (1982), dont les résultats signalent aussi la présence d'une NADH oxydase résistante au cyanure chez *C. glutamicum*, nous n'observons pas, dans nos conditions expérimentales, de changement de l'activité NADH oxydase mesurée dans la fraction cytosoluble en fonction de la phase de croissance (Figure 34). Chez *B. flavum* et *C. glutamicum*, ni la nature, ni le rôle exact de ces oxydases ne sont connus (Schvinka *et al.*, 1979; Trutko *et al.*, 1982).

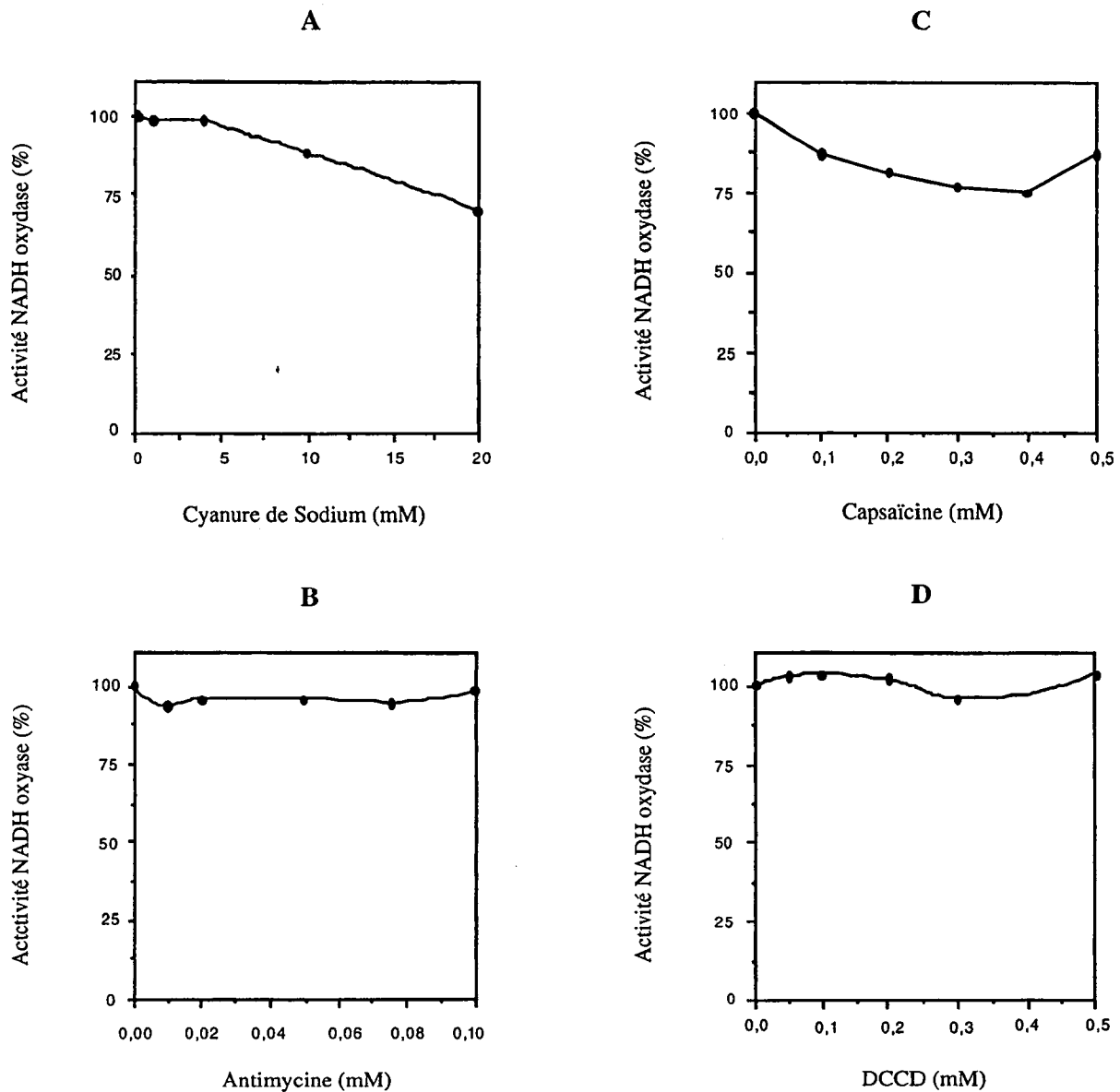


Figure 33. Effet des différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire sur l'activité NADH oxydase de la fraction cytosoluble (FS) de *Corynebacterium melassecola*.

Les extraits protéiques de la FS sont incubés en présence des différents inhibiteurs pendant 5 min. à 37°C, avant le démarrage de la réaction enzymatique par l'ajout de 200 μM de NADH_2 . Les cinétiques enzymatiques sont réalisées à 37°C.

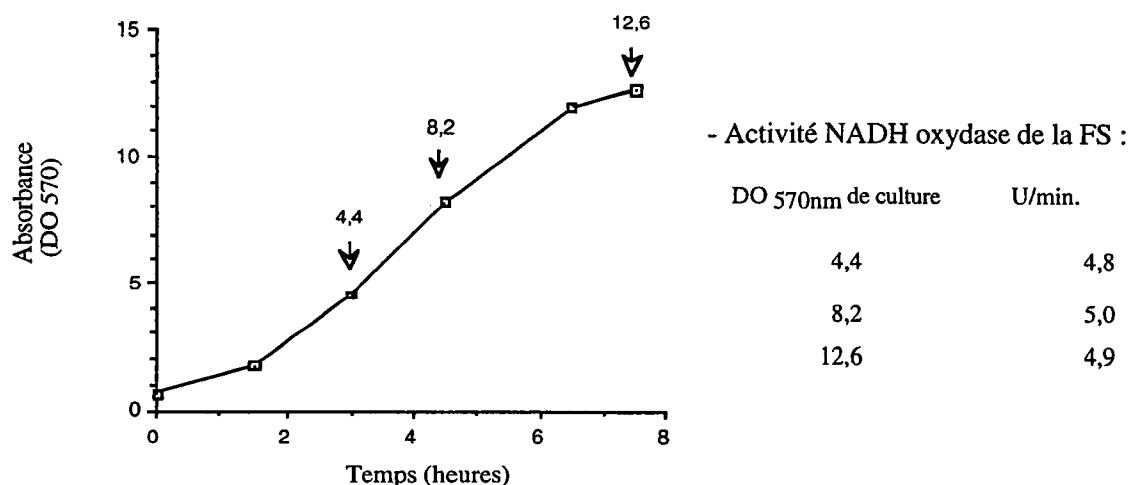


Figure 34. **Activité NADH oxydase de la fraction cytosoluble (FS) en fonction de la phase de croissance de *Corynebacterium melassecola*, sur milieu riche.** Les activités sont mesurées à 37°C en présence de 200 μ M de NADH₂. Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à 1 nmol de cofacteur oxydé / mg de protéine.

IV.2. Effet de différents effecteurs sur l'activité NADH oxydase mise en évidence dans la fraction cytosoluble

Si la non intervention d'éléments d'une chaîne respiratoire intacte dans l'oxydation du NADH₂ par la fraction cytosoluble semble claire d'après nos résultats précédents, nous ne pouvons cependant pas écarter totalement la possibilité de la participation, dans l'activité NADH oxydase détectée globalement, d'une NADH déshydrogénase d'origine membranaire. En effet, la NADH déshydrogénase du type 2 (NDH-2, sans liaison avec des sites de couplage énergétique) peut se détacher de la membrane sous certaines conditions de préparation (Sone, 1990; Nagata *et al.*, 1996). Ceci ne serait pas incompatible avec nos résultats d'inhibition, puisque les inhibiteurs du complexe NADH-quinone réductase que nous avons utilisés (DCCD, capsaïcine et roténone), ne seraient actifs que sur les déshydrogénases du type 1, pas sur celles du type 2 (Yagi, 1991).

La présence d'une enzyme du type NDH-2 dans la fraction soluble impliquerait, entre autres, que des quinones puissent être utilisées comme accepteurs d'électrons. Nous avons vérifié cela par l'utilisation de la duroquinone (DQ) lors de mesures d'oxydation du NADH₂. L'addition de cette quinone provoque une augmentation notable (en moyenne 75 fois) de l'oxydation du NADH₂ (Tableau 6).

Tableau 6. **Activités oxydase et oxydoréductase dans les extraits cellulaires de *Corynebacterium melassecola*.**

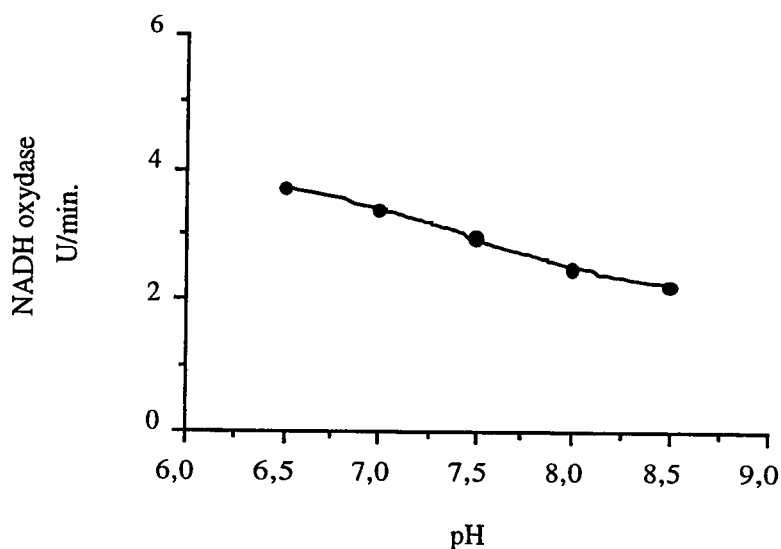
	Activité mesurée à 340 nm *U / min.		
	NADH ₂	NADPH ₂	dNADH ₂
Fraction membranaire	393,5 (±39)	6,7 (±1,8)	5,9 (±1,9)
Fraction cytosoluble (FS)	4,6 (±1,6)	1,6 (±0,3)	4,8 (±1,9)
FS + duroquinone (300 µM)	344,5 (±80,4)	10,6 (±0,8)	24,6 (±4,3)

*Les activités sont mesurées à 37°C en présence de 200 µM du cofacteur réduit. Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à 1 nmol de cofacteur oxydé / mg de protéine.

Ces résultats semblent montrer que l'oxydation du NADH₂, par la fraction cytosoluble, n'est pas l'oeuvre d'une enzyme unique, semblable aux NADH oxydases des bactéries lactiques (Lucey et Condon, 1986; Condon, 1987), mais est vraisemblablement due, au moins en partie, à la présence d'une NADH-quinone oxydoréductase. La résistance de cette activité à l'inhibition par la roténone, le DCCD et la capsaïcine (Figure 33), en présence ou en absence de duroquinone, permet d'attribuer cette activité à une NDH-2 (NADH déshydrogénase sans

liaison avec des sites de couplage énergétique), identique à celle dont nous avons supposé l'existence dans la chaîne respiratoire membranaire de *C. melassecola*.

A)



B)

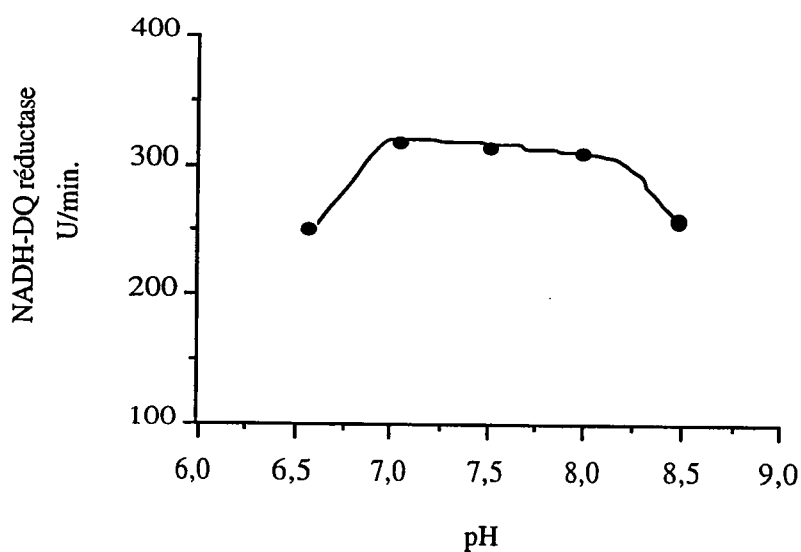


Figure 35. Détermination du pH optimal pour les activités NADH oxydase (A) et NADH-duroquinone réductase (B) de la fraction soluble des extraits de *Corynebacterium melassecola*.

Les activités sont mesurées à 37°C en présence de 200 μM de NADH_2 en présence ou en absence de 300 μM de duroquinone (DQ). Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à 1 nmol de NADH_2 oxydé / mg de protéine.

Au cours de ces expériences, nous avons pu constater que l'activité NADH oxydase mesurée en présence de duroquinone présentait un profil de réponse aux variations de pH différent de celui de l'activité mesurée en absence de duroquinone (Figure 35). Ce résultat, ainsi que ceux que nous allons exposer maintenant, semble confirmer que l'activité NADH oxydase mesurée globalement, pourrait être la résultante de l'action de plusieurs enzymes différentes, dont la NADH déshydrogénase de type NDH-2.

Outre la duroquinone, nous avons constaté que différents composés peuvent servir d'accepteurs d'électrons lors de l'oxydation du NADH_2 par les enzymes contenus dans la fraction soluble que nous avons étudiée. Nous avons ainsi pu suivre ces réactions d'oxydo-réduction, directement par spectrophotométrie à différentes longueurs d'onde (accepteurs = NBT, INT, DCIP, INT+PMS, Ferricyanure de potassium, cytochrome *c*, sNAD^+ , AcPyAD^+), ou indirectement par mesure de l'oxydation du NADH_2 à 340 nm, (accepteur = acide lipoïque).

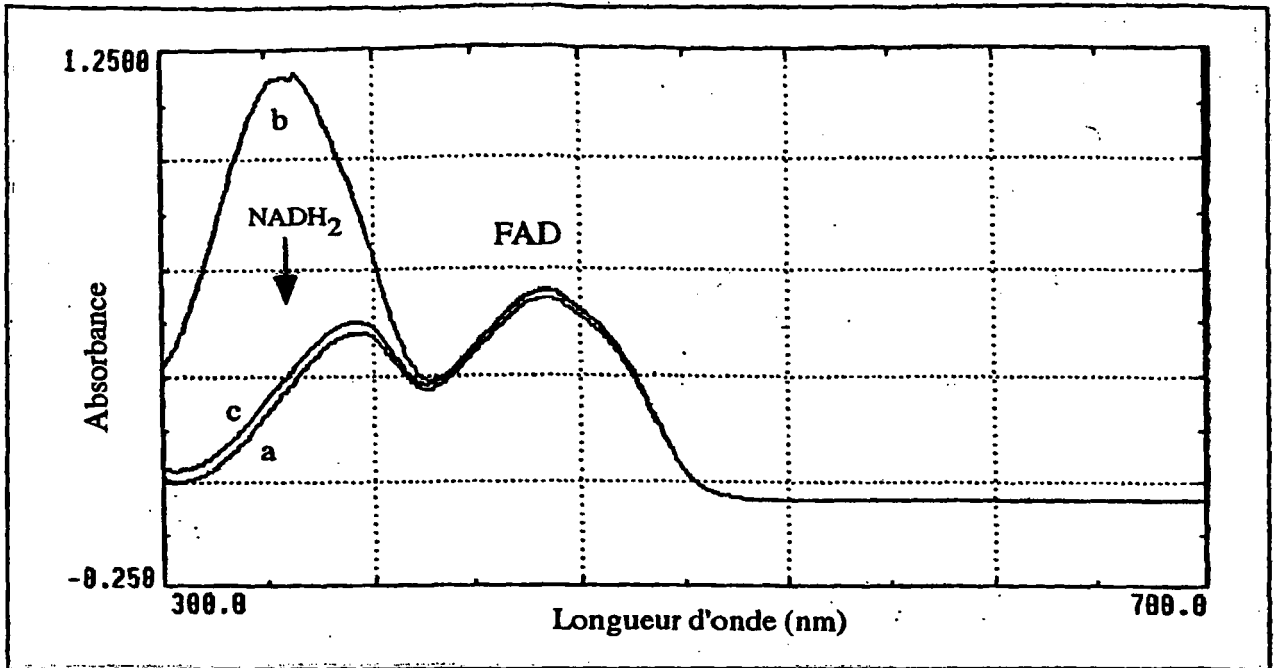
D'autre part, si les cofacteurs NADPH_2 et dNADH_2 sont également oxydés par la fraction cytosoluble (Tableau 6), leur oxydation ne semble pas répondre de manière aussi sensible à la présence de duroquinone que celle du NADH_2 .

L'ajout dans le milieu réactionnel de FAD ou de FMN, a un effet activateur très net sur certaines de ces oxydoréductions. Cet effet varie en fonction du donneur d'électrons et de la présence ou de l'absence d'un accepteur d'électrons (Tableau 7). L'activité NADH oxydase est ainsi doublée lors de l'ajout d'une des flavines.

Par contre, à la fin des réactions en présence d'oxygène, on observe que ni le FMN, ni le FAD ne sont réduits par le NADH_2 (Figure 36). Ces flavines semblent ainsi impliquées dans le transfert des électrons sans pour autant être les accepteurs finaux.

En conclusion, il est possible qu'une partie de l'activité NADH oxydase mesurée dans la fraction cytosoluble soit l'oeuvre de flavoenzymes autres que NDH-2, les diaphorases, enzymes capables de fonctionner avec une variété de sources de donneurs et d'accepteurs d'électrons (White *et al.*, 1968).

A



B

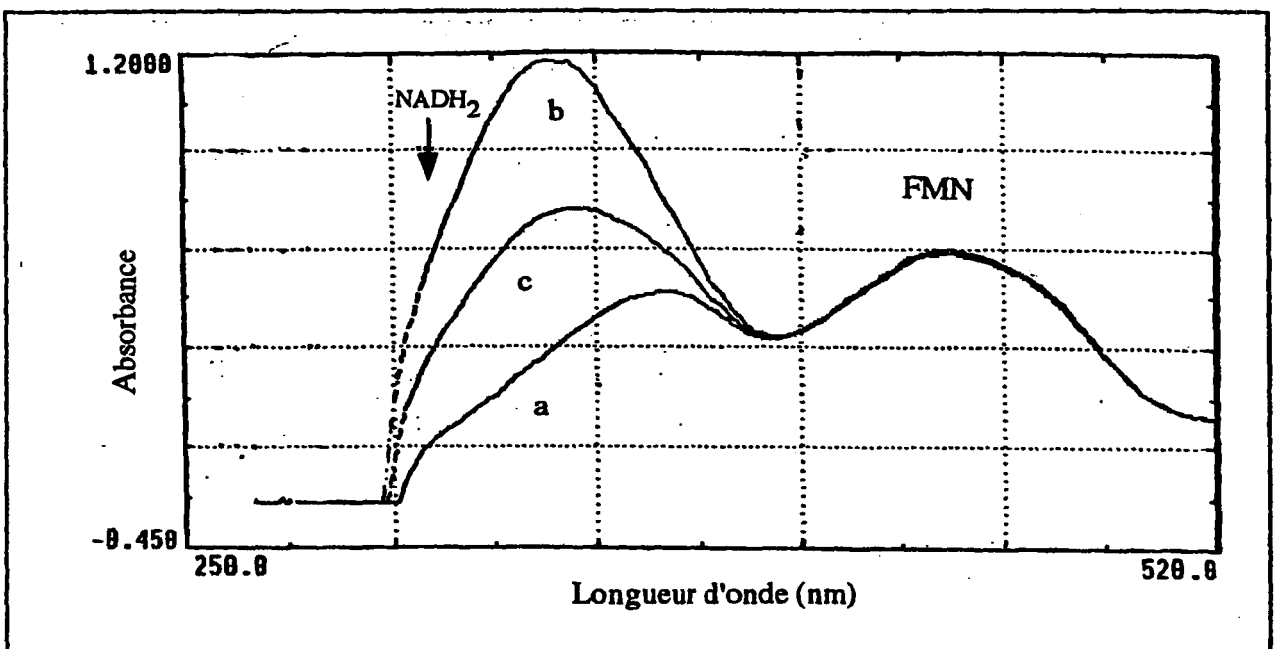


Figure 36. Spectres d'oxydation du NADH_2 en présence de FAD (A) et FMN (B) par la fraction cytosoluble des extraits de *Corynebacterium melassecola*.

- a) avant l'addition de NADH_2
- b) immédiatement après l'addition de NADH_2 ($200 \mu\text{M}$)
- c) 10 minutes après l'addition de NADH_2 .

