

50376  
1988  
83

50376  
1988  
83



N° d'Ordre : 226

# T H E S E

présentée

à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Bernard GRUSON

-----

ETUDE DE LA NEOGLUCOGENESE ET DE LA GLYCOGENOGENESE

DE *METHANOTHRIX SOEHNGENII*

-----

Présentée le 5 Mai 1988 devant la Commission d'Examen :

Président : G. SPIK  
Rapporteurs : S. BALL  
J.P. BELAICH  
Examineurs : G. ALBAGNAC  
P. DEBEIRE

A Madame le Professeur G. SPIK.

Par l'enseignement que vous m'avez dispensé, vous m'avez transmis votre passion pour la recherche scientifique et la biochimie. Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse, croyez en ma profonde reconnaissance.

A Monsieur G. ALBAGNAC.

Vous m'avez accueilli à la Station de Technologie Alimentaire où j'ai trouvé un environnement scientifique et humain favorable à la réalisation de cette thèse. Pour le soutien que vous m'avez apporté, croyez en l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur P. DEBEIRE.

J'ai été très sensible à l'intérêt que tu as manifesté pour mes travaux et pour ma formation de chercheur. J'espère avoir été digne de la confiance que tu m'as sans cesse témoigné au cours de ces années. Puisse ce travail t'exprimer ma très sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur BELAICH.

Pour l'intérêt que vous témoignez à ces travaux en acceptant de les juger, je vous exprime toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur S. BALL.

Je suis très heureux de votre participation à ce jury et de l'intérêt que vous manifestez à mes travaux je vous en remercie très sincèrement.

A Madame A. BONAMOUR.

Pour l'intérêt que vous n'avez cessé de manifester pour mes travaux, je vous remercie très sincèrement.

A Madame M. LOONIS.

L'efficacité de ton aide a été précieuse dans mon travail, je t'en remercie très vivement.

Je voudrais également remercier Messieurs H.C. DUBOURGUIER, J.P. TOUZEL, J.L. ROUSTAN E. SAMAIN, J.P. LEPOUTRE et P. PELLERIN pour les nombreux et fructueux échanges scientifiques.

Je remercie tous mes collègues pour leur soutien moral et amical pendant ces quatre années passées à la Station.

Je souhaite également remercier Sabine qui a réalisé avec célérité la frappe et la mise en page de ce mémoire.

Je remercie l'Agence Française pour la Maîtrise de l'Energie qui en m'allouant une bourse m'a permis de réaliser ce travail.

## S O M M A I R E

INTRODUCTION p. 6

GENERALITES p. 13

### CHAPITRE I

#### ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

I. LES BACTERIES METHANOGENES p. 14

II. STRUCTURES ORIGINALES DES BACTERIES METHANOGENES p. 14

A. Les parois

B. Structure des lipides

C. Le méthanophosphagène

D. Les coenzymes spécifiques

1. Les corrinoïdes

2. Le coenzyme M

3. L'acide 7 mercaptoheptanoyl threoninephosphate

4. Le coenzyme F<sub>420</sub>

5. Le coenzyme F<sub>430</sub>

6. La méthanoptérine

7. Le méthanofurane

### CHAPITRE II

#### LE METABOLISME ENERGETIQUE

I. CATABOLISME p. 23

A. Formation du méthyl-coenzyme M

B. Le complexe méthyl-coenzyme M méthylréductasique

II. BIOGENESE DE L'ATP p. 29

A. Le mécanisme SLP

B. Le mécanisme ETP

C. Mise en place du gradient de protons

## CHAPITRE III

### L'ANABOLISME

- I. ASSIMILATION DU SUBSTRAT CARBONE CHEZ LES METHANOGENES p. 36
  - A. Fixation du CO<sub>2</sub> chez les hydrogénophiles
  - B. Anabolisme à partir d'acétate
- II. NEOGLUCOGENESE p. 42
- III. LE GLYCOGENE p. 43
  - A. Le glycogène chez les Méthanogènes
  - B. Mobilisation du glycogène