Tableau 7. **Action du FAD et du FMN sur les activités enzymatiques catalysées par des enzymes présentes dans la fraction cytosoluble (FS)**

Activité U / min.	FS	FS + FMN	FS + FAD
NADH oxydase	4,7 ($\pm 0,69$)	11,8 ($\pm 2,1$)	10,5 ($\pm 1,3$)
NADH-DQ oxydoréductase	290,7 ($\pm 61,2$)	298 (± 58)	282 ($\pm 42,2$)
dNADH oxydase	6,5 ($\pm 0,1$)	9,0	8,5
dNADH-DQ oxydoréductase	24,9 ($\pm 0,6$)	29,6	29,8

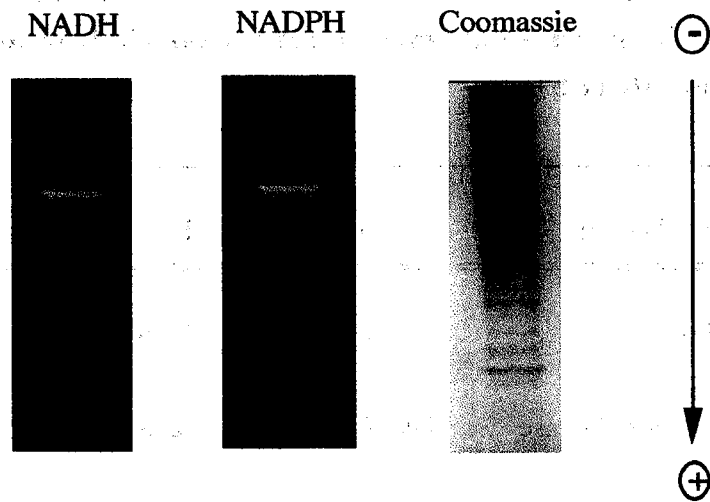
Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à 1 nmol de (d)NADH₂ oxydé / mg de protéine à 37 °C, en présence ou non de Duroquinone (DQ, 300 μ M). Le (d)NADH₂ est ajouté à une concentration de 200 μ M.

IV.3. **Mise en évidence des activités diaphorase dans la fraction cytosoluble des extraits de *C. melassecola***

A l'aide de deux techniques différentes de révélation d'activités enzymatiques sur gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes (zymogrammes), nous avons mis en évidence un groupe de 6 enzymes capables d'utiliser le NADH₂ pour réduire DCIP + MTT, 3 capables d'utiliser le NADPH₂ pour réduire DCIP + MTT et une pour réduire PMS + INT.

Le zymogramme en présence de PMS + INT (Figure 37A) est selon, Schmidt *et al.* (1986), révélateur d'une activité NADH oxydase. L'enzyme responsable de cette activité a été purifiée dans notre laboratoire. Les résultats, obtenus après la détermination et l'analyse de séquences peptidiques et de la séquence nucléotidique du gène cloné, montrent qu'il s'agit en

A)



B)

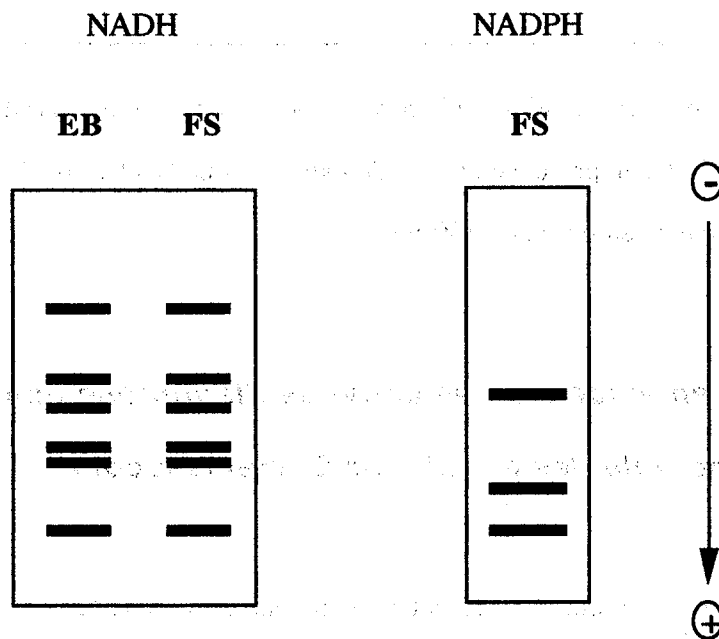


Figure 37. **Révélation des activités enzymatiques des extraits de *C. melassecola* capables d'utiliser le NAD(P)H₂ pour réduire des accepteurs d'électrons artificiels, après électrophorèse sur gel d'acrylamide 7,5 %.**

A) Profil de migration de la fraction soluble de l'extrait protéique (FS) après révélation avec la phénazine méthosulfate + p-iodonitrotétrazolium violet ou au bleu de coomassie.

B) Profil de migration de l'extrait protéique brut (EB) et cytosoluble (FS) après révélation avec dichlorophénol indophénol + thiazolyl blue (schéma).

fait d'une superoxyde dismutase (Merkamm, communication personnelle). Ewing et Janero ont récemment expliqué cet artefact (1995).

Il est intéressant d'observer ainsi qu'au moins une des enzymes mises en évidence lors des révélations sur gel et lors des analyses spectrophotométriques, pourrait correspondre à un site d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire, au niveau d'un potentiel rédox théorique comparable à celui des NADH déshydrogénases. En effet, l'activité oxydoréductase de la fraction soluble a pour donneur d'électrons le NADH₂ ($E^{\circ} = -320$ mV) et pour accepteur d'électrons plusieurs substances dont la gamme de potentiel rédox est assez large, allant du ferricyanure de potassium ($E^{\circ} = +430$ mV) et du cytochrome *c* ($E^{\circ} = +250$ mV), jusqu'à des composés comme la duroquinone ($E^{\circ} = +5$ mV), le lipoate oxydé ($E^{\circ} = -290$ mV), ou des analogues structuraux du NAD⁺ (AcPyAD⁺, sNAD⁺). Il est à rappeler que chez *C. melassecola*, comme chez d'autres bactéries à Gram positif, la quinone respiratoire est une ménaquinone. Le potentiel rédox théorique de la ménaquinone est d'environ -74 mV, ce qui la place dans la gamme des composés susceptibles d'être oxydés par l'activité de la fraction soluble. Ceci suggère une interaction possible entre les oxydases solubles et les composants de la chaîne respiratoire.

D'autre part, la réduction de composés analogues du NAD⁺, comme le sNAD⁺ et l'AcPyAD⁺, indique la présence d'une activité transhydrogénase dans les extraits solubles de *C. melassecola* (Tableau 8). L'activité transhydrogénase est le plus souvent définie comme étant celle responsable du transfert d'électrons réversible du NADPH₂ au NAD⁺. Depuis plusieurs années, différentes équipes ont tenté sans succès de mettre en évidence ce type de transhydrogénase chez *C. melassecola* (Rollin *et al.*, 1995). En effet, la présence d'une enzyme de ce type aurait pu être une solution permettant la régénération de NADPH₂, facteur potentiellement limitant de la croissance de cette bactérie.

Tableau 8. **Activité transhydrogénase de la fraction soluble des extraits protéiques de *Corynebacterium melassecola***

Sens de la réaction	Activité spécifique U/min.
$\text{NADH}_2 \rightarrow \text{sNAD}^+$	121,5 ($\pm 13,5$)
$\text{sNADH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$	110,5 ($\pm 17,7$)
$\text{sNADH}_2 \rightarrow \text{NADP}^+$	5,0 ($\pm 1,4$)
$\text{NADPH}_2 \rightarrow \text{sNAD}^+$	6,6 ($\pm 1,3$)

Les réactions sont effectuées à 37°C et l'activité est estimée par mesure de la variation de la densité optique à 340 nm (NADH_2) ou à 395 nm (sNADH_2). Unités d'activité spécifique (U): nmol de substrat réduit / mg de protéine.

Dans une publication récente, Park *et al.* (1997) montrent l'existence d'une activité de ce type chez *C. glutamicum*. Cependant les valeurs obtenues par ces auteurs, en ce qui concerne la transhydrogénation $\text{NADH}_2 \rightarrow \text{NADP}^+$, sont largement supérieures aux nôtres (environ 50 fois). Ceci pourrait être lié à la méthode d'obtention des extraits cellulaires. En effet, la grande majorité des transhydrogénases ($\text{NADH}_2 \rightarrow \text{NADP}^+$) sont membranaires, et ces auteurs utilisent une force de centrifugation qui ne permet pas d'éliminer de la fraction soluble tous les débris de membrane. Cette différence pourrait aussi être liée aux différences de conditions de culture, cette enzyme ne semblant pas indispensable dans certaines conditions de croissance (Park *et al.*, 1997).

Les résultats présentés dans la Tableau 8, montrent que pour la fraction cytosoluble de *C. melassecola*, les valeurs de transhydrogénation entre le NADH_2 et son analogue structural sNAD^+ sont les plus importantes. Chen et Guillory (1984) ont mis en évidence, dans la mitochondrie, une activité transhydrogénase $\text{NADH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$ catalysée par une enzyme du

complexe I. Etant donné que la fraction soluble de *C. melassecola* renferme aussi une activité quinone réductase, il serait donc possible que ces deux activités soient catalysées par la même enzyme.

L'analyse de ces résultats nous a conduits à chercher à caractériser cette transhydrogénase, afin d'essayer de comprendre son implication dans le système d'interconversion des cofacteurs énergétiques chez *C. melassecola*. La suite de nos travaux montrera que l'activité que nous observons n'est pas due à une transhydrogénase du type classique, comme celle retrouvée par Park *et al.* (1997) chez *C. glutamicum*, mais à une oxydoréductase particulière.

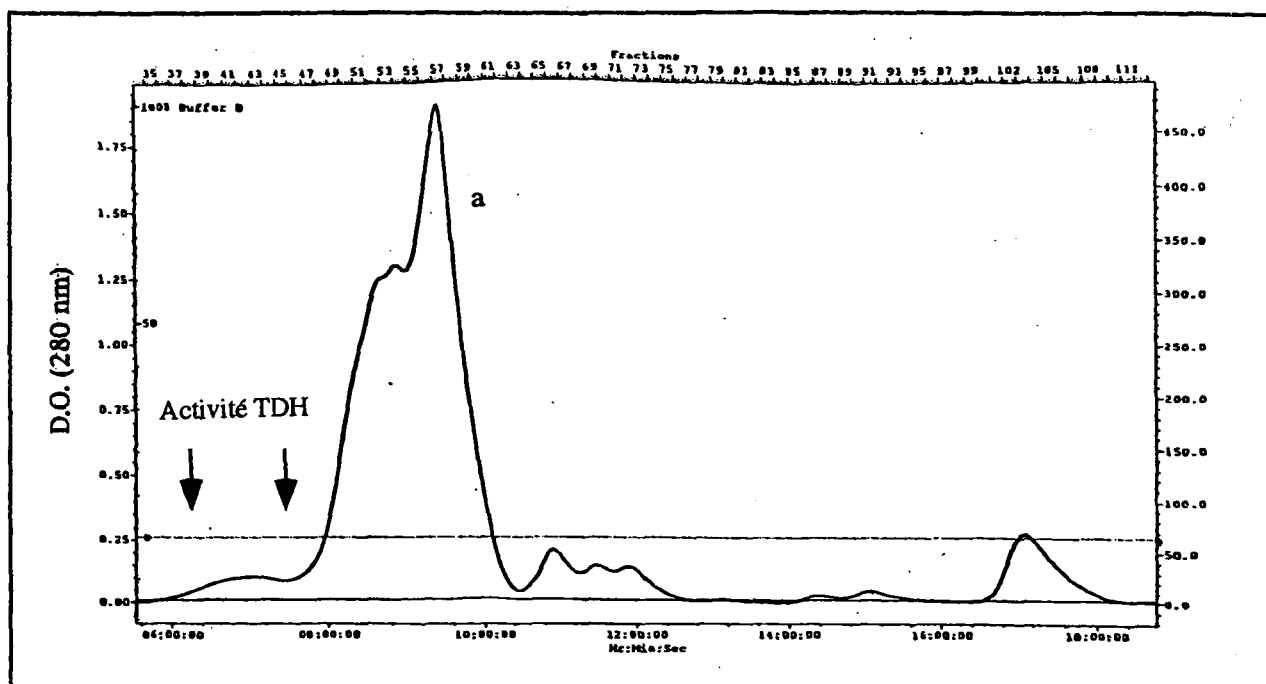
IV.4. Purification de l'enzyme responsable des activités transhydrogénase et NADH oxydase de la fraction cytosoluble des extraits de *C. melassecola*

La purification de cette enzyme a été réalisée par deux chromatographies successives comme indiqué dans le chapitre Matériels et Méthodes. La purification a été suivie par la mesure des deux activités enzymatiques attribuées à l'enzyme étudié, l'activité NADH oxydase sans accepteurs d'électrons dans le milieu réactionnel et l'activité transhydrogénase $s\text{NADH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$.

Le profil d'élution de la colonne d'exclusion moléculaire est présenté sur la Figure 38A. D'après cette Figure, la masse moléculaire apparente de l'enzyme responsable des activités suivies est ainsi d'environ 5 000 000 Da, ceci étant probablement le reflet d'interactions entre l'enzyme et d'autres protéines présentes dans la fraction cytosoluble. Le profil d'élution de la colonne d'interaction hydrophobe est présenté sur la Figure 38B.

Le bilan de purification de l'enzyme étudiée est présenté dans la Tableau 9.

A



B

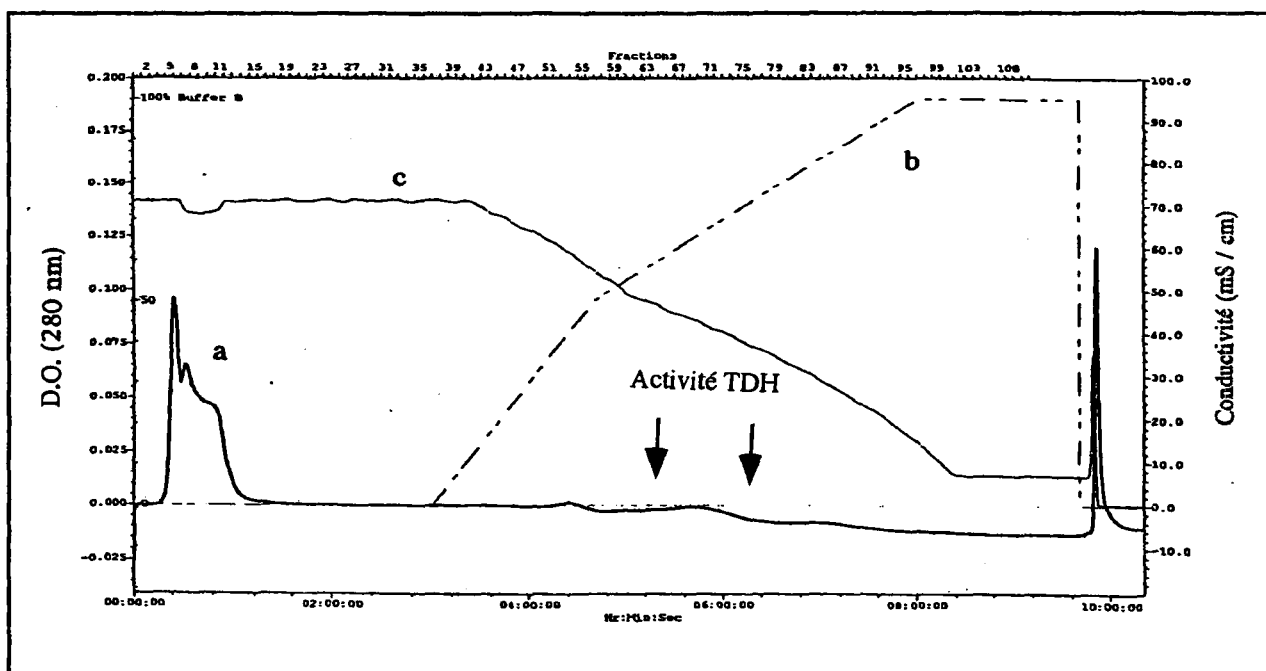


Figure 38. **Chromatographies de la « transhydrogénase » (TDH) de *Corynebacterium melassecola*.**

A) Chromatographie sur colonne d'exclusion moléculaire Toyopearl HW 65
 B) Chromatographie sur colonne d'interactions hydrophobes Octyl Sepharose
 a) absorbance à 280 nm; b) gradient en s. ammonium; c) conductivité mS/cm.
 Les conditions de chromatographie sont décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes

Tableau 9. **Purification de la transhydrogénase $\text{sNADH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$ de *Corynebacterium melassecola***

	Volume (ml)	Protéines (mg / ml)	Protéines totales (mg)	*Activité spécifique U / min.	Activité Totale U	Rendement (%)	Facteur de Purification
Fraction cytosoluble	4	17,5	70	98,6	6.902,0	100	1
Toyopearl HW 65	12	0,7	8,4	575,2	4.832,0	70	5,8
Octyl Sepharse	2	0,11	0,2	3651,0	803,0	12	37

* Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à 1 nmol de NAD^+ réduit / mg de protéine.

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 39) montre que l'enzyme est pure après ces étapes chromatographiques, qu'elle semble n'être constituée que par un seul type de sous unité dont le poids moléculaire est estimé à 53,8 kDa. L'enzyme ainsi purifié est à cet égard différent des transhydrogénases de *E. coli*, de *Rhodospirillum rubrum* et de la mitochondrie (Clarke et Bragg, 1985). Chez *E. coli* et chez *R. rubrum*, la transhydrogénase est composée de deux sous unités de poids moléculaire différent. La transhydrogénase mitochondriale n'est composée que d'une seule sous unité de 100 kDa environ, qui est équivalente en fait à une fusion des sous unités de la transhydrogénase de *E. coli*.

IV.4.1. Identification de l'enzyme purifiée: caractéristiques spectrales et microséquençage de peptides

La protéine purifiée présente un spectre caractéristique des flavoprotéines (Figure 40A). En présence de NADH_2 , la diminution d'absorbance autour de 340 nm due à l'oxydation de ce

cofacteur est accompagnée d'un blanchiment dans les longueurs d'onde comprises entre 400 et 450 nm (Figure 40B), lié à la réduction de la partie flavinique de l'enzyme.

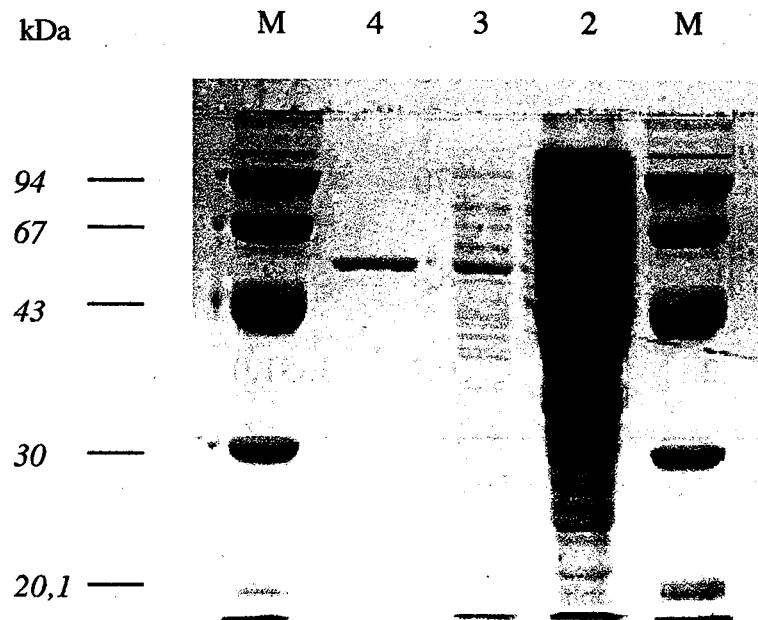


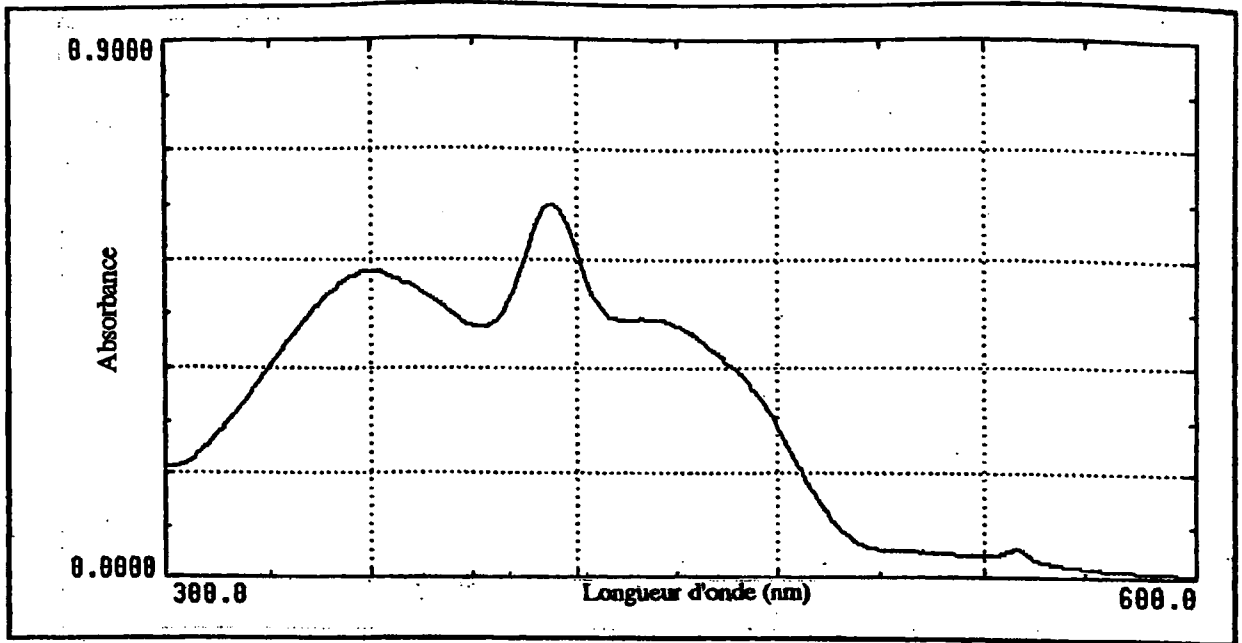
Figure 39. **Profils protéiques des étapes de purification de la transhydrogénase de *Corynebacterium melassecola* par séparation électrophorétique sur gel d'acrylamide 7,5% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

Piste: 2 - Fraction soluble brute de *C. melassecola*
 3 - Fraction active éluée de la colonne Toyopearl HW 65
 4 - Fraction active éluée de la colonne Octyl Sepharose 4
 M - Marqueurs de masse moléculaire (LMW Pharmacia)

Afin d'analyser au niveau moléculaire l'enzyme purifié et de procéder à son identification, la détermination de la séquence de trois peptides a été réalisée par J. d'Alayer au Laboratoire de Microséquençage des Protéines de l'Institut Pasteur à Paris. L'analyse de ces séquences a montré des similitudes importantes avec des peptides équivalents de lipoamides déshydrogénases.

S'il est apparu alors que la protéine purifiée ne correspond pas à celle que nous recherchions, nous avons cependant décidé de poursuivre l'étude de la lipoamide

A



B

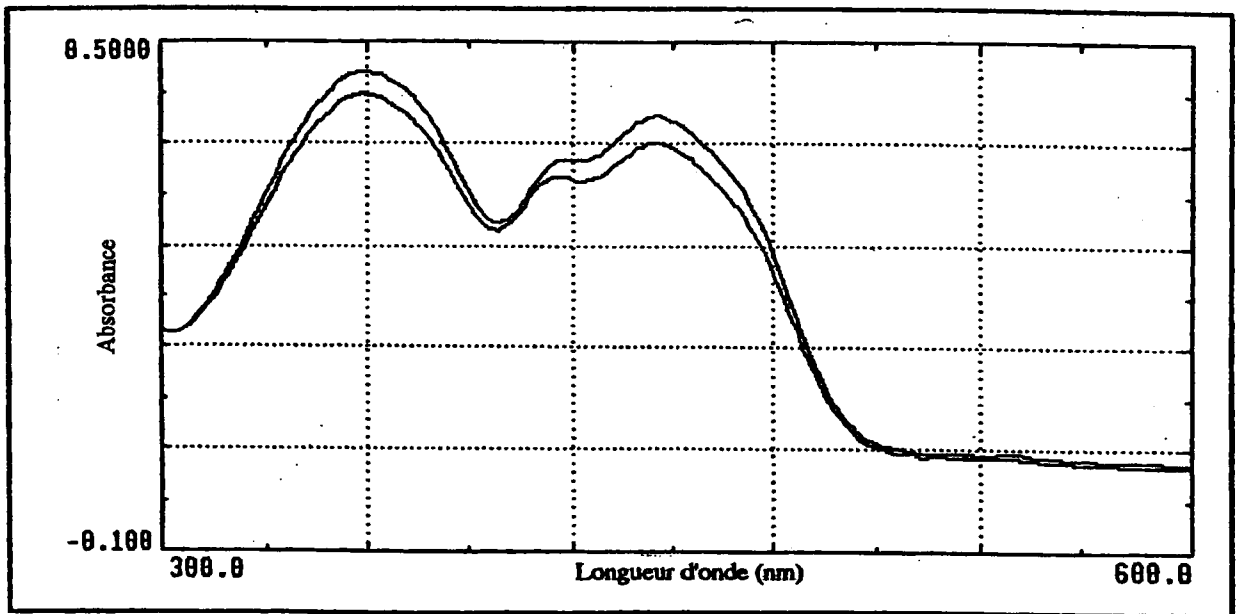


Figure 40. **Caractéristiques spectrales de l'enzyme purifié à partir des extraits cellulaires cytosolubles de *Corynebacterium melassecola*.**

A) Enzyme pure

B) Enzyme pure + NADH_2 100 μM . 2 spectres à 10 secondes d'intervalle entre chaque spectre.

déshydrogénase de *C. melassecola*, en raison de son implication dans deux étapes importantes du métabolisme central et de son lien possible avec la chaîne respiratoire (Walker et Fioravanti, 1995). On pourra également remarquer que chez *M. smegmatis*, bactérie taxonomiquement proche de *C. melassecola*, la lipoamide déshydrogénase a également été décrite comme capable de promouvoir des activités du type NADH oxydase (Marcinkeviciene et Blanchard, 1997), et que dans les mitochondries d'*H. diminuta* et d'*A. suum*, la lipoamide déshydrogénase présente une activité transhydrogénase (Walker *et al.*, 1997; Köhler et Saz, 1976; Komuniecki et Saz, 1979). Il n'est donc pas tellement étonnant que nous ayons purifié la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* en suivant ces deux activités.

IV.4.2. Détermination des conditions optimales de l'activité lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola*

L'activité enzymatique catalysée par la lipoamide déshydrogénase étant réversible, nous avons déterminé les conditions optimales d'activité dans le sens de l'oxydation du NADH₂ et de la réduction de l'acide lipoïque oxydé. Ce choix a été motivé par les objectifs initiaux de notre étude, c'est-à-dire l'oxydation du NADH₂ dans les extraits cellulaires de *Corynebacterium melassecola*, et par une question pratique, l'acide lipoïque oxydé étant nettement plus facile d'utilisation que sa forme réduite.

L'influence du pH sur l'activité enzymatique de la lipoamide déshydrogénase a été analysée en utilisant différents tampons dans une gamme de pH comprise entre 6,0 et 8,5 (Figure 41A). L'activité maximale est observée entre pH 7 et pH 7,5. En fonction de ces résultats, l'utilisation d'un tampon phosphate 50 mM pH 7,5 a été choisie comme condition optimale de mesure de l'activité lipoamide déshydrogénase.

L'influence de la température sur l'activité enzymatique a été étudiée entre 30 et 60 °C (Figure 41B). De manière surprenante, nous avons observé une forte augmentation de l'activité enzymatique en fonction de l'augmentation de température, jusqu'à 50 °C. Une chute de l'activité est observée au-delà de cette température, ce qui doit correspondre à une dénaturation thermique de cette enzyme. Cette enzyme montre une faible sensibilité à la dénaturation

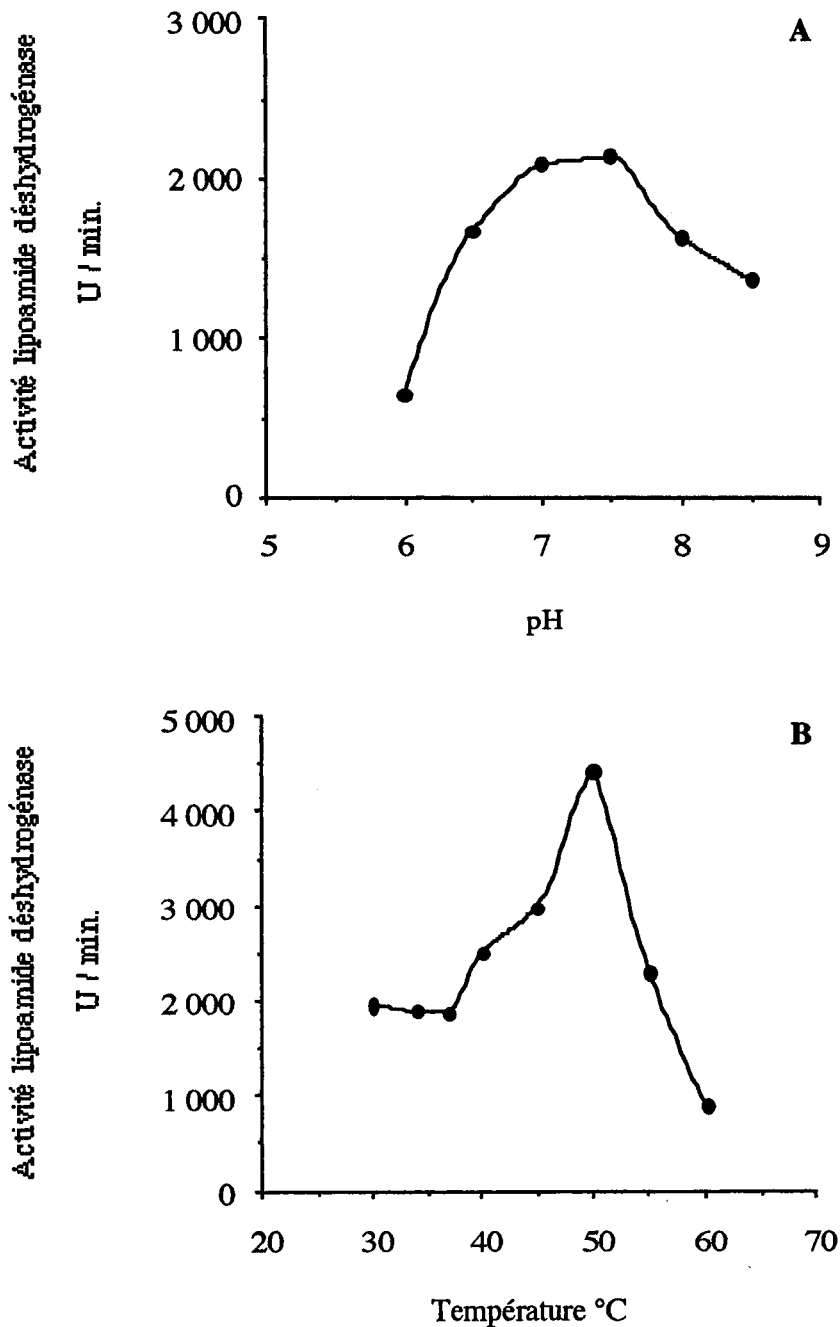


Figure 41. **Détermination des conditions optimales d'activité en fonction du pH (A) et de la température (B) pour la lipoamide déshydrogénase de *Corynebacterium melassecola*.**

L'activité lipoamide déshydrogénase (LPDH) a été dosée à 340 nm en présence d'acide lipoïque oxydé 400 μM , FAD 100 μM et NADH_2 200 μM .

Environ 1 μg / ml de la LPDH purifiée a été utilisée pour chaque dosage.

Le pH optimal d'activité a été déterminé après incubation de l'enzyme pendant 10 min. à chaque valeur de pH testée, puis dosage de l'activité à ce même pH pendant 3 min. à 37 °C. La température optimale d'activité a été déterminée après incubation de l'enzyme pendant 10 min. à la température testée, puis dosage de l'activité à cette même température pendant 3 min. Les incubations ont été effectuées en tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,5.

puisqu'elle présente encore 50% d'activité résiduelle lorsque le dosage est effectué à 60 °C par rapport aux dosages à 37 °C. Cependant, cette dernière température (37 °C), a été retenue pour la suite des études, *C. melassecola* étant une bactérie mésophile. Ainsi le V_{max} mesuré dans ces conditions est de $3,34 \mu\text{mol}$ de NADH_2 oxydé / mg de protéine / min., avec un K_m de $636 \mu\text{M}$ pour l'acide lipoïque oxydé.

VI.4.3. Autres accepteurs d'électrons utilisées par la lipoamide déshydrogénase

Nous avons confirmé l'activité diaphorase de l'enzyme purifiée par révélation sur gel non dénaturant (Figure 42), ainsi que sa capacité à utiliser une variété d'accepteurs d'électrons (Figure 43). On constate ainsi que plusieurs accepteurs d'électrons (cytochrome *c*, ferricyanure de potassium, INT et DCIP) utilisés par la fraction soluble sont réduits par l'enzyme purifiée en présence de NADH_2 . Ceci est vérifié de manière directe, par mesure de la réduction des différents composés à des longueurs d'onde variables, soit indirectement par augmentation de l'activité NADH oxydase en présence de ces composés (duroquinone, acide lipoïque). On confirme ainsi que cette enzyme est capable de transférer des électrons du NADH_2 à des composés de bas potentiel rédox comme la duroquinone, mais aussi à des analogues structuraux du NADH_2 , ce dernier type de transfert d'électrons correspondant à son activité transhydrogénase réversible (Figure 44). Le caractère équimolaire de la réaction de transhydrogénation a été confirmé par des calculs basés sur les coefficients d'extinction molaire du NADH_2 et de ses différents analogues structuraux.

Il est cependant notable que le facteur d'augmentation de l'oxydation du NADH_2 par l'enzyme pure, en présence de duroquinone (activité NADH -DQ réductase) ne soit pas aussi important que celui mesuré lors de l'ajout de ce composé dans les dosages sur la fraction soluble. Le facteur d'augmentation mesuré sur l'enzyme pure (environ 5 fois) est semblable à celui mesuré dans la fraction soluble lors de l'utilisation du dNADH_2 , analogue du NADH_2 , comme source d'électrons (Tableau 10). Etant donné que l'activité NADH oxydase de la fraction soluble est comparable à l'activité dNADH oxydase et que la purification de l'enzyme a été suivie par mesure de l'activité NADH oxydase, nous pouvons attribuer à l'enzyme purifié la

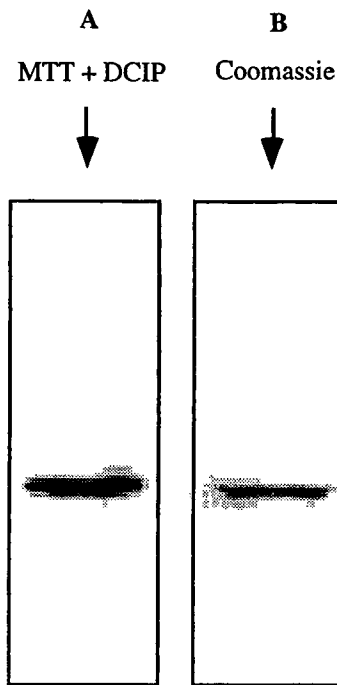


Figure 42. **Révélation de l'activité diaphorase de la lipoamide déshydrogénase purifiée de *C. melassecola*, après électrophorèse sur gel d'acrylamide 7,5%.**

A) Révélation de l'activité diaphorase en présence de thiazolyl blue (MTT) et dichlorophénol indophénol (DCIP).

B) Coloration au bleu de coomassie

totalité, sinon la grande majorité de l'activité NADH oxydase mesurée dans la fraction soluble. Ainsi, l'utilisation du dNADH₂ permet de déceler l'activité oxydase ou duroquinone réductase catalysée par la lipoamide déshydrogénase dans les extraits solubles.

Même si nous observons une augmentation de l'oxydation du NADH₂ par la lipoamide déshydrogénase purifiée lorsqu'au lieu de l'acide lipoïque nous ajoutons la duroquinone, il apparaît qu'elle n'est pas l'enzyme majoritaire dans la réduction de ce composé par la fraction soluble. En effet, l'augmentation observée lors de l'ajout de duroquinone dans la fraction soluble est d'environ 75 fois (Tableau 10), alors que pour l'enzyme pure ce facteur est d'environ 6 fois seulement. Ainsi, nous pouvons conclure que l'activité quinone réductase mesurée dans la fraction soluble devrait être essentiellement liée à la présence de NDH-2, et que les activités NADH et dNADH oxydases sont dues à la lipoamide déshydrogénase.

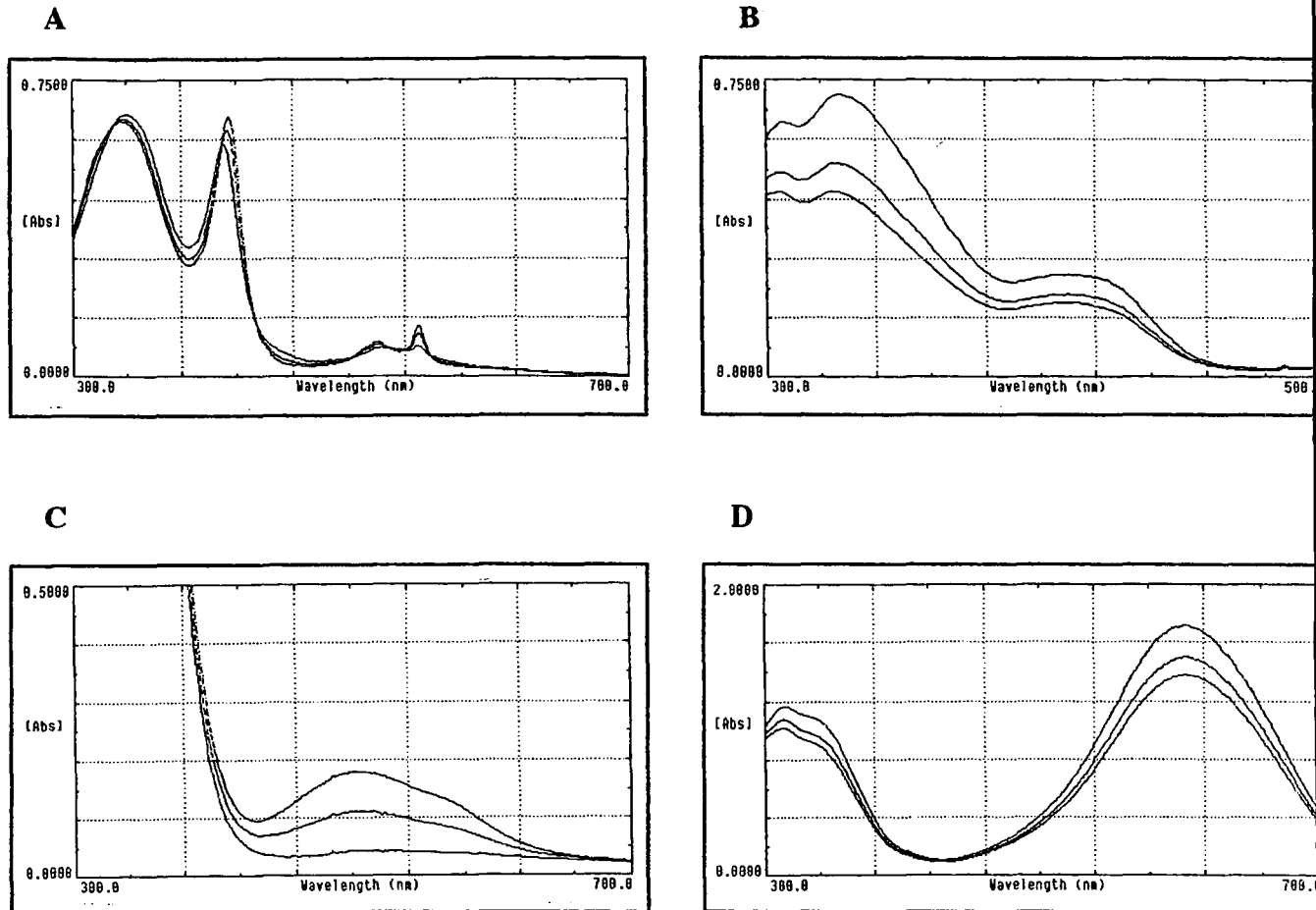


Figure 43. **Accepteurs d'électrons utilisées par la lipoamide déshydrogénase de *Corynebacterium melassecola*.**

La réduction des différents composés a été suivie dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,5 à 37 °C, par 3 spectres par échantillon à 2 min. d'intervalle entre chaque mesure pour le cytochrome *c* (A), le ferricyanure de potassium (B), le p-iodonitrotetrazolium violet - INT (C) et à 1 min. d'intervalle pour le dichlorophénol indophénol - DCIP (D).