### MATERIEL ET METHODES

- I. PREPARATION DES EXTRAITS ACELLULAIRES p. 48
  - A. Culture en masse de *Methanotherix soehngeni*
  - B. Préparation des extraits.
- II. TECHNIQUES ENZYMATIQUES p. 49
  - A. Techniques de dosage
    - 1. Enzymes de la néoglucogenèse
    - 2. Enzymes de la synthèse du glycogène
  - B. Purification de la glycogène synthase
    - 1. Chromatographie d'échange d'ions
    - 2. Chromatographie d'interactions hydrophobes
    - 3. Chromatographie d'affinité
  - C. Techniques d'analyses
    - 1. Dosage des protéines
    - 2. Dosage des sucres totaux
    - 3. Electrophorèse en conditions non dénaturantes
    - 4. Electrophorèse en conditions dénaturantes
    - 5. Détermination de la masse moléculaire de la glycogène synthase
    - 6. Dosage de l'ATP

RESULTATS

p. 58

CHAPITRE I

ETUDE DE LA NEOGLUCOGENESE CHEZ *METHANOTHRIX SOEHNGENII*

I.	SYNTHESE DU PHOSPHOENOLPYRUVATE	p. 59
	A. Activation de l'acétate	
	B. Formation du pyruvate	
	C. Formation du phosphoenolpyruvate	
	D. Conclusion	
II.	FORMATION DES TRIOSSES-PHOSPHATES	p. 63
III.	FORMATION DES HEXOSES-PHOSPHATES	p. 63
IV.	CONCLUSION	p. 64

CHAPITRE II

BIOSYNTHESE DU GLYCOGENE

I.	RECHERCHE DES ENZYMES DE LA BIOSYNTHESE DU GLYCOGENE	p. 70
	A. Phosphoglucomutase	
	B. ADP-Glucose synthetase	
	C. Glycogène synthase	
II.	PURIFICATION DE LA GLYCOGENE SYNTHASE	p. 71
	A. Chromatographie d'échange d'ions	
	B. Chromatographie d'interactions hydrophobes	
	C. Chromatographie d'affinité.	
III.	PROPRIETES DE LA GLYCOGENE SYNTHASE	p. 74
	A. Propriétés physicochimiques	
	B. Propriétés cinétiques	
	C. Propriétés de régulation.	
IV.	CONCLUSIONS	p. 79
	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	p. 82
	<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	p. 85

## INTRODUCTION

Avant la découverte des Archaeobactéries, l'évolution était considérée comme un processus linéaire, de l'organisme le plus simple (un procaryote) au plus compliqué. C'est en 1977 que WOESE et ses collaborateurs utilisant les catalogues de RNA 16S comme index phylogénétique ont remis en cause cette théorie. Les organismes vivants sont divisés en trois règnes primaires (Figure 1 p 8) : les Eubactéries, les Archaeobactéries et les Eucaryotes. Ces trois règnes ont probablement dérivé d'un ancêtre commun : le progénote, il y a 3,5 milliards d'années. Les Eucaryotes auraient évolué à partir d'une cellule ancestrale (l'urcaryote) par des relations endosymbiotiques avec les bactéries sulfureuses pourpres et les cyanobactéries, à l'origine des mitochondries et des chloroplastes.

Les Eubactéries et les Archaeobactéries ne sont pas plus apparentées entre elles qu'avec les Eucaryotes même si elles ont des points communs. Les Archaeobactéries ont une organisation cellulaire identique aux Eubacteries mais possèdent des caractères rappelant ceux des Eucaryotes tels que :

- certaines séquences d'acides aminés au niveau des protéines ribosomales.
- la présence d'introns dans les gènes.
- l'enzyme RNA polymérase qui est de structure tout à fait comparable et insensible à la rifampicine et la streptolydigne et stimulé par la silybine.
- le mécanisme de la traduction qui est sensible aux antibiotiques dirigés contre les ribosomes chez les Eucaryotes et est initié par la méthionine plutôt que par la formyl-méthionine.