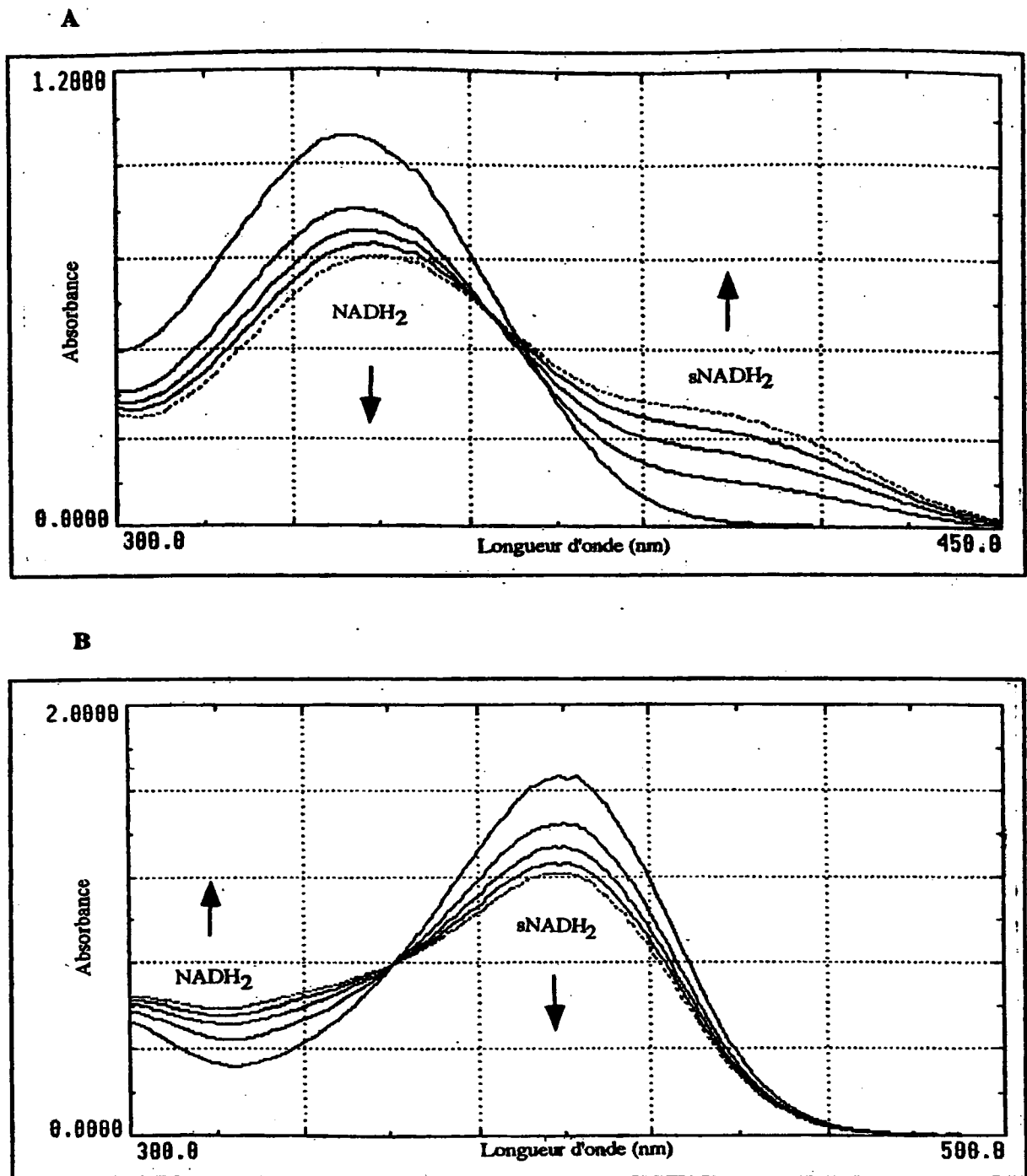


Figure 44. **Mise en évidence de l'activité $\text{NADH}_2 \rightleftharpoons \text{sNAD}^+$ transhydrogénase de la lipamide déshydrogénase de *Corynebacterium melassecola*.**

A) Activité transhydrogénase $\text{NADH}_2 / \text{sNAD}^+$

B) Activité transhydrogénase $\text{sNADH}_2 / \text{NAD}^+$

L'activité transhydrogénase a été suivie dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,5 à 37 °C, par 5 spectres par échantillon à 1 min. d'intervalle entre chaque mesure.

Dans nos conditions expérimentales, il n'existe donc pas chez *C. melassecola* de NADH oxydase du type de celle décrite chez les bactéries lactiques.

Tableau 10. Comparaison entre les activités (d)NADH oxydase et (d)NADH-duroquinone réductase catalysée par les enzymes de la fraction soluble et par la lipoamide déshydrogénase pure

Activité enzymatique	Fraction soluble U / min.	Lipoamide déshydrogénase U / min.
NADH oxydase	4,6 ($\pm 1,6$)	280,8 ($\pm 18,9$)
NADH-DQ réductase	344,5 (80,4)	1 661,0 (± 264)
NADH-DQ réductase / NADH oxydase	75	6
dNADH oxydase	4,8 ($\pm 1,9$)	283 ($\pm 8,0$)
dNADH-DQ réductase	24,6 ($\pm 4,3$)	1 345
dNADH-DQ réductase / dNADH oxydase	5	4,8

*Les activités sont mesurées dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,5 à 37°C en présence de 200 μ M du cofacteur réduit et 300 μ M de duroquinone (DQ), lorsque cet accepteur d'électrons est présent. Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à 1 nmol de cofacteur oxydé / mg de protéine.

V. Clonage et étude du gène *lpd* de *Corynebacterium melassecola* codant la lipoamide déshydrogénase

V.1. Stratégie envisagée

La lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* ATCC 17965 ayant été purifiée, la séquence de trois peptides internes ayant été déterminée (Chapitre IV), nous avons choisi de suivre la stratégie suivante pour le clonage moléculaire et l'étude du gène *lpd* correspondant. A partir des séquences des oligopeptides décrits précédemment, des oligonucléotides de synthèse peuvent être définis. Ces oligonucléotides servent alors d'amorces pour une réaction de polymérisation en chaîne (P.C.R.), l'ADN chromosomique de *C. melassecola* ATCC 17965 étant utilisé comme matrice. Après vérification de la séquence nucléotidique du fragment d'ADN issu de cette réaction, celui-ci peut être utilisé comme sonde pour cribler une banque d'ADN chromosomique de *C. melassecola*. Après les vérifications d'usage sur l'origine des fragments d'ADN isolés de la banque, ceux-ci servent enfin à la détermination de la séquence nucléotidique du locus *lpd*. Les séquences du gène et de la protéine déduite peuvent enfin être analysées.

Remarque

Durant ce travail, il est apparu que l'équipe du professeur Eikmanns (Ulm, Allemagne) réalisait un travail identique au nôtre sur le gène *lpd* de *C. glutamicum* ATCC 13032. La confrontation des résultats obtenus sur ces deux corynébactéries ne révèle aucune différence notable au niveau du gène *lpd* lui-même. Il a donc été convenu que les deux équipes, qui collaborent par ailleurs dans le cadre du programme européen Cell Factories, présenteraient leurs résultats dans un article en commun, chacune apportant cependant ses résultats spécifiques. Nous avons ainsi tenu compte dans certaines de nos analyses de renseignements fournis par le professeur Eikmanns.

V.2. Clonage du gène *lpd*

V.2.1. Obtention d'une sonde spécifique.

La séquence en acides aminés des peptides étudiés est représentée ci-dessous :

Peptide 1 TETLTVDRVMVSVGF

Peptide 2 LTERGAIDIDDYMRTNVPG

Peptide 3 ATFCNPQVASFGYTEEQAK

Par comparaison avec la séquence de la lipoamide déshydrogénase de *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), espèce taxonomiquement proche de *C. melassecola*, ces trois peptides ont pu être positionnés relativement entre eux. Depuis l'extrémité N-terminale de la lipoamide déshydrogénase, ces peptides devraient se trouver dans l'ordre peptide 1, peptide 2 et peptide 3. D'après la séquence de *M. tuberculosis*, les peptides 1 et 2 devraient être séparés environ par 15 acides aminés, les peptides 2 et 3 par 44 acides aminés et les peptides 1 et 3 par 77 acides aminés.

De la séquence des peptides 1, 2 et 3, on peut déduire la séquence nucléotidique de trois oligonucléotides, correspondant à des séquences sur le brin codant de l'ADN (oligonucléotides C1, C2 et C3 respectivement) et de trois oligonucléotides complémentaires inversés, correspondant à des séquences sur le brin non codant (oligonucléotides N1, N2 et N3). En se basant sur la séquence nucléotidique du gène *lpd* de *M. tuberculosis*, on attend pour *C. melassecola*, après amplification par P.C.R., des fragments d'ADN de 146 paires de bases (oligonucléotide C1 et oligonucléotide N2), de 243 paires de bases (oligonucléotide C2 et oligonucléotide N3) ou de 332 paires de bases (oligonucléotide C1 et oligonucléotide N3). Tenant compte de l'existence de contraintes techniques quant à la taille des fragments d'ADN utiles à la réalisation de notre objectif (purification de l'ADN sur gel, hybridation ADN/ADN, etc.), les deux derniers couples (C1/N2 et C2/N3) sont à privilégier si possible.

Le choix définitif des oligonucléotides à utiliser pour l'amplification par P.C.R. d'un fragment d'ADN pouvant servir de sonde pour le clonage d'un gène ne dépend pas seulement de ces contraintes de taille. En effet, par le jeu du code génétique, le décodage sans *a priori* de la séquence d'un oligopeptide en séquence nucléotidique, conduit en général à un nombre très grand de possibilités. Ainsi pour le peptide 1, il existe 37 748 736 oligonucléotides possibles. Ce très grand nombre de possibilités rend totalement improbable la réussite d'une amplification P.C.R. efficace et spécifique sans qu'un choix préalable ait été effectué.

Les expériences de purification de la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* ont montré que celle-ci est une protéine assez abondante dans le cytoplasme, puisqu'elle représente environ 0,3 % des protéines. Anderson et Kurland (1990) ont montré que chez de nombreux microorganismes procaryotes et eucaryotes, il existe une bonne corrélation entre l'abondance d'une protéine et les codons utilisés dans le gène correspondant. Dans une étude récente sur l'utilisation des codons dans différents gènes de bactéries corynéformes, Malumbres *et al.* (1993) ont défini des codons dits « préférés », ceux les plus utilisés dans les gènes fortement exprimés. Sur cette base, en excluant autant que possible les codons Valine (V) et Leucine (L) pour lesquels aucun choix ne pouvait être fait, nous avons retenu les deux oligonucléotides suivants :

CMC2	5'	ATCGATATCGATGATTACATGGGTAC	3'
		C C C	
CMN3	5'	ACCTGTGGGTTCAGAAAGGT	3'

L'oligonucléotide CMC2 (6 séquences possibles) a été défini à partir du peptide 2, l'oligonucléotide CMN3 (1 seule séquence) à partir du peptide 3 de la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola*. D'après la séquence de *M. tuberculosis*, le fragment d'ADN attendu par P.C.R. à partir de ces deux oligonucléotides est de 193 paires de bases.

Les oligonucléotides de synthèse CMC2 et CMN3 ont donc été utilisés pour l'amplification par P.C.R. d'un fragment d'ADN chromosomique de *C. melassecola*. L'analyse sur gel du résultat de l'expérience a montré qu'un fragment d'environ 200 paires de bases est obtenu, taille correspondant à notre attente, aux incertitudes expérimentales près. Ce fragment

d'ADN a été purifié, puis inséré par ligature dans le vecteur de clonage pGEM-T, donnant ainsi naissance au plasmide pHL1.

La séquence nucléotidique du fragment d'ADN, obtenu par P.C.R., inséré dans pHL1, a alors été déterminée. La comparaison de la séquence en acides aminés, déduite de la séquence en nucléotides de ce fragment d'ADN, avec celle d'autres lipoamide déshydrogénases connues, montre clairement que le fragment d'ADN obtenu correspond bien à un fragment de gène *lpd*.

V.2.2. Criblage de la banque d'ADN de *C. melassecola*.

La banque d'ADN chromosomique de *C. melassecola* ATCC 17965 que nous avons utilisée pour l'isolement du gène *lpd* a été construite par A. Guyonvarch (Reyes *et al.*, 1991). Elle a été obtenue par insertion au site *Bcl* I du plasmide pUN121 (Nilsson *et al.*, 1983) de fragments d'ADN chromosomique de *C. melassecola* issus d'une digestion ménagée par l'endonucléase *Mbo* I, et transformation de la souche de *E. coli* DH5 α par les plasmides recombinants. La taille des fragments d'ADN chromosomique de *C. melassecola* insérés dans pUN121 varie théoriquement de 6 à 15 kb. La banque a été construite initialement de sorte qu'un fragment quelconque d'ADN de 6 kb ait 99,99 % de chances d'être représenté au moins une fois. Par commodité d'utilisation, cette banque a été ordonnée clone par clone, conservée sous glycerol à -80 °C, dans des plaques de microtitration de 96 puits. Une réplique de la banque ordonnée a également été effectuée sur des membranes d'hybridation ADN/ADN. Cette banque est également disponible sous forme d'un mélange de plasmides.

Cette banque a été utilisée auparavant avec succès, pour le clonage des gènes *glt* A (Reyes *et al.*, 1991), *gdh* A (Labarre *et al.*, 1993), *pro* A (Serebrijski *et al.*, 1995), *csp* 1 (Joliff *et al.*, 1992), *csp* B (Peyret *et al.*, 1993), *mal* E (M.F. Baucher, communication personnelle), *fda*, *ppc*, *icd*, *pro* B, *pro* C (A. Guyonvarch, communication personnelle), *sod*, *dcp* (M. Merkamm, communication personnelle) de *C. melassecola*.

Le plasmide pHL1 décrit précédemment (V.2.1) a été soumis à une digestion par l'endonucléase de restriction *Bst* ZI. Un fragment d'ADN de 200 paires de bases environ

correspondant à l'amplifiat P.C.R. a alors été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose, puis marqué au ^{32}P par incorporation de nucléotides radioactifs. La sonde radioactive ainsi obtenue a été utilisée pour révéler, par hybridation sur colonies puis autoradiographie, les clones de *E. coli* contenant un plasmide recombinant porteur d'une séquence présentant une homologie totale ou partielle à la séquence de la sonde.

De la sorte, quatre clones répondant positivement, nommés 1B8, 1C9, 4H8 et 3E3, ont été identifiés en première instance. A partir du stock glycerolé, les quatre clones ont été réisolés sur boîte de Pétri. Pour chacun, plusieurs sous clones ont été transférés sur membrane d'hybridation et soumis à une nouvelle hybridation ADN/ADN avec la sonde décrite précédemment. Cette deuxième expérience permet de confirmer les résultats précédents et d'obtenir un matériel biologique non contaminé.

V.2.3. Analyse du contenu plasmidique des clones retenus

Afin de sélectionner le plasmide recombinant à partir duquel la détermination de la séquence nucléotidique du locus *lpd* pouvait être effectuée, les plasmides se répliquant dans les cellules des clones 1B8, 1C9, 4H8 et 3E3 ont été purifiés. Une analyse rapide par les endonucléases de restriction *Hind* III, *Eco* RI, *Sac* I, *Sma* I et *Pst* I a montré que les plasmides extraits des clones 1B8 et 1C9 sont identiques. Les plasmides extraits des clones 4H8 et 3E3 sont également identiques entre eux.

Le plasmide extrait du clone 1B8 a été nommé pHL2. La taille du fragment d'ADN chromosomique contenu dans pHL2 est estimée à 11,4 kb.

Le plasmide extrait du clone 4H8 a été nommé pHL3. La taille du fragment d'ADN chromosomique contenu dans pHL3 est estimée à 6,4 kb.

Des digestions par les endonucléases de restriction *Hind* III, *Eco* RI, *Sac* I, *Sma* I et des double digestions par *Hind* III et *Eco* RI d'une part, *Eco* RI et *Sac* I d'autre part, ont été réalisées sur les plasmides pHL2 et pHL3. Les fragments d'ADN issus de ces digestions ont été transférés sur membrane et soumis à une hybridation ADN/ADN, la sonde utilisée étant celle décrite précédemment pour le criblage sur colonies. L'autoradiographie obtenue (Figure 46)

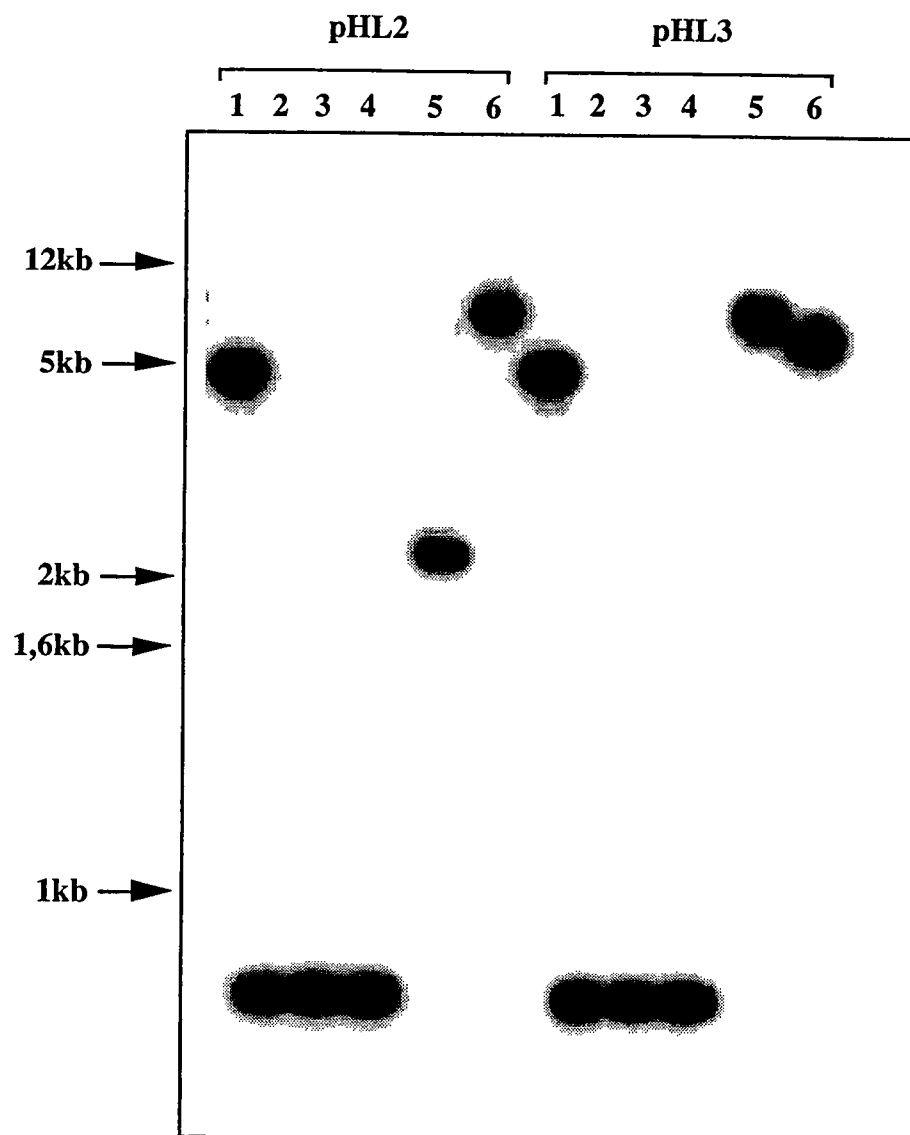


Figure 46. Hybridation ADN / ADN entre pHL2, pHL3 et la sonde *lpd* isolée de pHL1.

Enzymes de restriction employées:

- | | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| 1) <i>Hind</i> III | 4) <i>Eco</i> RI <i>Sac</i> I |
| 2) <i>Hind</i> III <i>Eco</i> RI | 5) <i>Sac</i> I |
| 3) <i>Eco</i> RI | 6) <i>Sma</i> I |

montre clairement que les plasmides pHL2 et pHL3 contiennent bien une séquence d'ADN homologue au fragment utilisé comme sonde *lpd*, et que les fragments d'ADN chromosomique contenus dans pHL2 et pHL3 se recouvrent au moins partiellement.

V.2.4. Origine des fragments clonés

Avant de progresser dans l'analyse moléculaire, il était nécessaire de s'assurer que les plasmides recombinants pHL2 et pHL3 contenaient bien des fragments d'ADN issus du chromosome de *C. melassecola* ATCC 17965. Ceci a été vérifié par la méthode de Southern (1975). Pour cela, les ADN des plasmides pHL2 et pHL3, les ADN chromosomiques de *C. melassecola* ATCC 17965 et de *E. coli* DH 5 α , ont été dans un premier temps coupés par l'endonucléase de restriction *Pst* I. Les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis transférés sur une membrane d'hybridation ADN/ADN. Un fragment d'ADN de 700 paires de bases environ, obtenu par digestion de pHL2 par *Eco* RI, commun aux plasmides pHL2 et pHL3 (Figure 46), a été utilisé comme sonde après marquage radioactif. L'autoradiographie de la membrane après hybridation ADN/ADN (Figure 47) montre clairement que les fragments d'ADN portés par pHL2 et pHL3 ont bien comme origine l'ADN chromosomique de *C. melassecola*.

V.3. Détermination de la séquence nucléotidique du locus *lpd* de *C. melassecola*.

Partant du principe que le plasmide pHL2, porteur du plus grand fragment d'ADN chromosomique de *C. melassecola*, parmi les deux plasmides retenus, avait le plus de chances de contenir la totalité du locus *lpd*, la détermination de la séquence nucléotidique de ce locus a été entamée à partir de ce plasmide.

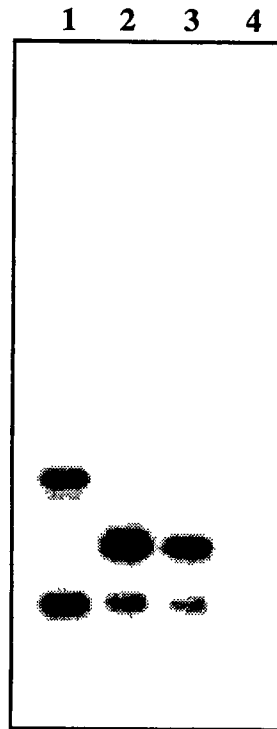


Figure 47. **Hybridation par la méthode de Southern.**

1) pHL2

2) pHL3

3) ADN chromosomique de *Corynebacterium melassecola*

4) ADN chromosomique d'*E. coli*.

Rapidement, il s'est avéré que le plasmide pHL2 ne contient pas la totalité du locus *lpd* (Figure 48(a)), ce qui nous a amenés à compléter le séquençage de celui-ci par la détermination d'une partie de la séquence nucléotidique du fragment contenu dans pHL3. Nous avons également constaté que pHL3 ne contient pas non plus le locus entier (Figure 48(a)). Le séquençage du fragment inséré dans pHL1, et d'une partie des plasmides pHL2 et pHL3, nous a cependant permis, suivant la stratégie résumée sur la Figure 48 (b), d'établir la séquence nucléotidique continue d'un fragment bicaténaire de 2 667 paires de bases, devant correspondre à la séquence du locus *lpd* de *C. melassecola*. A partir de cette séquence, représentée en partie sur la Figure 49, une carte de restriction sommaire du locus a été établie (Figure 48 (c)).

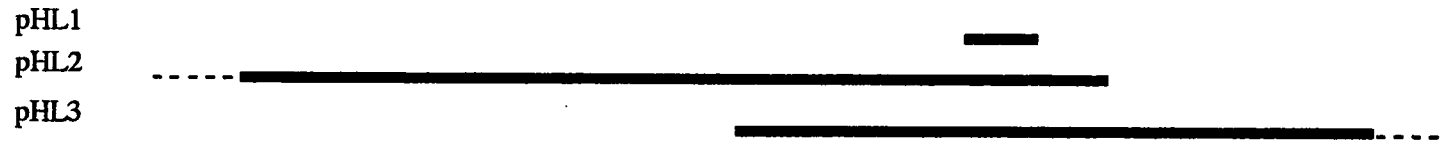
Si les parties de séquence du locus *lpd*, déterminées à la fois à partir de pHL2 et pHL3 sont homologues à 100%, malgré les résultats non ambigus de notre analyse par la méthode de Southern, la possibilité existait cependant que les fragments de pHL2 et de pHL3 appartiennent à des loci *lpd* différents. En effet, chez certaines espèces bactériennes comme *Pseudomonas putida*, l'existence de plusieurs gènes *lpd* a été démontrée, codant pour des lipoamide déshydrogénases présentant de très fortes similitudes, impliquées dans des réactions différentes (Palmer *et al.*, 1991a et b). Ainsi chez *P. putida*, le gène *lpd* G code le composant E3 des complexes pyruvate et α -cétoglutarate déshydrogénases ainsi que le facteur L du système d'oxydation de la glycine, le gène *lpd* Val code la lipoamide déshydrogénase du complexe multienzymatique cétoacide déshydrogénase impliqué dans la voie de biosynthèse des acides aminés branchés, le gène *lpd* 3 codant une lipoamide déshydrogénase de rôle inconnu actuellement.

Pour établir définitivement l'appartenance des fragments d'ADN chromosomique de *C. melassecola*, contenus dans pHL2 et pHL3, à un locus *lpd* unique, une expérience d'amplification par P.C.R. a été entreprise. Sur la base de la séquence nucléotidique déterminée, deux oligonucléotides de synthèse ont été définis. Il s'agit des oligonucléotides décrits ci-dessous :

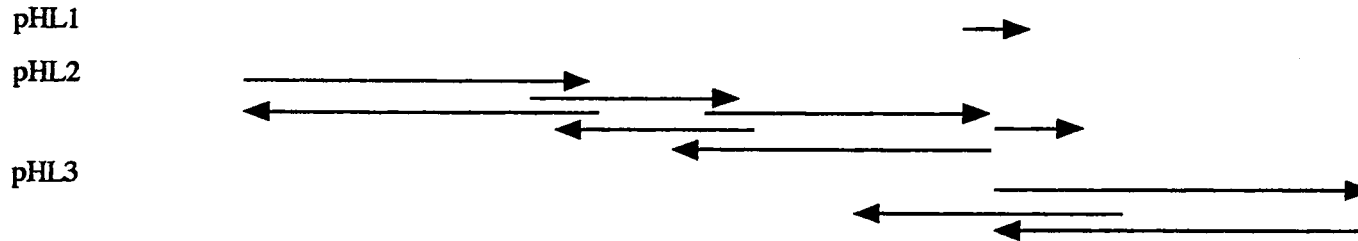
CH1 5' CCTTGAATGCATGGCTGAACATTATG 3'

CH2 5' GGCCATGACGGTATCGACTTTTTAG 3'

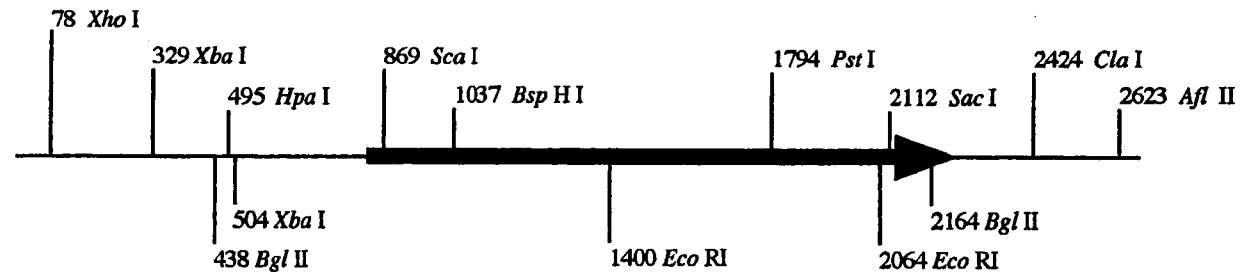
a) Fragments clonés dans



b) Fragments séquencés



c) Carte du locus séquencé



ADN de *C. melassecola*



Fragments séquencés



Phase ouverte de lecture



Echelle : 0,5 kb



Figure 48. Stratégie de séquençage et carte de restriction du locus *lpd* de *Corynebacterium melassecola*.

L'oligonucléotide CH1 a été défini d'après une séquence déterminée à partir de pHL2, absente de pHL3. Il correspond à une séquence sur le brin codant située entre les nucléotides 551 et 576 de la séquence décrite Figure 49.

L'oligonucléotide CH2 a été défini d'après une séquence déterminée à partir de pHL3, absente de pHL2. Il correspond à une séquence sur le brin non codant située entre les nucléotides 2125 et 2101 de la séquence décrite Figure 49.

Une amplification par P.C.R., l'ADN chromosomique de *C. melassecola* étant utilisé comme matrice, les oligonucléotides CH1 et CH2 comme amorces, a été réalisée. Un fragment d'ADN unique de 1600 paires de bases environ, taille attendue, est obtenu. Ce résultat permet de confirmer l'appartenance des fragments d'ADN chromosomique contenus dans pHL2 et pHL3 au même locus de *C. melassecola*. En effet, dans le cas de deux fragments appartenant à des loci différents et éloignés, aucune amplification n'aurait été obtenue. Dans le cas de deux loci proches, agencés de sorte à ce qu'une amplification P.C.R. puisse avoir lieu avec les oligonucléotides utilisés, le fragment d'ADN obtenu n'aurait certainement pas eu la taille attendue.

V.4. Analyse de la séquence du locus *lpd* de *C. melassecola*

La séquence nucléotidique du locus *lpd* de *C. melassecola*, représentée Figure 49, comporte 48,5 % de G+C, valeur assez éloignée de celle évaluée par Malumbres *et al.* (1993) pour les bactéries corynéformes productrices d'acide glutamique (55,89 % pour *C. glutamicum*). Il faut cependant noter que l'évaluation de Malumbres *et al.* (1993) ne repose que sur l'étude des phases ouvertes de lecture d'un nombre relativement limité de gènes, et qu'un locus particulier peut très bien présenter un tel écart à la moyenne.

Figure 49. Séquence nucléotidique du gène *lpd* de *Corynebacterium melassecola* et séquence déduite en acides aminés.

TTTGGAACTCTTAAAACGAAATATGCTGCGTGAGTGCAACGAGCTTAGAGCTTCAAGATTGACCCCCACACAGCTAGAC	80
GCGCTAGGTCGGGTATTTAAGCATCAGTCCTATGGAATGTATCAGTACGCTGTTTCAAGGGGTCCAGGTACGAAGATCTA	160
AAATTCTCTAGGTTAATATCCGCTTCAGTGGGTAACCTTTATGCCACCTGTAAACATTTCTAGAGATTCAAACGTTAAGA	240
CAGCTATAGGTTAATTAGATTTGACTATCAACTGAAATCTACCTGACTGTAATAAGGATAGTGGCTGATGTACCAG	320
ATTTTTGAGCAGATTTTGTTCGCCATCAATGAGATTTTGGGCTACGGCCTTCACGCAGGTTCTCTGCTTCAAGCAACCT	400
GTCACACGGCATCGGACTGTTCTGATAACCAGCAGTTGTTTCGCAAGAAAGCTCACGATTTCAACATCGTGGGCTTTCTTG	480
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> → ← </div>	
TTCCCCCATTTAGTGTGGATTGTTTCTTCTGTGGACCACGTGCACGACAAGACAATCCATAAACACGTATCCTTGAATGC	560
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> -35 -10 +1 </div>
GTG ACT GAA CAT TAT GAT GTA GTA GTA CTC GGA GCG GGC CCC GGT GGC TAC GTC TCC GCC	620
V T E H Y D V V V L G A G P G G Y V S A	20
ATC CGC GCG GCC CAG CTT GGC AAG AAG GTT GCT GTT ATT GAG AAG CAG TAT TGG GGT GGT	680
I R A A Q L G K K V A V I E K Q Y W G G	40
ATC TGC CTT AAC GTT GGC TGC ATT CCT TCC AAG TCT CTG ATC AAA AAC GCT GAG GTT GCC	740
I C L N V G C I P S K S L I K N A E V A	60
CAT ACC TTT ACT CAT GAG AAG AAG ACC TTC GGC ATT AAC GGC GAA GTT ACC TTC AAC TAC	800
H T F T H E K K T F G I N G E V T F N Y	80
GAG GAC GCG CAC AAG CGT TCC CGT GGC GTT TCT GAC AAG ATC GTC GGT GGC GTT CAC TAC	860
E D A H K R S R G V S D K I V G G V H Y	100
CTG ATG AAG AAG AAC AAG ATC ACC GAA ATC CAC GGT CTT GGT AAC TTC AAG GAT GCA AAG	920
L M K K N K I T E I H G L G N F K D A K	120
ACC ATT GAG GTA ATT GAC GGT AAG GAT GCC GGC AAG ACT GTT ACT TTT GAT GAC TGC ATC	980
T I E V I D G K D A G K T V T F D D C I	140
ATT GCA ACT GGT TCT GTT GTG AAT ACC CTT CGT GGC GTT GAG TTT TCT AAG AAC GTT GTT	1040
I A T G S V V N T L R G V E F S K N V V	160
TCC TTC GAA GAG CAG ATC CTT GAT CCT GTT GCA CCT AAG AAG ATG GTT ATC GTT GGT GCT	1100
S F E E Q I L D P V A P K K M V I V G A	180
GGC GCA ATC GGC ATG GAA TTC GCT TAC GTT CTC GGC AAC TAC GGT GTC GAT GTA ACT GTC	1160
G A I G M E F A Y V L G N Y G V D V T V	200
ATC GAG TTC ATG GAT CGC GTT CTT CCA AAC GAA GAT GCT GAG GTC TCC AAG GTT ATT GCT	1220
I E F M D R V L P N E D A E V S K V I A	220

AAG GCT TAC AAG AAG ATG GGC GTT AAG CTC CTT CCT GGC CAC GCA ACC ACC GCG GTT CGT K A Y K K M G V K L L P G H A T T A V R	1280 240
GAC AAT GGT GAT TCT GTT GAG GTT GAT TAC CAG AAG AAG GGC TCT GAC AAG ACT GAG ACC D N G D S V E V D Y Q K K G S D K <u>T E T</u>	1340 260
CTC ACT GTT GAT CGC GTC ATG GTT TCC GTT GGT TTC CGC CCA CGT GTT GAG GGC TTC GGC <u>L T V D R V M V S V G F</u> R P R V E G F G	1400 280
CTA GAG AAC ACC GGC GTT AAG CTC ACC GAG CGT GGC GCA ATT GAC ATC GAC GAT TAC ATG L E N T G V K <u>L T E R G A I D I D D Y M</u>	1460 300
CGT ACC AAC GTT CCT GGC ATC TAC GCT ATC GGT GAC GTC ACC GCT AAG CTG CAG CTT GCT <u>R T N V P G</u> I Y A I G D V T A K L Q L A	1520 320
CAC GTC GCA GAA GCA CAG GGC ATT GTT GCT GCT GAG ACC ATC GCT GGT GCA GAG ACC CAG H V A E A Q G I V A A E T I A G A E T Q	1580 340
ACC CTG GGC GAT TAC ATG ATG ATG CCT CGC GCA ACG TTC TGT AAC CCA CAG GTT GCT TCC T L G D Y M M M P R <u>A T F C N P Q V A S</u>	1640 360
TTC GGT TAC ACC GAG GAG CAG GCT AAG CAG AAG TGG CCT GAT CGT GAG ATC AAG GTT GCG <u>F G Y T E E Q A K</u> Q K W P D R E I K V A	1700 380
TCC TTC CCA TTC TCT GCA AAC GGT AAG GCA GTC GGC CTG GCT GAG ACC GAT GGC TTC GCA S F P F S A N G K A V G L A E T D G F A	1760 400
AAG ATC GTT GCG GAT GCT GAA TTC GGT GAG CTG CTC GGT GGA CAC CTC GTT GGT GCA AAC K I V A D A E F G E L L G G H L V G A N	1820 420
GCT TCT GAG CTC ATC AAC GAA CTG GTT CTG GCA CAG AAC TGG GAT CTC ACC ACT GAG GAG A S E L I N E L V L A Q N W D L T T E E	1880 440
ATC TCA CGC AGC GTT CAC ATT CAC CCA ACG CTG TCT GAA GCT GTT AAG GAA GCC GCT CAC I S R S V H I H P T L S E A V K E A A H	1940 460
GGT ATT TCC GGA CAC ATG ATC AAC TTCTAGTTCGAAGATTCAAAGGCCCTGATTGTAAGTCAATCAGGGC G I S G H M I N F → ←	2012 469
<u>TTTTTCTTTGGTTTTCT</u> GAAGTTATAACTGACTTTTTTATTAAGTGTTCATGTTACATAAACTATCCGCTGTCAAGAA	2092
GAATTATTCTAAAAAGTCGGTATCGTCATGGCCTATGAGTTTGCCAATCGATGAGCATCAAAATGCTGTAAAAACTGTTG	2172

Promoteur : ACGACA...TATCCT...G
 -35 -10 +1

Palindromes :
→
←

Poly T :

Peptides séquencés :

L'analyse de cette séquence révèle la présence de plusieurs phases ouvertes de lecture possibles, une seule ayant des caractéristiques compatibles avec celles que nous attendons pour la lipoamide déshydrogénase.

V.4.1. Analyse de la phase ouverte de lecture codant la lipoamide déshydrogénase.

La séquence en acides aminés de la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* a été déduite de la séquence nucléotidique du locus séquencé. La séquence de cette enzyme est représentée sur la Figure 49. La phase ouverte de lecture (O.R.F.) choisie s'étend sur 1407 nucléotides, du nucléotide 561 au nucléotide 1967. Elle comporte 52,2 % de G+C, valeur se rapprochant de celle proposée par Malumbres *et al.* (1993) pour les phases ouvertes de lecture de *C. glutamicum*. Cette O.R.F. contient 469 codons et se termine par le codon stop TAG.

Le choix de cette O.R.F. a été dicté par les considérations suivantes :

La protéine déduite aurait un poids moléculaire de 50 478 Da, valeur proche de celle mesurée sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (Figure 39) pour la lipoamide déshydrogénase purifiée (53,8 kDa).

Les trois peptides séquencés à partir de l'enzyme purifié sont retrouvés intégralement dans la séquence déduite (Figure 49).