D'autres caractères sont tout à fait originaux, tels que :

- des parois cellulaires sans peptidoglycannes

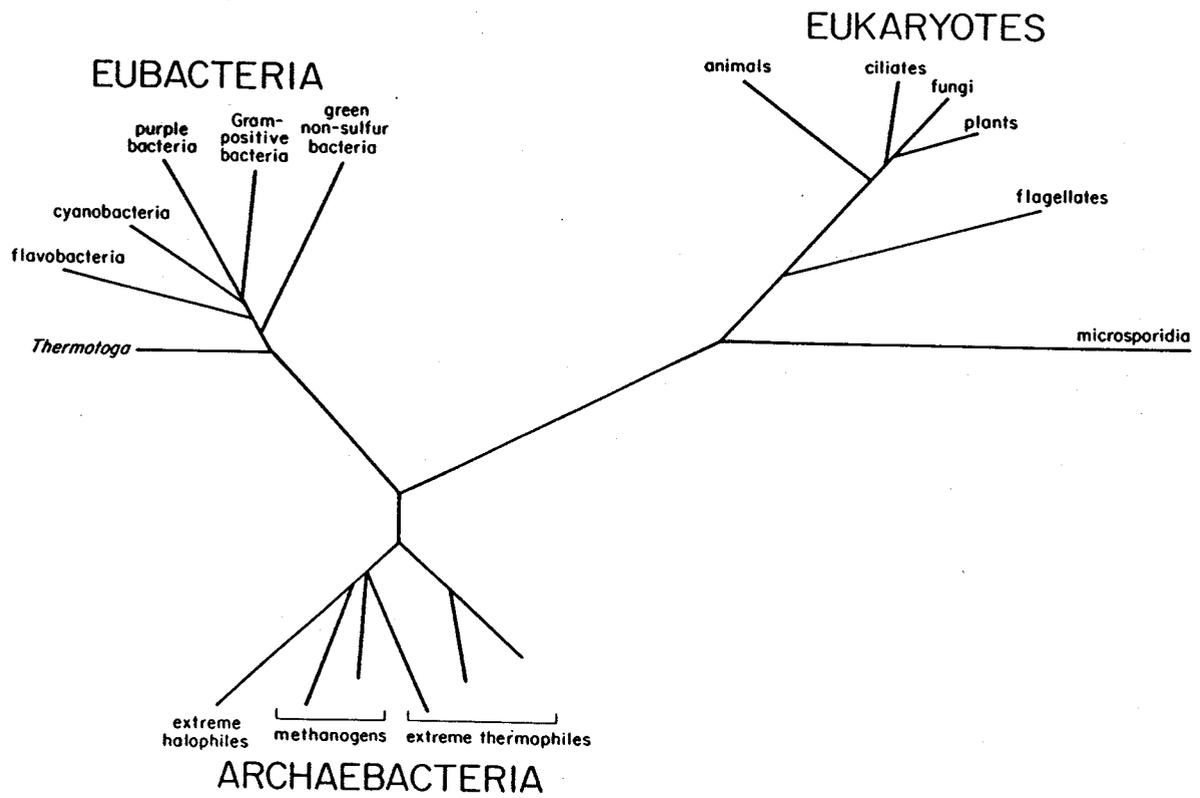


Figure 1 : Les trois règnes du monde vivant (WOESE, 1987).

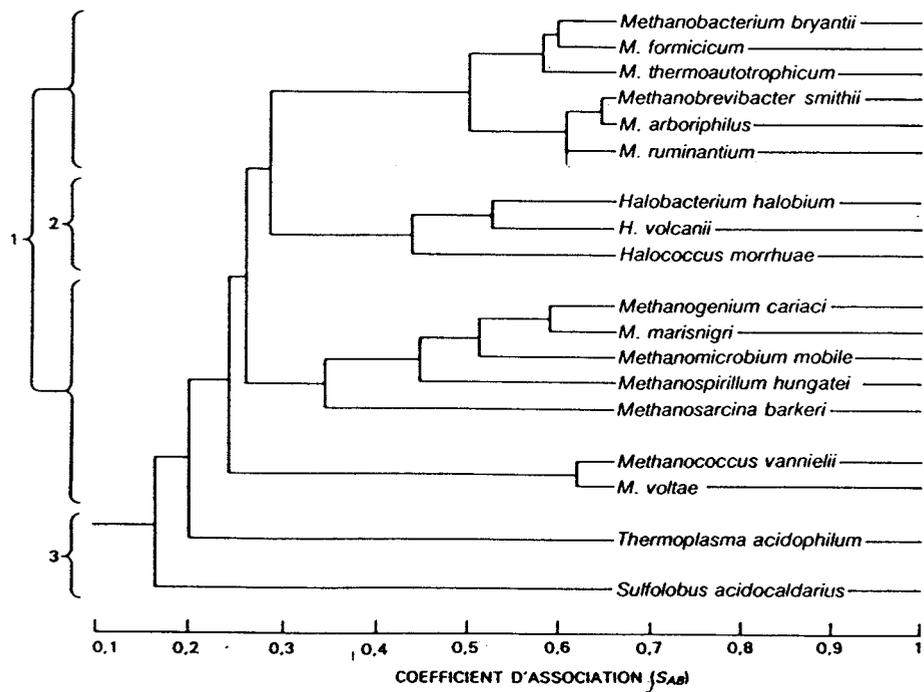


Figure 2 : Dendrogramme archaebacterien : (FOX et al., (1980)  
 1 : méthanogènes  
 2 : halophiles  
 3 : thermoacidophiles

- des lipides avec des liaisons éther
- l'absence de thymine et de dihydro-uracile dans les ARN de transfert.

Le règne des Archaeobactéries comprend :

1. Les halophiles qui existent dans les milieux où la concentration en sel est élevée.
2. les thermoacidophiles qui vivent dans les milieux très chauds (80-100°C) et très acides (< 2).
3. Les méthanogènes qui sont des anaérobies strictes produisant du CH<sub>4</sub> à partir de CO<sub>2</sub> de l'hydrogène ou de quelques sources de carbone

Les méthanogènes semblent constituer un groupe ancien à l'intérieur duquel les halophiles ont pris naissance (figure 2, p. 8).

Les bactéries méthanogènes sont responsables de la production du méthane biologique. On les trouve dans la panse des ruminants, dans les sédiments des marais où ils sont à l'origine des "gaz de marais" et dans les digesteurs anaérobies d'eaux usées. Leur rôle dans le cycle du carbone se situe dans la dernière étape de la transformation en CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub> de la matière organique. Leur grande sensibilité à l'oxygène les confine dans ces niches écologiques où elles rencontrent des conditions d'anaérobiose nécessaire à leur survie.

Les méthanogènes, en particulier les espèces filamenteuses acétoclastes comme *Methanothrix* jouent un rôle déterminant dans les technologies de dépollution

des eaux résiduaires d'industries agro-alimentaires. Cependant, le métabolisme de ces micro-organismes et sa régulation sont pratiquement inconnus. Dans le cadre d'une bourse de l'Agence Française pour la Maîtrise de l'Energie, nous avons entrepris un travail de recherches qui ambitionne une meilleure connaissance de ces bactéries, en particulier des voies de l'anabolisme glucidique et de la glycogénogenèse de *Mtx.soehngeni* .

Avant de décrire les résultats des travaux que nous avons réalisés, nous rappellerons quelques données essentielles quant au métabolisme énergétique en anaérobiose et aux voies de l'anabolisme glucidique. Les travaux ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

- P. PELLERIN, B. GRUSON G. PRENSIER, G. ALBAGNAC and P. DEBEIRE (1987).

Glycogen in *Methanotherix*.