La séquence protéique déduite présente sur toute sa longueur de très fortes similitudes avec les lipoamides déshydrogénases de *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), *Bacillus subtilis* (Hemila *et al.*, 1990), *Pseudomonas putida* (Palmer *et al.*, 1991a), *Azotobacter vinelandii* (Westphal et de Kok, 1988) et *Escherichia coli* (Stephens *et al.*, 1983) comme le montre la Figure 50, mais aussi de *Mycobacterium leprae* (Smith, 1994), *Bacillus stearothermophilus* (Hawkins *et al.*, 1990), *Zymomonas mobilis* (Bringer-Meyer *et al.*, 1996), *Klebsiella pneumoniae* (Peng *et al.*, 1996), *Ralstonia eutropha* (Hein et Steinbuchel, 1996), *Mycoplasma capricolum* (Zhu et Peterkofsky, 1996), *Staphylococcus aureus* (Hemilae, 1991), *Haloferax volcanii* (Vettakkorumakankav *et al.*, 1992), *Chlorobium vibrioforme* (Petersen *et al.*, 1996), *Pseudomonas fluorescens* (Benen *et al.*, 1989), *Chlamydia trachomatis*

```

| | | * | * * * * | * * | * | * | * * | * | * * * * * * * * * * | * | | |
C V-----TEHYDVVVVLGAGPGGYVSAIRAAQLGKKVAVIEKQY-----WGGICLVNVCIPSKSLIKNAEVAHTFTHEK
M M-----T-HYDVVVVLGAGPGGYVAAIRAAQLGLSTAIVEPKY-----WGGVCLNVCIPSKALLRNAELVHIPTKDA
B MVVGFDFPIETDTLVIGAGPGGYVAAIRAAQLGQKVTVVEK--A-----TLGGVCLNVCIPSKALI---NAGHRYENAK
P M-----TQKFDVVVIGAGPGGYVAAIKAAQLGLKTACIEK-YTDAEGKLALGGTCLNVCIPSKALL---DSSWKYKEAK
A M-----SQKFDVIVIGAGPGGYVAAIKSAQLGLKTALIEK-YKREGKLTALGGTCLNVCIPSKALL---DSSYKFHEAH
E MMSTE--IKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLLETVIVER-YN-----TLGGVCLNVCIPSKALL---HVARVIEEAK

* | | | | | | | * | | * | | * | | || | * | | * | | * | | * | | * | | * | | * | |
C KTFGING----EVTFNYEDAHRKSRGVSDDKIVGGVHYLMKKNKITEIHGLGNFKDAKTIEVIDGKDAGKTVTFDDCIIAT
M KAFGISG----EVTFDYGIAYDRSRKVAEGRVAGVHFLMKKNKITEIHGYGTFADANTLLVDLNDGGTESVTFDNIIAT
B HS--DDMGITAENVTVDFTKVQEWKASVVNKLGGVAGLLKGNKVDVVKGEAYFVDSNSVRVM--DENSAQTYTFKNAIIAT
P ESPNVHGISTGEVKMDVAAMVGRKAGIVKNLTGGVATLFRKANGVTSIQGHGKLLAGKKEVETKADGTTEVIEAENVILAS
A ESFKLHGISTGEVAIDVPTMIARKDQIVRNLTGGVASLIKANGVTLFEGHGKLLAGKKEVETAADGSSQVLDTEENVILAS
E AL--AEHGIVFGPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAGMAKGRKVKVNVNGLGKFTGANTLEVE--GENGKTVINFDNAIIAA

** | | | | * | * | | * | * * * | | * | | | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
C GSVVNTLRGVEFSKNVVSFEEQILD-PVAPKKNVIVGAGAIGMEFAYVLGNYGVDVTVIEFMDRVLPNEDAESKVIKA
M GSSTRLVPGTSLSANVVTYEEQILS-RELPSKIIAGAGAIGMEFGYVLKNYGVDVTVIEFPLRALPNEDADVSKIEKQ
B GSRPIELPNFKYSE-RVLNSTGALALKEIPKLVVIGGGYIGTELGTAYANFGTELVIILEGGDEILPGFERQMSLVTRR
P GSRPIDIPPAPVDQNVIVDSTGALEFQAVPKRLGVIGAGVIGLELGSVWARLGAETVLEALDFTLMAADTAVSKEAQKT
A GSKPVEIPPAPVDQDVIVDSTGALDFQNVPGKLVIGAGVIGLELGSVWARLGAETVLEAMDKFLPAVDEQVAKAQKI
E GSRPIQLPFIHPEDPRIWSTDALDELKEVPERLLVMGGGIIGLEMGTVYHALGSQIDVVMFDDQVIPAADKDIVKVFTKR

* | | | | | * | | | | * | * | | * | | | * | | * | | * | | * | | * | | * | | * | |
C YKRMG-VKLLPGHATTAVRDNGDSVEVDYQKKGSDKTETLTVDRVMVSVGFRPRVEGFGLENTGVKLTERRGAIDIDDYMR
M FKRLG-VTILTATKVESIADGGSQVTVTVTKDGV--AQELKAQKVLQAIQFAPNVEGYGLDKAGVALTDRKAIQVDDYMR
B LKKKNVEIHTNAMAKGVEERPDGVTVTFEVKG--EECTVDA-DYVLITVGRRPNTDELGLEQVGIEMTDRGIVKTDKQCR
P LTKQG-LDIKLGARVTGSKVNGNEVEVTV-TNA-EGEQKITFDKLIQVAVGRRPVTTDLAADSQVTTIDERGYIFVDDYCA
A LTKQG-LKILLGARVTGTEVKNKQVTVKF-VDA-EGEKSAQAFDKLIVAVGRRPVTTDLAADSQVTTLDERGFIVDDYCA
E ISKKNLMLLETK--VTAVEAKEDGIYVTMEGKK--APAEPQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDRGFIRVDKQLR

* | * | | * * * * | * | * * * | | * | | * | * * * | | | | | | | | * * | | | |
C TNVPGIYAIGDVTAKLQLAHVAEAQGIVAETIAGAETQTLGDYMMMPRATFCNPQVASFQYTEEQAKQKWPDRKIKVAS
M TNVGHIIYAIGDVNGLLQLAHVAEAQGVAAETIAGABTLTLGDHRMLPRATFCQPNVASFGLTEQQARNE--GYDVVAK
B TNVNIYAIGDIIIEGPPLAHKASYEGKIAAEIAGEPAEI--DYLGIQAVVFSEPELASVGYTEAQAKEE--GLDIVAAK
P TSPVGVYAIGDVVRGMMLAHKASEEGIMVVERIKGHKAQM--NYDLIPSVIYTHPEIAWVGKTEQALKAE--GVEVNVGT
A TSPVGVYAIGDVVRGAMLAHKASEEGVVAERIAGHKAQM--NYDLIPAVIYTHPEIAGVGKTEQALKAE--GVAINVGV
E TNVPHIFAIGDIVGQPMLAHRGVHEGHVAAEVIAGKKHYF--DPKVIPSIAYTEPEVAWVGLTEKEAKEK--GISYETAT

** | * | | * | * * * | | * | * | | | | * | | | | | | | * * | | * | *
C FPFSAANGKAVGLAETDGFQKIVADADEFGLLGGHLVGANASELINELVLAQNWDLTTEEISRSVHIHPTLSEAVKEAAHG
M FPFANAKAHGVDPSGFVKLVADAKHGELLGGHLVGHVDAELLPELTLAQRWOLTASELARNVHTHPTMSEALQECFPHG
B FPFANGRALSLNETDGFVKLITRKEGDLVIGAQIAGASASDMISELSLAIIEGGMTAEDIAMTIAHPTLGEITMEAAEV
P FPFASGRAMAANDTGGFVKVIADAKTDRVLGVHVI GPSAAELVQOGAIAAMEFGTSAEDLGMMVFSHPTLSEALHEAALA
A FPFASGRAMAANDTAGFVKVIADAKTDRVLGVHVI GPSAAELVQOGAIAAMEFGTSAEDLGMMVFAHPALSEALHEAALA
E FFWAASGRAIASDCADGMTKLIQDKESHVIGGAIIVGTNGGELLGEIGLAIEMGCDIAEDIALTIHAHPTLHESVGLAAEV

* | | |
C ISGHMINF Corynebacterium melassecola
M LVGHMINF Mycobacterium tuberculosis
B AIGSPIHIV-----K Bacillus subtilis
P VNGGAIHVANRK--KR Pseudomonas putida
A VSGHAIHVANRK--K Azotobacter vinelandii
E FEGSITDLPNPKAKK Escherichia coli

```

Acides aminés identiques (*)

Acides aminés similaires (|)

Figure 50. Comparaison des séquences de lipoamide déshydrogénases bactériennes.

(Stephens *et al.*, 1998), *Rhodobacter capsulatus* (Dastoor *et al.*, 1997), *Haemophilus influenzae* (Fleishmann *et al.*, 1995), *Vibrio parahaemolyticus* (Mc Carter, 1998), *Pelobacter carbinolicus* (Oppermann et Steinbacher, 1994) et *Clostridium magnum* (Kruger *et al.*, 1994).

Un problème s'est cependant posé quant à la détermination du codon d'initiation de la traduction. Celui que nous avons choisi est le codon GTG en position 561-563 sur la Figure 49 pour les raisons suivantes :

Une vérification scrupuleuse de la séquence nucléotidique a été effectuée afin d'écartier la possibilité d'une erreur triviale de séquençage.

Aucun codon ATG ou GTG en amont du codon retenu ne se trouve dans la même phase de lecture ouverte.

Les codons ATG ou GTG en aval sont localisés de sorte que des sites catalytiques importants ne seraient pas présents sur l'enzyme (Figures 49 et 52).

La zone de similitude entre la séquence déduite et celles d'autres lipoamide déshydrogénases débute deux acides aminés en aval de ce GTG (Figure 50)

Enfin, alors que nous avons prévu d'effectuer le séquençage de l'extrémité N-terminale de l'enzyme purifié, nous avons appris que l'équipe du Prof. Eikmanns avait réalisé cette expérience. Leurs résultats confirment notre choix et la séquence N-terminale de la lipoamide déshydrogénase sur 15 acides aminés.

Il est à noter qu'aucune séquence de fixation des ribosomes n'est cependant identifiée juste en amont de ce GTG.

Une étude a été menée sur la répartition numérique des codons utilisés au sein de la phase ouverte de lecture correspondant à la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* (Figure 51). En première approximation, l'on constate que les codons les plus utilisés dans l'O.R.F. codant la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* sont les plus utilisés dans les O.R.F. des gènes de *C. glutamicum* étudiés par Malumbres *et al.* (1993), à l'exception notable des codons valine GTC et GTG, et du codon Aspartate GAC. Suivant les données de l'étude menée par Malumbres *et al.* (1993), le calcul du rapport (P/T) du nombre de codons utilisés de préférence chez les bactéries corynéformes, présents dans l'O.R.F. de la lipoamide

	a	b		a	b		a	b		a	b				
Phe	TTT	3	94	Ser	TCT	9	178	Tyr	TAT	2	71	Cys	TGT	1	19
	TTC	15	346		TCC	9	385		TAC	11	271		TGC	3	66
Leu	TTA	-	39		TCA	1	68	Och	TAA	-	26	Opa	TGA	-	3
	TTG	-	211		TCG	-	57	Amb	TAG	1	5	Trp	TGG	3	111
Leu	CTT	8	216	Pro	CCT	7	141	His	CAT	3	50	Arg	CGT	8	214
	CTC	9	265		CCC	1	72		CAC	10	232		CGC	6	399
	CTA	1	68		CCA	5	261	Gln	CAA	-	92		CGA	-	49
	CTG	9	401		CCG	-	78		CAG	11	289		CGG	-	24
Ile	ATT	11	222	Thr	ACT	9	122	Asn	AAT	2	85	Ser	AGT	-	24
	ATC	20	467		ACC	19	483		AAC	17	379		AGC	1	121
	ATA	-	3		ACA	-	56	Lys	AAA	1	84	Arg	AGA	-	9
Met	ATG	11	225		ACG	2	77		AAG	34	364		AGG	-	17
Val	GTT	36	359	Ala	GCT	20	449	Asp	GAT	17	382	Gly	GGT	20	313
	GTC	9	314		GCC	5	343		GAC	9	448		GGC	25	602
	GTA	5	99		GCA	15	521	Glu	GAA	11	465		GGA	3	178
	GTG	2	336		GCG	6	253		GAG	24	452		GGG	-	30

Figure 51. Utilisation des codons

a) codons utilisés dans la phase ouverte étudiée correspondant à la lipoamide déshydrogénase de *Corynebacterium melassecola*.

b) codons utilisées dans l'ensemble des O.R.F. étudiées par Malumbres *et al.* (1993).

déshydrogénase de *C. melassecola*, sur le nombre total de codons utilisés dans celle-ci a été effectué. Le rapport P/T pour la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* est de 0,781, ce qui place celle-ci dans les protéines correspondant aux gènes les plus exprimés parmi ceux étudiés, qui sont essentiellement ceux impliqués dans le métabolisme central (Malumbres *et al.*, 1993).

Enfin, nous avons cherché à identifier, au sein de la phase ouverte de lecture, des éléments structuraux caractéristiques. Une prédiction de la conformation secondaire de la protéine déduite de la séquence nucléotidique a été effectuée. La position des hélices alpha (α) et des feuilletts bêta (β) probables est représentée sur la Figure 52. La structure secondaire prédite pour la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* a été comparée à celle de l'enzyme correspondante d'*Azotobacter vinelandii*, pour laquelle une détermination expérimentale par cristallographie aux rayons X a été effectuée (Mattevi *et al.*, 1991). La position des structures secondaires prédites pour *C. melassecola* et celles déterminées pour *A. vinelandii* se superpose parfaitement, ce qui nous incite à croire en la fiabilité de la prédiction que nous avons effectuée. L'étude cristallographique de l'enzyme d'*A. vinelandii* nous a permis également de proposer, sur la séquence en acides aminés de notre protéine, une localisation pour les sites d'interaction entre la protéine et les différents cofacteurs impliqués dans la réaction enzymatique (Figure 52). Ainsi, le FAD interagirait au niveau des acides aminés 6 à 33 pour sa partie Adénine Dinucléotide, avec les acides aminés 278 à 288 pour sa partie Flavinique. Entre les acides aminés 41 et 46 se trouve le site disulfide contenant la cystéine site des oxydo-réductions. L'interaction avec la thiamine pyrophosphate se ferait au niveau des acides aminés 164 à 168. Enfin, le NAD interagirait par sa partie Adénine Dinucléotide entre les acides aminés 173 et 202, et le site réactionnel (Hong *et al.*, 1996) impliquerait l'histidine 448. Ces sites se trouvent majoritairement dans des zones de forte similitude entre les lipoamide déshydrogénases connues. On remarquera également que deux sites de fixation concernent les parties Adénine Dinucléotide de deux cofacteurs, le FAD et le NAD. Ces sites d'interaction entre une protéine et les parties Adénine Dinucléotide de cofacteurs ont été bien étudiés par Wierenga *et al.* (1986).

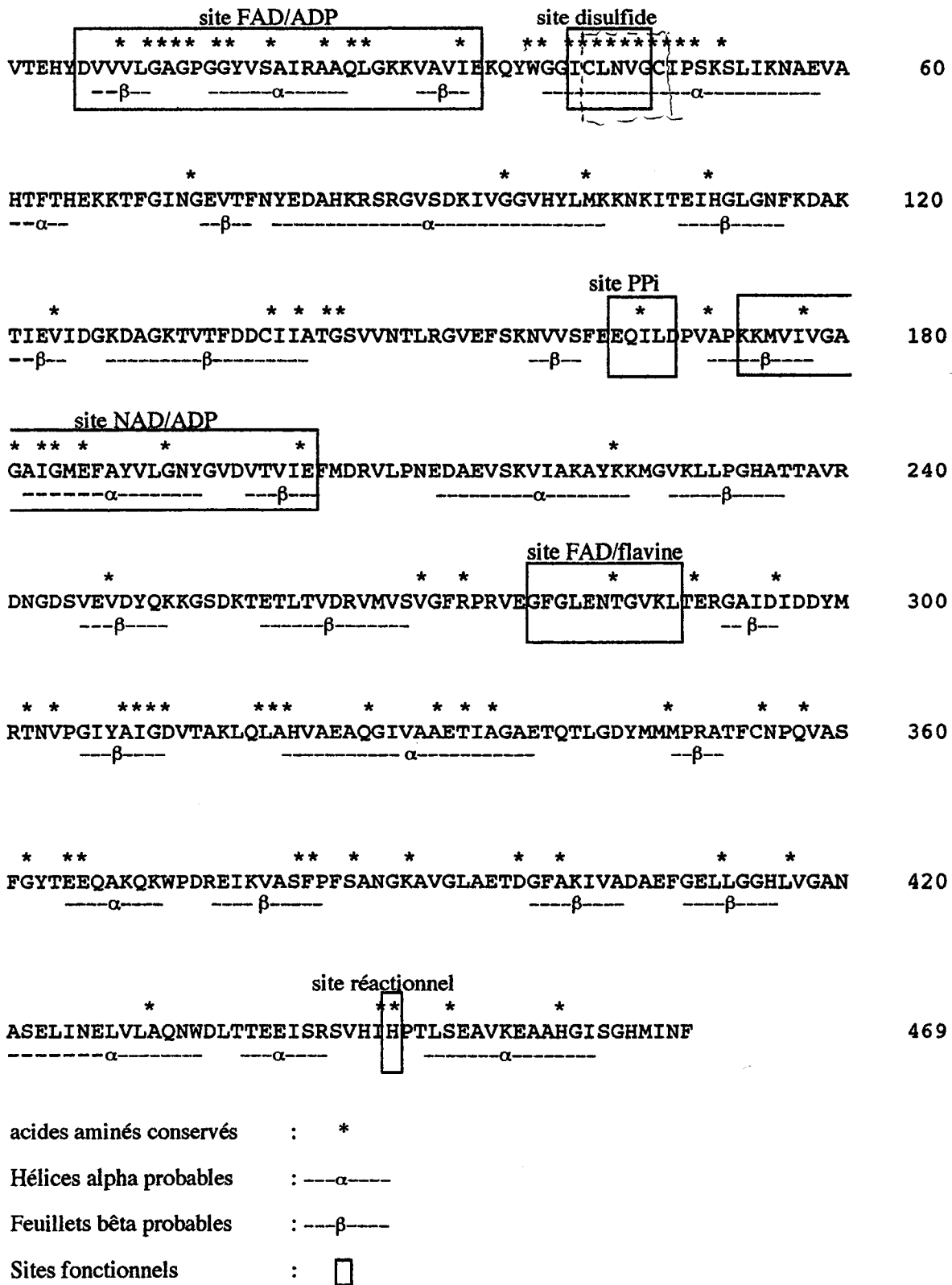


Figure 52. Caractéristiques structurales et fonctionnelles de la lipamide déshydrogénase de *Corynebacterium melassecola*

Ces sites ont toujours une structure secondaire constituée d'une succession feuillet β -hélice α - feuillet β , certains acides aminés, et l'écart entre eux, étant strictement conservés d'un site à l'autre. La lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* répond strictement à ce niveau à tous les critères sélectionnés par Wierenga *et al.* (1986).

V.4.2. Analyse de la partie 5' non traduite du gène *lpd*.

Comme nous l'avons vu précédemment, la partie 5' du gène *lpd* de *C. melassecola* a ceci de particulier qu'elle ne présente pas de séquence de fixation des ribosomes juste en amont du codon GTG d'initiation de la traduction. Il faut noter que nous avons pu nous en assurer, puisque le clonage et le séquençage de l'extrémité 3' des ARN 16S de *C. melassecola* ont été effectués au laboratoire (A. Guyonvarch, communication personnelle). La solution à cette curiosité a été apportée par l'analyse du gène de *C. glutamicum* par l'équipe du Professeur Eikmanns, qui a montré que le nucléotide +1 de la transcription se trouve être un G placé deux nucléotides en amont du codon GTG (Figure 49). Dans ce cas, il est bien sûr inutile de rechercher une séquence de fixation des ribosomes en amont du codon d'initiation de la traduction. Ce cas, s'il n'est pas fréquent, a cependant été décrit pour d'autres gènes comme par exemple les gènes *cro* et *cI* du bactériophage λ (Ptashne, 1986). En ce qui concerne les zones -10 et -35 du promoteur du gène *lpd* de *C. melassecola* et de *C. glutamicum*, elles ont été définies par rapport au nucléotide +1 déterminé expérimentalement par l'équipe Eikmanns. Elles sont cependant conformes en séquence nucléotidique à la séquence attendue pour un promoteur de *Corynebacterium* sp., d'après l'étude effectuée par Patek *et al.* (1996), essentiellement sur des promoteurs cartographiés de *C. glutamicum*. Enfin, on remarquera la présence d'une structure palindromique 60 nucléotides en amont du codon GTG (Figure 49). Cette structure ne semble pas correspondre au terminateur d'un gène qui se trouverait en amont de *lpd*, puisqu'aucune phase ouverte de lecture de taille supérieure à 25 codons n'est détectée dans les

560 nucléotides précédant le GTG. Cette structure pourrait avoir un rôle, qui reste à déterminer, dans le contrôle de l'expression du gène *lpd*.

V.4.3. Analyse de la partie 3' non traduite du gène *lpd*.

Immédiatement après le codon stop TAG, une séquence palindromique riche en nucléotides G et C, suivie d'une séquence de dix-huit nucléotides riche en nucléotides T est trouvée (Figure 49). Une telle structure peut être considérée d'après les travaux de Rosenberg et Court (1979), comme étant le terminateur de la transcription du gène *lpd* de *C. melassecola*. D'après ces auteurs, le terminateur de *lpd* serait de type ρ -indépendant. Il faut noter que l'équipe du Professeur Eikmanns a estimé, par hybridation ARN/ADN, la longueur de l'ARN messenger du gène *lpd* de *C. glutamicum* ATCC 13032 à $1,4 \times 10^3$ nucléotides environ. Cette longueur correspond bien à l'intervalle entre le site d'initiation de la transcription du gène et le terminateur présumé.

CONCLUSION

Comme nous l'avons vu lors de l'exposé bibliographique, un modèle global du métabolisme central de *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 a été établi par le travail coordonné de plusieurs équipes. Ce modèle repose sur la prise en compte d'une valeur P/O de deux, ce qui signifie que chaque mole de NADH_2 prise en charge par la chaîne respiratoire de cet organisme génère la synthèse de deux moles d'ATP. D'autre part, ce modèle décrit une synthèse excessive de NADH_2 . Il avait été proposé qu'une NADH oxydase cytoplasmique, du même type que celles décrites chez les bactéries lactiques, soit en charge de dissiper cet excès d'énergie.

Au cours de ce travail, la composition de la chaîne respiratoire de *C. melassecola* a été étudiée en suivant différentes approches complémentaires. Ainsi, l'étude de différents inhibiteurs spécifiques sur la respiration de cellules entières, l'étude de l'effet de ces inhibiteurs sur le transfert d'électrons au sein de membranes purifiées, des mesures enzymatiques, des études spectrophotométriques à basse température, ont permis d'identifier un certain nombre de composants de cette chaîne. Celle-ci semble contenir essentiellement deux NADH déshydrogénases, un complexe quinone oxydase du type *bc1* et deux oxydases terminales. Une succinate déshydrogénase pourrait également intervenir dans l'entrée d'électrons dans cette chaîne. L'organisation fonctionnelle potentielle de cette chaîne est proposée, sous forme d'une chaîne branchée. D'après les constatations de l'étude, le rendement énergétique de la chaîne respiratoire de *C. melassecola* pourrait varier en fonction de la voie empruntée majoritairement par les électrons, suivant l'état physiologique des cellules. Ainsi, le rapport P/O utilisé pour l'établissement du modèle métabolique est compatible avec notre proposition de chaîne branchée. Il est néanmoins vrai que des études supplémentaires sont indispensables à la détermination exacte de la séquence de transfert d'électrons au sein de cette chaîne, ainsi qu'à la détermination de la répartition des électrons entre les branches potentielles. Des analyses potentiométriques, des mutations dans les gènes codant les différents composants, apporteront ainsi des informations permettant de préciser l'organisation proposée.