Arch. Microbiol., 146, 377-381.

- B. GRUSON, P. DEBEIRE and G. ALBAGNAC (1988).

Purification and properties of the glycogen synthase from *Methanotherix Soehngeni*.

Soumise à Journal of Bacteriology.

- P. PELLERIN, B. GRUSON, P. DEBEIRE and G. ALBAGNAC

The occurrence and identification of glycogen in *Methanotherix* sp.

Preliminary studies on its biosynthetic pathway.

Colloque international : "Biologie des bactéries anaérobies" LILLE 17-18 Juin 1986.

Microbial growth on C1 compounds. Vth International Symposium. HAREN 11-16 Août 1986.

## ABREVIATIONS

Acetyl Coa	: acetyl coenzyme A
TCA	: acide tricarboxylique
MPT	: méthanoptérine
Mb	: <i>Methanobacterium</i>
$\alpha$ CG	: alpha-ceto-glutarate
Ms	: <i>Methanosarcina</i>
Mtx	: <i>Methanothrix</i>
PEP	: phosphoenolpyruvate
A <sub>3</sub> PG	: Acide 3 phosphoglycérique
TCS	: tetrachlorosalicylamide
DCCD	: N-N-diclohexylcarbodiimide
CoM	: coenzyme M
HBI	: hydroxybenzimidazole
SLP	: "substrate level phosphorylation"
Msp	: <i>Methanospirillum</i>
ETP	: "electron transport phosphorylation"
HS-HPT	: 7-mercaptoheptanoylthréonine phosphate
DTT	: dithiothreitol
PMSF	: phenylmethyl sulfonyl fluorure
OA	: oxaloacetate
MFR	: méthanofurane
MV	: méthyl viologène
pyr	: pyruvate
SAB	: sérum albumine bovine

Glc : glucose  
ADP-Glc : adénosine diphosphoglucose  
UDP-Glc : uridine diphosphoglucose  
MM : masse moléculaire

## GENERALITES

## CHAPITRE I

### ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

#### I. LES BACTERIES METHANOGENES

La classification des méthanogènes établie par BALCH en 1979 distinguait trois ordres, quatre familles, sept genres et treize espèces. Actuellement (Tableau I ; p. 15), on compte sept familles, quinze genres et plus de cinquante espèces. A l'examen microscopique, les méthanogènes ressemblent aux Eubactéries de part la taille, l'absence de membrane nucléaire et présentent des morphologies classiques : coques, bacilles, sarcines et spirilles. Elles utilisent un nombre réduit de substrats tels que certains composés monocarbonés :  $\text{CO}_2$ , CO, formate, méthanol et méthylamines, certaines sont capables d'utiliser l'acétate qui est à l'origine de plus de 70 % du  $\text{CH}_4$  provenant des digesteurs anaérobies. Bien qu'il n'existe pas de différenciation taxonomique à partir du substrat, on oppose couramment les espèces acétoclastes aux espèces hydrogénophiles, ces dernières tirant leur énergie de la réduction par l' $\text{H}_2$ , du  $\text{CO}_2$  en  $\text{CH}_4$ .

Le genre *Méthanothrix* (HUSER *et al.*, 1982, TOUZEL *et al.*, 1988) est rattaché aux *Methanosarcinaceae* malgré sa morphologie différente : il se présente sous forme de bacilles allongés associés en filaments qui se regroupent en amas. Le Tableau II de la p.15 donne les caractéristiques de la souche de *Méthanothrix* utilisée dans notre étude.