Outre la fraction membranaire contenant les éléments de la chaîne respiratoire, l'étude a porté également sur le pouvoir d'oxydoréduction de la fraction cytosoluble des cellules de *C. melassecola*. Il a été ainsi montré clairement qu'aucune NADH oxydase du type de celle des

bactéries lactiques n'est présente à un niveau tel qu'elle puisse assumer seule la régénération des cofacteurs excédentaires. Cependant, de nombreuses oxydoréductases cytosolubles ont été mises en évidence, dont le rôle dans la modulation de l'efficacité énergétique de *C. melassecola* a été abordé. Parmi ces enzymes, une attention particulière a été portée à la lipoamide déshydrogénase, dont les caractéristiques ont été étudiées de manière approfondie (activité lipoamide déshydrogénase, activité NADH oxydoréductase, activité transhydrogénase). Il a été ainsi montré que cette enzyme est impliquée, non seulement dans les complexes pyruvate déshydrogénase et α -cétoglutarate déshydrogénase des voies métaboliques centrales, mais peut-être aussi dans le transfert d'électrons à la chaîne respiratoire. Les caractéristiques particulières de cette enzyme ont justifié le clonage et l'étude moléculaire du gène *lpd* correspondant. La vérification des hypothèses émises sur le rôle de cette enzyme demandera la réalisation de travaux supplémentaires de génétique reverse. D'après les résultats obtenus par l'équipe du Professeur Eikmanns, il semble impossible d'interrompre le gène *lpd*. La détermination du rôle du gène *lpd* demandera donc au préalable la mise au point d'outils permettant d'obtenir une interruption conditionnelle du gène. Cet outil pourrait d'ailleurs se révéler également indispensable à la détermination du rôle de certains composants de la chaîne respiratoire dans le transport d'électrons et la génération d'énergie chez *C. melassecola*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adinarayana-Reddy, C., Cornell, C.P., Kao, M.** (1977) Hemin-dependent growth stimulation and cytochrome synthesis in *Corynebacterium pyogenes*. *J Bacteriol.*, **130**: 965-967.
- Ahmed, I., Krishnamoorthy, G.** (1992) The non-equivalence of binding sites of coenzyme quinone and rotenone in mitochondrial NADH-CoQ reductase. *FEBS Lett.*, **300**: 275-278.
- Andersson, S.G.E., Kurland, C.G.** (1990) Codon preferences in free-living microorganisms. *Microbiol. Rev.*, **54**: 198-210.
- Anraku Y.** (1988) Bacterial electron transport chains. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**:101-132
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** (1987) Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons (eds), New York.
- Awasthi, V. C., Ruzicka, F.J., Crane, F.L.** (1970) The relation between phospholipase action and release of NADH dehydrogenase from mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **203**:233-248.
- Bayan, N., Schrempp S., Joliff G., Leblon G., Shechter E.** (1993) Role of the protonmotive force and of the state of the lipids in the in vivo protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*, a gram-positive bacterium. *Biochim. Biophys. Acta*, **1146**:97-105.
- Benen, J.A., van Berkel, W.J., van Dongen, W.M., Muller, F., de Kok, A.** (1989) Molecular cloning and sequence determination of the *lpd* gene encoding lipoamide dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**:1787-1797.
- Bergsma, J., Strijker, R., Alkema, J.Y.E., Seijen, H.G., Konings, W.N.** (1981) NADH Dehydrogenase and NADH oxidation in membrane vesicles from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.*, **120**:599-606.
- Bergsma, J., Van Dongen, M.B.M., Konings, W.N.** (1982) Purification and characterization of NADH dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.*, **128**:151-157.

- Berks B.C., McEwan A.G., Ferguson S.J. (1993) Membrane-associated NADH dehydrogenase activities in *Rhodobacter capsulatus*: purification of a dihydrolipoyl dehydrogenase. *J. Gen. Microbiol.*, **139**:1841-1851.
- Berry E.A., Trumpower B.L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes. *J. Biol. Chem.*, **260**:2458-67
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**:1513.
- Bogachev, A.V., Murtazina, R.A., Skulachev, V.P. (1996) H⁺/e⁻ stoichiometry for NADH dehydrogenase I and dimethyl sulfoxide reductase in anaerobically grown *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.*, **178**(21):6233-6237.
- Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, F., Leblon, G. (1990) Interspecies electro-transformation in Corynebacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **66**:263-270.
- Bonnassie, S., Burini, J.F., Oreglia, J., Trautwetter, A., Patte, J.C., Sicard, A.M. (1990) Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J. Gen. Microbiol.*, **136**:2107-2112.
- Boyaval, P., Desmazeaud M.J. (1983) Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*. *Le lait*, **63**:187-216.
- Bringer-Meyer, S., Neveling, U., Klasen, R., Sahm, H. (1996) Biochemistry and physiology of thiamine diphosphate enzymes, Bisswanger, H. et Schellenberger, A. (eds) pp. 382-389, Intemann, Germany.
- Calhoun, M.W., Oden, K.L., Gennis R.B., Teixeira de Mattos, M.J., Neijssel, M.O. (1993) Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J. Bacteriol.*, **175**:3020-3025.
- Chen S., Guillory R.J. (1984). Identification of the NADH-NAD⁺ transhydrogenase peptide of the mitochondrial NADH-CoQ reductase (Complex I). A photodependent labeling study utilizing arylazido-beta-alanyl NAD⁺. *J. Biol.Chem.*, **259**:5124-5131.

Chenas, N.K., Butkus, A.A., IuIu, K., IuIu, K. (1987) Characteristics of the interaction of adrenal lipoamide dehydrogenase with physiological and quinone electron acceptors. *Ukr. Biokhim. Zh.*, **59**:44-49.

Clarke, D.M., Bragg, P.D. (1985) Cloning and expression of the transhydrogenase gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **162**, 367-373.

Clément, Y., Escofier, B., Trombe, M.C., Lannéelle, G. (1984) Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. *J. Gen. Microbiol.*, **130**:2589-2594.

Clément, Y., Lannéelle, G. (1986) Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: Triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *J. Gen. Microbiol.*, **132**:925-929.

Cocaign M. (1992) Croissance de *Corynebacterium glutamicum* sur divers substrats e repartition des flux dans les voies du métabolisme central. **Thèse de Doctorat**, INSA-Toulouse (France).

Cocaign-Bousquet, M., Lindley, N.D. (1995). Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**:260-267.

Cocaign-Bousquet, M., Guyonvarch, A., Lindley, N.D. (1996) Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:429-436.

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaiia, F. Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, S., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, S., Squares, S., Sqaes, R., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**:537-544.

- Collins, M.D., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (1980) Fatty acid, isoprenoide quinone and polar lipid composition in the classification of *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.*, **118**:29-37.
- Collins, M.D., Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol. Rev.*, **45**:316-354.
- Collins, M.D., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (1982) A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.*, **128**: 129-149.
- Collins, M.D., Cummins, C.S. (1986) Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. v. 2, p. 1266-1276, Williams & Wikins Co., Baltimore.
- Condon, C., Owen, P. (1982) The succinate dehydrogenase: a major cross-reacting antigen in the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Lett.*, **15**:109-113.
- Condon, C., Cammack, R., Patil, D.S., Owen P. (1985) The succinate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Immunochemical resolution and biophysical characterization of a 4-subunit enzyme complex. *J. Biol. Chem.*, **260**:9427-9434.
- Condon, S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microb. Rev.*, **46**:269-280.
- Crouse, B.R., Yano, T., Finnegan, M.G., Yagi, T., Johnson, M.K. (1994) Properties of the iron-sulfur center in the 25-kilodalton subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.*, **269**:21030-21036.
- Dancey, G.F., Levine, A.E., Shapiro, B.M. (1976) The NADH dehydrogenase of the respiratory chain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **251**:5911-5920.
- Dancey, G.F., Shapiro, B.M. (1977) Specific phospholipid requirement for activity of the purified respiratory chain NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **487**:368-377.
- Dastoor, F.P., Forrest, M.E., Beatty, J.T. (1997) Cloning, sequencing and oxygen regulation of the *Rhodobacter capsulatus* alpha-ketoglutarate dehydrogenase operon. *J. Bacteriol.*, **179**:4559-4566.

de Gier, J-W., Lübben, M., Reijnders, W.N.M., Tipker, C.A., Slotboom, D-J., van Spanning, R.J.M., Stouthamer, A.H., van der Oost, J. (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol.*, **13**(2):183-196.

de Vrij, W., Konings, W.N. (1987a) Kinetic characterization of cytochrome c oxidase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.*, **166**:581-587.

de Vrij, W., van den Burg, B., Konings, W.N. (1987b) Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.*, **166**:589-585.

Dominguez H. (1994) Croissance et flux métaboliques de *Corynebacterium glutamicum* sur divers sucres: Intéractions entre transporteurs PTS et voies métaboliques. **Thèse de Doctorat**, Université Claude Bernard, Lyon (France).

Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A., Guerkin-Kern, J-L., Cocaign-Bousquet, M., Lindley, N.D. (1998) Carbon flux distribution in central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.*, **254**:96-102.

Eikmanns, B.J., Folletie, M.T., Griot, M.U., Sinskey, A.J. (1989) The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Mol. Gen. Microbiol.*, **218**:330-339.

Eikmanns, B.J., Kircher, M., Reinscheid, D.J. (1991) Discrimination of *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* and *Brevibacterium lactofermentum* by restriction pattern analysis of DNA adjacent to the *hom* gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, **66**:203-207.

Eikmanns, B.J. (1992) Identification, sequence analysis, expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J. Bacteriol.*, **174**:6076-6086.

Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtke, K., Sahm, H. (1994) Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *glt A* gene encoding citrate synthase. *Microbiology*, **140**:1817-1828.

- Eikmanns, B.J., Rittman, D., Sahn, H. (1995) Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.*, **177**:1821-1828.
- Evans, C.T., Bellamy, W., Gleeson, M., Aoki, H., Hanna, K., Peterson, W., Conrad, D., Misawa, M. (1987) A novel, efficient biotransformation for the production of L-phenylalanine. *Bio / technology.*, **5**:818-823.
- Ewing, J.F., Janero, D.R. (1995) Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator, *Anal. Biochem.*, **232**:243-248.
- Fleishmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C.A., Gocayne, J.D., Scott, J.D., Shirley, R., Liu, L.I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchmann, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O., Venter, J.C. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**:496-512.
- Garnak, M., Reeves, H.C. (1979a) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* ML308. *Science*, **203**:1111-1112.
- Garnak, M., Reeves, H.C. (1979b) Purification and properties of phosphorylated isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **254**:7915-7920.
- Gel'man, N.S., Lukoyanova A., Ostrovskii, D.N. (1967) The respiratory chain of bacteria. Ubiquinones and Naphtoquinones. In *Respiration and Phosphorylation of Bacteria*, p.80-89. Plenum Press, New York.
- Gennis, R.B. (1991) Some recent advances relating to prokaryotic cytochrome *c* reductases and cytochrome *c* oxidases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1058**:21-24.
- Gubler, M., Park, S.M., Jetten, M., Stephanopoulos, G., Sinskey, A.J. (1994) Effects of phosphoenol pyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**:857-863.

- Guner, S., Robertson, D.E., Yu, L., Qiu, Z.H., Yu, C.A., Knaff D.B. (1991). The *Rhodospirillum rubrum* cytochrome *bcl* complex: redox properties, inhibitor sensitivity and proton pumping. *Biochim. Biophys. Acta*, **1058**:269-279.
- Haldar, K., Olsiewski, P.J., Walsh, C., Kaczorowski, G.J., Bhaduri, A., Kaback, H.R. (1982) Simultaneous reconstitution of *Escherichia coli* membrane vesicles with D-lactate and D-amino acid dehydrogenases. *Biochemistry*, **21**:4590-4596.
- Hawkins, C.F., Borges, A., Perham, R.N. (1990) Cloning and sequence analysis of the genes encoding the dihydrolipoamide acetyltransferase and dihydrolipoamide dehydrogenase components of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, **194**:95-102.
- Hederstedt, L., Rutberg, L. (1981) Succinate dehydrogenase - a comparative review. *Microbiol. Rev.*, **45**(4):542-555.
- Hein, S., Steinbuchel, A. (1996) Cloning and characterization of the *Alcaligenes eutrophus* 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *FEMS Microbiol. Lett.*, **136**:231-238.
- Hemila, H., Palva, A., Paulin, L., Arvidson, S., Palva, I. (1990) Secretory S complex of *Bacillus subtilis* : sequence analysis and identity to pyruvate dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, **172**:5052-5063.
- Hemila, H. (1991) Lipoamide dehydrogenase of *Staphylococcus aureus* : nucleotide sequence and sequence analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1129**:119-123.
- Hendler, R.W., Burgess, A.H. (1972) Respiration and protein synthesis in *Escherichia coli* membrane-envelope fragments. VI. Solubilization and characterization of the electron transport chain. *J. Cell Biol.*, **55**:266-281.
- Hicks, D.B., Plass, R.J., Quirk, P.G. (1991) Evidence for multiple terminal oxidases, including cytochrome d, in facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4. *J. Bacteriol.*, **173**:5010-5016.
- Hirsch, C.A., Rasminski, M., Davis, B.D., Lin, E.C.C. (1963) A fumarate reductase in *Escherichia coli* distinct from succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **238**: 3770-3774.

Hoischen, C., Krämer, R. (1990) Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **172**:3409-3416.

Holms, W.H. (1986) The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Top. Cell. Reg.*, **28**:69-105.

Hong, Y.S., Kerr, W.J., Craigen, J., Tan, Y., Tan, K., Patel, M.S. (1996) Identification of two mutations in a compound heterozygous child with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Human Molecular Genetics*, **5**: 1925-1930.

Huchenq, A., Marquet, M.J., Welby, M., Montrozier, H., Goma, G., Lanéelle, G. (1984) Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol.*, **135B**:53-67.

Ishino, S., Shinomura-Nishimuta, J., Yamaguchi, K., Shirahata, K., Araki, K. (1991) ¹³C-Nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in L-glutamic acid and L-lysine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **37**:157-165.

Jaworowski A., Campbell H.D., Poulis M.I., Young I.G. (1981a) Genetic identification and purification of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **20**:2041-2047

Jaworowski, A., Mayo, G., Shaw, D.C., Campbell, H.D., Young, I.G. (1981b) Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* and reconstitution of NADH oxidase in ndh mutant membrane vesicles. *Biochemistry*, **20**:3621-3628.

Jetten, M.S.M., Pitoc, G.A., Follettie, M.T., Sinskey, A.J. (1994) Regulation of phospho(enol)-pyruvate and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**:47-52.

Jetten, M.S.M., Sinskey, A.J. (1995) Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **15**:73-103.

Jollif, G., Mathieu, L., Hahn, V., Bayan, N., Duchiron, F., Renaud, M., Schechter, E., Leblon, G. (1992) Cloning and nucleotide sequence of the *csp 1* gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of *Corynebacterium glutamicum* : the deduced N-terminal region of PS1 is similar to the *Mycobacterium* antigen 85 complex. *Molecular Microbiol.*, **6**: 2349-2362.

Jones, D., Collins, M.D. (1986) Irregular, nonsporing Gram-positive rods. *In*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v. 2, p. 1261-1434. Williams & Wilking, Baltimore.
by pathway engineering. *Bio/technology*, **11**:921-925.

Katsumata, R., Osaki, A., Oka, T., Furuya, A. (1984) Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmide DNA. *J. Bacteriol.*, **159**:306-311.

Katsumata, R., Ikeda, M. (1993) Hyperproduction of tryptophan *in Corynebacterium glutamicum*

Kawada, N., Takeda, K., Nosoh, Y. (1981) Effect of lipids on a membrane-bound NADH dehydrogenase from *Bacillus caldotenax*. *J. Biochem.*, **89**:1017-1027.

Keilin, D. (1966) The History of Cell Respiration and Cytochromes. Cambridge University Press, New York.

Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation, Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**:193

Kinoshita, S., Nakayama, K., Kitada, S. (1958) L-Lysine production using microbial auxotroph, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**:128-128.

Kinoshita, S. (1972) Amino-acid production by the fermentation process. *Nature*, **240**:211-211.

Kinoshita S. (1988) Amino acid fermentation, a japanese innovation. *Biotechnology*, avril; 17-21.

Kita K., Takamiya S., Furushima R., Ma Y.C., Suzuki H., Ozawa T., Oya H. (1988) Electron-transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria. III. Composition and fumarate reductase activity of complex II. *Biochim. Biophys. Acta.* **935**:130-140.

Kohler P., Saz H.J. (1976) Demonstration and possible function of NADH:NAD⁺ transhydrogenase from ascaris muscle mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**:2217-2225.

Komuniecki R., Saz H.J. (1979) Purification of lipoamide dehydrogenase from *Ascaris* muscle mitochondria and its relationship to NADH:NAD⁺ transhydrogenase activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**:239-247.

Kornberg, H.L. (1966a) The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **99**:1-11.

Kornberg, H.L. (1966b) Anaplerotic sequences and their role in metabolism. *Essays Biochem.*, **2**:1-31.

Krämer, R. (1994) Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**:75-94.

Krämer, R. (1996) Genetic and physiological approaches for the production of amino acids. *J. Biotechnol.*, **45**:1-21.

Kruger, N., Oppermann, F.B., Lorenzl, H., Steinbuchel, A. (1994) Biochemical and molecular characterization of the *Clostridium magnum* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J. Bacteriol.*, **176**:3614-3660.

Kutoh, E., Sone, N. (1988) Quinol-cytochrome *c* oxidoreductase from the thermophilic bacterium PS3. Purification and properties of a cytochrome *bcl(b6f)* complex. *J. Biol. Chem.*, **263**:9020-9026

Labarre, J., Reyes, O., Guyonvarch, A., Leblon, G. (1993) Gene-replacement, integration and amplification at the *gdh* A locus of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **175**:1001-1007.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.

Lauraeus, M., Haltia, T., Saraste, M., Wikström, M. (1991). *Bacillus subtilis* expresses two kinds of haem-A-containing terminal oxidases. *Eur J Biochem.*, **197**:699-705.

Leif, H., Sled, V.D., Ohnishis, T., Weiss, H., Friedrich, T. (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **230**:538-548.

Lemma, E., Hagerhall, C., Geisler, V., Brandt, U., von Jagow, G., Kröger, A. (1991) Reactivity of the *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex with quinones. *Biochem. Biophys. Acta*, **1059**:281-285.

Liebl, W., Klammer, R., Schleifer, K-H. (1989) Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. *Appl. Microbiol. Biotechnology*, **32**:205-210.

Linton J.D. (1990) The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism. *FEMS Microbiol. Rev.*, **6**:1-18.

Liu, J-K., Lee, F-T., Lin, C-S., Yao, X-T., Davenport, J.W., Wong, T-Y. (1995) Alternative function of the electron transport system in *Azotobacter vinelandii*: Removal of excess reductant by the cytochrome d pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:3998-4003.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.

Lucey, C.A., Condon, S. (1986) Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**:1789-1796.

Mac Carter, L.L. (1998) *OpaR*, a homolog of *Vibrio harveyi LuxR*, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, **180**:3166-3173.

Malumbres, M., Gil, J.A., Martin, J.F. (1993) Codon Préférence in *Corynebacteria*. *Gene*, **134**:15-24.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.** (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Publications (eds) Cold Spring Harbor.
- Marcinkeviciene, J., Blanchard, J.S.** (1997) Catalytic properties of lipoamide dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **340**:168-176.
- Marx, A., de Graaf A.A., Wiechert, W., Eggeling, L., Sahm, H.** (1995) Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by NMR spectroscopy combined with metabolic balancing. *Biotechnol. Bioeng.*, **51**:55-64.
- Matsui, K., Ishida, M., Tsuchiya, M., Sano, K.** (1988) Construction of tryptophan-producing recombinant strains of *Brevibacterium lactofermentum* using the engineered *trp* operons. *Agric. Biol. Chem.*, **52**:1863-1865.
- Matsushita K., Patel L., Gennis R.B., Kaback H.R.** (1983) Reconstitution of active transport in proteoliposomes containing cytochrome *o* oxidase and lac carrier protein purified from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**:4889-4893
- Matsushita, K., Ohnishi, T., Kaback, H.R.** (1987) NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry*, **26**:7732-7737.
- Matsushita, K., Shinagawa, E. Adachi, O., Ameyama, M.** (1989) Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *J. Biochem.*, **105**(4):633-637.
- Mattevi, A., Schierbeek, A.J., Hol, W.G.J.** (1991) Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. A comparison with the structure of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.*, **220**:975-994.
- Mattevi, A., Obmolova, G., Schulze, E., Kalk, K.H., Westphal, A.H., de Kok, A., Hol, W.G.J.** (1992) Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science*, **255**:1544-1550.
- Meinhardt, S.W., Wang, D.C., Hon-nami, K., Yagi, T., Oshima, T., Ohnishi, T.** (1990) Studies on the NADH-menaquinone oxidoreductase segment of the respiratory chain in *Thermus thermophilus* HB-8. *J. Biol. Chem.*, **265**:1360-1368.

Minghetti, K.C., Goswitz, V.C., Gabriel, N.E., Hill, J.J., Barassi, C.A., Georgiou, C.D., Chan, S.I., Gennis, R.B. (1992) Modified, large-scale purification of the cytochrome *o* complex (*bo*-type oxidase) of *Escherichia coli* yields a two heme/one copper terminal oxidase with high specific activity. *Biochemistry*, **31**:6917-6924.

Mitchell, P. (1967) Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: natural fuel cells and solar cells. *Fed. Proc.*, **26**:1370-1379.

Molenaar D., van der Rest M.E., Petrovic S. (1998) Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* **254**:395-403.

Mori, M., Shiio, I. (1987) Pyruvate formation and sugar metabolism in amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **51**:129-138.

Mueller, J.P., Taber, H.W. (1989) Isolation and sequence of *ctaA*, a gene required for cytochrome *aa3* biosynthesis and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **171**:4967-4978.

Murakami, H., Kita, K., Oya H., Anraku Y. (1985) The *Escherichia coli* cytochrome *b556*, gene, *cybA*, is assignable as *sdh C* in the succinate dehydrogenase gene cluster. *FEMS Microbiol Lett.*, **30**:307-311.

Nagata, K., Tsukita S., Tamura T., Sone, N. (1996) A *cb*-type cytochrome-*c* oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, **142**:1757-1763.

Neijssel, O.M., Teixeira de Mattos, M.J. (1994) The energetics of bacterial growth: a reassessment. *Mol. Microbiol.*, **13**:172-182.

Nilsson, B., Uhlen, M., Josephson, S., Gatenbeck, S., Philipson, L. (1983) An improved positive selection vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, **11**: 8019-8030.

Oppermann, F.B., Steinbuchel, A. (1994) Identification and molecular characterization of the *aco* genes encoding the *Pelobacter carbinolicus* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J. Bacteriol.*, **176**:469-485.

- O'Reagan, M., Thierbach, G., Bachmann, B., Villeval, D., Lepage, P., Viret, J.F., Lemoine, Y. (1989) Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Gene*, **77**:237-251.
- Owen, P., Kaczorowski, G.J., Kaback, H.R. (1980) Resolution and identification of iron-containing antigens in membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **19**:596-600.
- Packman, L.C., Perham, R.N. (1982) An amino acid sequence in the active site of lipoamide dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *FEBS Lett.*, **139**:155-158.
- Palmer, J.A., Hatter, K., Sokatch, J.R. (1991a) Cloning and sequence analysis of the LPD-glc structural gene of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **173**:3109-3116.
- Palmer, J.A., Madhusudhan, K.T., Hatter, K., Sokatch, J.R. (1991b) Cloning, sequence and transcriptional analysis of the structural gene for LPD-3, the third lipoamide dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.*, **202**:231-240.
- Park, S.M., Sinskey, A.J., Stephanopoulos, G. (1997) Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Biotechnol. Bioeng.*, **55**:864-879.
- Patek, M., Eikmanns, B.J., Patek, J., Sahm, H. (1996) Promoters from *Corynebacterium glutamicum* : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology*, **142**:1297-1309.
- Pelmont, J. (1992) Les Enzymes. Presses Universitaires. Grenoble.
- Pelmont, J. (1993) Respiration sur oxygène. In Bactéries et Environnement, Adaptations physiologiques. Presses Universitaires. Grenoble, pp. 669-705.
- Peng, H.L., Deng, W.L., Yang, Y.H., Chang, H.Y. (1996) Identification and characterization of the aco D gene encoding a dihydrolipoamide dehydrogenase of the *Klebsiella pneumoniae* acetoin dehydrogenase system. *J. Biochem.*, **119**:1118-1123.
- Pequignot, C. (1995) Caractérisation de la croissance de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 en cuve agitée aérée sur différents milieux de culture - Détermination des flux métaboliques. Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand (France).

- Petersen, B.L., Moeller, M.G., Stummann, B.M., Henningsen, K.W. (1996) Clustering of genes with function in the biosynthesis of bacteriochlorophyll and heme in the green sulfur bacterium *Chlorobium vibrioforme*. *Hereditas*, **125**:93-96.
- Peters-Wendisch, P.G., Eikmanns, B.J., Thierbach, G., Bachmann, B., Sahm, H. (1993) Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. *FEMS Microbiol. Letters*, **112**:269-274.
- Peters-Wendisch, P.G., Wendisch V.F., Paul, S., Eikmanns, B.J., Sahm, H. (1997) Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, **143**:1095-1103.
- Peyret, J.L., Bayan, N., Joliff, G., Gulik-Krzywicki, T., Mathieu, L., Schechter, E., Leblon, G. (1993) Characterization of the *csp B* gene encoding PS2, an ordered surface layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiol.*, **9**:97-109.
- Pons, B.J., Duchiron, F., Duperray, F., Guyonvarch, A., Melaouene, S., More, J. (1993) Les Corynébactéries. p.389-421, In: Leveau, J.-Y., Bouix, M. *Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel*. Lavoisier, Paris, France.
- Poole, R.K., Ingledew, J. (1987) Pathways of electrons to oxygen. p.170-200. In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. v.1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Porpaczy, Z., Sumegi, B., Alkonyi, I. (1987) Interaction between NAD-dependent isocitrate dehydrogenase, alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, and NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, **262**:9509-9514.
- Ptashne, M. (1986) A genetic switch. Gene control and phage λ . in Blackwell scientific publications, eds., Oxford, UK.
- Qureshi, M.H., Fujiwara, T., Fukumori, Y. (1996) Succinate-quinone oxidoreductase (complex II) containing a single heme b in facultative alkaliphilic *Bacillus sp.* strain YN-2000. *J. Bacteriol.*, **178**:3031-3036.

- Reinscheid, D.J., Eikmanns, B.J., Sahn, H.** (1994) Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J. Bacteriol.*, **176**:3474-3483.
- Renaud, C.** (1983) Fabrication du glutamate monosodique. *Biofutur*, octobre:40-42.
- Reyes, O., Guyonvarch, A., Bonamy, C., Salti, V., David, F., Leblon, G.** (1991) 'Integron'-bearing vectors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive *Corynebacteria*. *Gene*, **107**:61-68.
- Rollin, C., Morgant, V., Guyonvarch, A., Guerkin-Kern, J-L.** (1995). ¹³C-NMR studies of *Corynebacterium melassecola* metabolic pathways. *Eur. J. Biochem.*, **227**:488-493.
- Rosenberg, M., Court, D.** (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.*, **13**:319-353.
- Sakamoto, J., Matsumoto, A., Oobuchi, K., Sone, N.** (1996) Cytochrome *bd*-type quinol oxidase in a mutant of *Bacillus stearothermophilus* deficient in *caa3*-type cytochrome *c* oxidase, *FEMS Microbiol. Lett.*, **143**:151-158.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5463-5467.
- Sano, K., Ito, K., Miwa, K., Nakamori, S.** (1987) Amplification of the phosphoenol pyruvate carboxylase gene of *Brevibacterium lactofermentum* to improve amino acid production. *Agric. Biol. Chem.*, **51**:597-599.
- Santana, M., Kunst, F., Hullo, M.F., Rapoport, G., Danchin, A., Glaser, P.** (1992) Molecular cloning, sequencing, and physiological characterization of the *qox* operon from *Bacillus subtilis*, encoding the *aa3-600* quinol oxidase. *J Biol Chem.*, **267**:10225-10231.
- Saraste M., Metso, T., Nakari, T., Jalli, T., Lauraeus, M., Van Der Oost, J.** (1991) The *Bacillus subtilis* cytochrome-c oxidase. Variations on a conserved protein theme. *Eur. J. Biochem.*, **195**:517-525.
- Satoh, T., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Iwamura, H.** (1996) Comparison of the inhibitory action of synthetic capsaicin analogues with various NADH-ubiquinone oxidoreductases. *Biochem. Biophys. Acta*, **1273**:21-30.

Schäfer, G., Purschke, W., Schmidt, C.L. (1996) On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. *FEMS Microbiol. Rev.*, **18**:173-188.

Schmidt, H.L., Stöcklein, W., Danzer, J., Kirch, P., Limbach, B. (1986) Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*, *Eur. J. Biochem.*, **156**:149-155.

Schrempp S., Bayan, N., Shechter E. (1994) Characterization of energetically functional inverted membrane vesicles from *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Lett.*, **356**:104-108.

Schrumpf, B., Schwartzer, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Eggeling, L., Sahm, H. (1991) A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **173**:4510-4516.

Schwartzer A., Pühler, A. (1991) Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnol.* **9**:84-87.

Schwinde, J.W., Thum-Schmitz, N., Eikmanns, B.J., Sahm, H. (1993) Transcriptional analysis of the *gap-pgk-tpi-ppc* gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **175**:3905-3908.

Serebrijski, I., Wojcik, F., Reyes, O., Leblon, G. (1995) Multicopy suppression by *asd* gene and osmotic stress-dependant complementation by heterologous *pro A* in *pro A* mutants. *J. Bacteriol.*, **177**:7255-7260.

Shechter, E., Rossignol, B. (1997) Chaînes membranaires de transfert d'électrons. *in*: Biochimie et Biophysique des membranes: Aspects structuraux et fonctionnels. pp.211-240. 2^e ed. Masson, Paris.

Shiio, I., Ötsuka, S.I., Tsunoda, T. (1959) Glutamic acid formation from glucose by bacteria: enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, the Krebs cycle, the glyoxylate bypass in cell extracts of *Brevibacterium flavum* n° 2247. *J. Biochem.*, **46**:1303-1311.

- Shiio, I., Ötsuka, S.I., Tsunoda, T. (1960) Glutamic acid formation from glucose by bacteria: on the pathway of pyruvate formation in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.*, **47**:414-421.
- Shiio, I., Ötsuka, S.I., Takahashi, M. (1962) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino-acids. *J. Biochem.*, **51**:56-62.
- Shiio, I., Ozaki, H. (1968) Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxaloacetate. *J. Biochem.*, **64**:45-53.
- Shiio, I., Miyajima, R., Nakamori, S. (1970) Homoserine dehydrogenase genetically desensitized to the feedback inhibition in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.*, **68**:859-866.
- Shiio, I., Ozaki, H., Ujigawa, K. (1977) Regulation of citrate-synthase in *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. *J. Biochem.*, **82**:395-405.
- Shiio, I., Ujigawa, K. (1978) Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.*, **84**:647-657.
- Shiio, I., Ujigawa-Takeda, K. (1979) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by synergistic action of aspartate and 2-oxoglutarate. *Agric. Biol. Chem.*, **43**:2479-2485.
- Shiio, I., Ujigawa-Takeda, K. (1980) Presence and regulation of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**:1897-1904.
- Shiio, I. (1982) Metabolic regulation and over-production of amino acids. In : Krumphanzl, V., Sikyta, B., Vanek, Z. *Overproduction of microbial products*, p.463-472. Academic Press, London.
- Shimomura, Y., Kawada, T., Suzuki, M. (1989) Capsaicin and its analogs inhibit the activity of NADH-coenzyme Q oxidoreductase of the mitochondrial respiratory chain. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**:573-577.
- Shvinka, J.E., Viesturs, U.E., Toma M.K. (1979) Alternative oxidation pathways in the respiratory chain of *Brevibacterium flavum*. *Mikrobiologija*, **48**:10-16.

Sierra, I.L., Pernot, L., Prangé, T., Saludjian, P., Schiltz, M., Fourme, R., Padron, G. (1997) Molecular structure of the lipoamide dehydrogenase domain of surface antigen from *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.*, **269**:129-141

Smith, M.W., Neidhardt, F.C. (1983) 2-oxoacid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli*: cellular amounts and patterns of synthesis. *J. Bacteriol.*, **156**:81-88.

Smith, D.R. (1994) Non publié. Genbank : locus MLU15183, accession U15183.

Sone, N. (1990) Respiration-driven proton pumps. In: Krulwich, T.A. *Bacterial Energetics*, vol. XII, pp.1-32. Academic Press, Inc. New York.

Sone, N., Fujiwara, Y. (1991) Effects of aeration during growth of *Bacillus stearothermophilus* on proton pumping activity and change of terminal oxidases. *J. Biochem.*, **110**:1016-1021.

Sonntag, K., Schwinde, J., de Graaf, A.A., Marx, A., Eikmanns, B.J., Wiechert, W., Sahm, H. (1995) ¹³C-NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**:489-495.

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**:503-17

Spencer M.E., Guest J.R. (1973) Isolation and properties of fumarate reductase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **114**: 563-570.

Stephens, P.E., Darlison, M.G., Lewis, H.M., Guest, J.R. (1983) Nucleotide sequence of the lipoamide dehydrogenase gene of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.*, **135**:519-527.

Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C.J., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W.P., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W. (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, Sous presse.

Sugimoto, S-i., Shio, I. (1989) Fructose metabolism and regulation of 1-phosphofructokinase and 6-phosphofructokinase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**:1261-1268.

Sumegi, B., Srere, P.A. (1984) Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, **259**:15040-15045.

Taber, H.W. (1993) Respiratory chains. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics (Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R., eds.), pp. 199-212. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Takano, S., Yano, T., Yagi, T. (1996) Structural studies of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Paracoccus denitrificans*: identity, property, and stoichiometry of the peripheral subunits. *Biochemistry*, **35**:9120-9127.

Takinami, K., Yoshi, H., Yamada, Y., Okada, H., Kinoshita, K. (1968) Control of L-glutamic acid fermentation by biotin and fatty acids. *Amino Acid and Nucleic Acid.*, **18**:120-156.

Templeton, D.M., Tsai, C.S. (1985) Kinetic and spectroscopic studies of transhydrogenase activity and nucleotide site of lipoamide dehydrogenase. *Int. J. Biochem.*, **17**:879-883.

Thorpe, C., Williams, C.H. (1976) Differential reactivity of the two active site cysteine residues generated on reduction of pig heart lipoamide dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **251**:3553-3557.

Trutko, S.M., Kuznetsova, N.N., Balitskaia R.M., Akimenko, V.K. (1982) Effect of glutamic acid oversynthesis on the development of cyanide-resistant respiration in the bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Biokhimiia*, **47**:1608-1617.

Tsuchida T., Kubota, K., Yoshihara, Y., Kikuchi, K., Yoshinaga, F. (1987) Fermentative production of L-glutamine by sulfaguanidine resistant mutants derived from L-glutamate producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **51**:2089-2094.

Usuda, Y., Tujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O., Matsui, H. (1996) Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology*, **142**:3347-3354.

Vallino, J.J., Stephanopoulos, G. (1990) Flux determination in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentations. In: Sikdar, S.K, Bier, M., Todd, P. *Frontiers in bioprocessing*. p.205-219, CRC Press, Boca Raton, FL.

Vallino, J.J., Stephanopoulos, G. (1993) Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**:633-646.

van Verseveld, H.W., Sthouthamer, A.H. (1978) Electron-transport chain and coupled oxidative phosphorylation in methanol-grown *Paracoccus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, **118**:13-20.

Vertès, A.A., Hatakeyama, K., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y., Yukawa, H. (1993) Replacement Recombination in coryneform bacteria: high efficiency integration requirement for non-methylated plasmid DNA. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**:2036-2038.

Vettakkorumakankav, N., Danson, M.J., Hough, D.W., Stevenson, K.J., Davison, M., Young, J. (1992) Dihydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii* : characterization and N-terminal sequence. *Biochem. Cell Biol.*, **70**:70-75.

von der Osten, C.H., Barbas, C.F., III, Wong, C.H., Sinskey, A.J. (1989a) Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum fda* gene: Structural comparison of *C. glutamicum* fructose-1,6-biphosphate aldolase to class I and class II aldolases. *Mol. Microbiol.*, **3**:1625-1637.

von der Osten, C.H., Gioannetti, C., Sinskey, A.J. (1989b) Design of a defined medium for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol. Lett.*, **11**:11-16.

Walker D.J., Fioravanti C.F. (1995) Mitochondrial NADH-->NAD transhydrogenation in adult *Hymenolepis diminuta*. *J. Parasitol.*, **8**:350-353.

Walker, D.J., Burkhardt, W., Fioravanti, C.F. (1997) *Hymenolepis diminuta*: mitochondrial NADH-->NAD transhydrogenation and the lipoamide dehydrogenase system. *Exper. Parasitol.*, **85**:158-167.

- Westphal, A.H., de Kok, A.** (1988) Lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* : Molecular cloning, organization and sequence analysis of the gene. *Eur. J. Biochem.*, **172**:299-305.
- White, A., Handler, P., Smith, E.L.** (1968) Biological oxidations. In Principles of Biochemistry, pp. 302-385. Mc Graw-Hill Book Company, New York.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P., Hol, W.G.J.** (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding β - α - β fold proteins using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.*, **187**:101-107.
- Xu, X-M., Yagi, T.** (1991) Identification of the NADH-binding subunit of energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Thermus thermophilus* HB-8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**(2):667-672.
- Yagi, T.** (1986) Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **250**:302-311.
- Yagi, T.** (1987) Inhibition of NADH-ubiquinone reductase activity by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide and correlation of this inhibition with the occurrence of energy-coupling site 1 in various organisms *Biochemistry*, **26**:2822-2828.
- Yagi, T., Hon-nami, K., Ohnishi, T.** (1988) Purification and characterization of two types of NADH-quinone reductase from *Thermus thermophilus* HB-8. *Biochemistry*, **27**:2008-2013.
- Yagi, T.** (1990) Inhibition by capsaicin of NADH-quinone oxidoreductases is correlated with the presence of energy-coupling site 1 in various organisms. *Arch Biochem Biophys.*, **281**:305-311.
- Yagi, T.** (1991) Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **23**:211-225.
- Yamada K., Komagata K.** (1970) Taxonomic studies on coryneform bacteria. III DNA base composition of coryneform bacteria. *J.Gen.Appl.Microbiol.*, **16**:215-224.

- Yang, X., Trumpower, B.L.** (1986) Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.*, **261**:12282-12289.
- Yang, X., Yu, L., Yu, C.A.** (1997) Resolution and reconstitution of succinate-ubiquinone reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **272**:9683-9689.
- Yano T., Yagi T., Sled V.D., Ohnishi T.** (1995) Expression and characterization of the 66-kilodalton (NQO3) iron-sulfur subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.*, **270**:18264-18270.
- Yano, T., Sled, V.D., Ohnishi, T., Yagi, T.** (1996) Expression and characterization of the flavoprotein subcomplex composed of 50-kDa (NQO1) and 25-kDa (NQO2) subunits of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.*, **271**:5907-5913.
- Yeaman, S.J.** (1989) The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem. J.*, **257**:625-632.
- Zhu, P.P., Peterkofsky, A.** (1996) Sequence and organization of genes encoding enzymes involved in pyruvate metabolism in *Mycoplasma capricolum*. *Protein Sci.*, **5**:1719-1736.
- Zittrich, S., Krämer, R.** (1994) Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **176**:6892-6899.

RESUME

La composition de la chaîne respiratoire de *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 a été déterminée par l'étude de l'effet d'inhibiteurs spécifiques sur la capacité respiratoire de cellules entières, par l'étude de l'effet de ces inhibiteurs sur le transport d'électrons dans des membranes purifiées, par des mesures d'activités enzymatiques, et par l'analyse spectroscopique à basse température de ces membranes. L'ensemble des résultats obtenus a permis de proposer un schéma d'organisation fonctionnelle des différents composants mis en évidence. L'efficacité énergétique de la chaîne branchée proposée est discutée.

L'étude de la fraction cytosoluble des cellules de *C. melassecola* a également été effectuée. Plusieurs enzymes capables d'oxydoréduction y ont été détectées. L'une d'entre elles a été étudiée en profondeur, la lipoamide déshydrogénase, pour laquelle les caractéristiques enzymatiques ont été étudiées après purification de l'enzyme (activité lipoamide déshydrogénase, activité transhydrogénase, activité NADH₂ oxydoréductase). La possibilité de liaison fonctionnelle de la lipoamide déshydrogénase à la chaîne respiratoire de *C. melassecola* est discutée.

Le gène *lpd* codant la lipoamide déshydrogénase de *C. melassecola* a été cloné et étudié au niveau moléculaire.

ABSTRACT

The composition of the respiratory chain of *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 was determined from studies upon the effects of various respiratory chain targeted inhibitors and by low temperature spectroscopic analysis. The effect of inhibitors was investigated upon the respiratory capacity of whole cells and the electron transport capacity of purified membranes using enzyme activity measurements. The data obtained result in a hypothesis upon the functional organisation of the various components of the respiratory chain. The energetic efficiency of the proposed branched respiratory chain is discussed.

The cell soluble fraction of *C. melassecola* was also investigated with respect to enzyme activities involved in respiratory chain functions. Various enzymes catalysing oxidoreduction reactions were detected. One of these enzymes, lipoamide dehydrogenase, was studied in detail. The enzymatic characteristics of this protein were determined following its purification based upon lipoamide dehydrogenase, transhydrogenase and NADH₂-acceptor activities. The possible functional link between a lipoamide dehydrogenase activity and the respiratory chain of *C. melassecola* is also discussed.

Following these investigations, the *lpd* gene, encoding the lipoamide dehydrogenase from *C. melassecola* was cloned and studied at the molecular level.

MOTS CLEFS

- *Corynebacterium melassecola*
- Métabolisme
- Chaîne respiratoire
- NAD(P)H₂ oxydoréductases
- Lipoamide déshydrogénase

KEY WORDS

- *Corynebacterium melassecola*
- Metabolism
- Respiratory chain
- NAD(P)H₂ oxidoreductase
- Lipoamide dehydrogenase