#### II. STRUCTURES ORIGINALES DES BACTERIES METHANOGENES

ORDRE

FAMILLE

GENRE

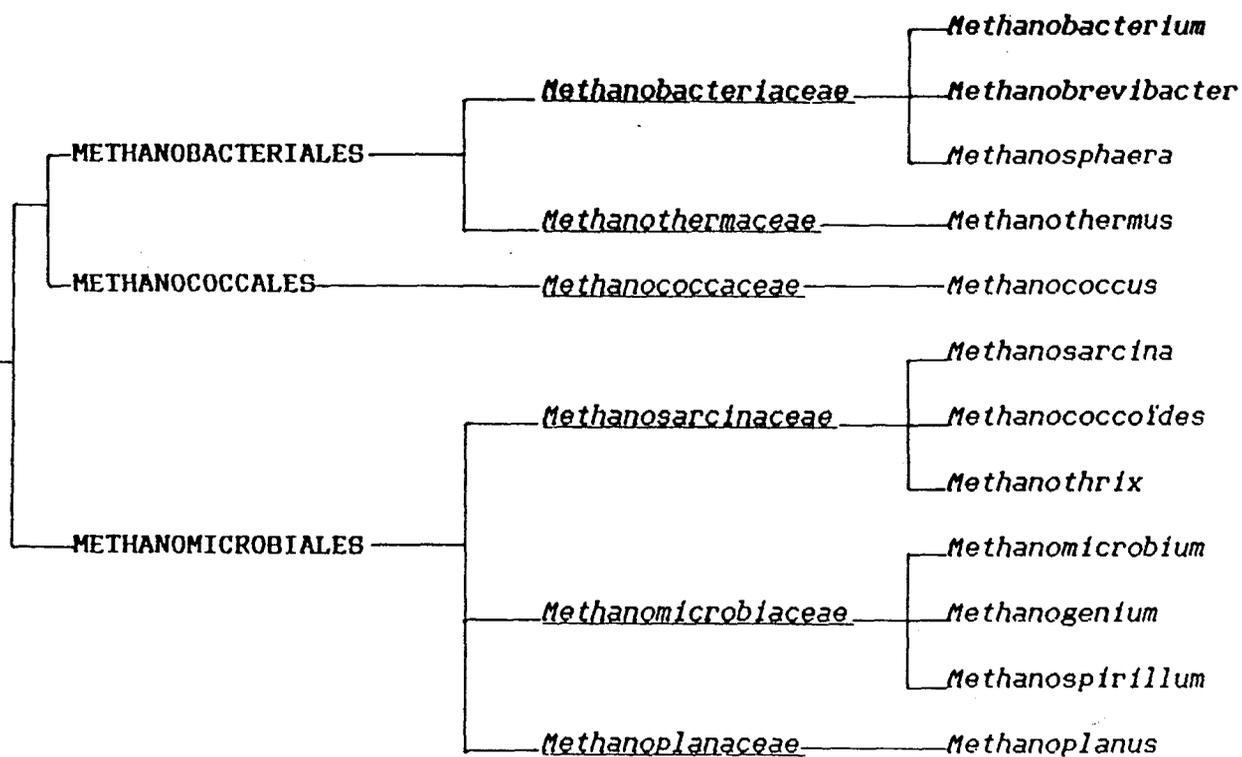


Tableau I : Classification des bactéries méthanogènes.

Tableau II : Propriétés de *Methanothrix soehngeni* souche FE,

Substrats	:	Acétate
Température optimale	:	35°C
pH optimal	:	6,5 à 7,75
Temps de doublement	:	86 h
Ks acétate	:	0,7 mM

## A. LES PAROIS

Les parois cellulaires des méthanogènes ne contiennent pas de peptidoglycane (KANDLER et KONIG, 1978). Elles présentent une grande diversité au niveau morphologique et composition chimique. La pseudomuréine (Figure 3, p. 17) présente des similitudes avec la muréine des Eubactéries, elle est spécifique des Méthanobactériales. D'autres méthanogènes possèdent une paroi protéique avec parfois une matrice polysaccharidique : la méthanocondroïtine (Figure 4, p. 17) pour les *Methanosarcinaceae*. Les *Methanospirillum* et les *Methanotherix* (PELLERIN, 1987) ont une gaine rigide de nature protéique et glucidique.

## B. STRUCTURE DES LIPIDES

Les lipides des méthanogènes (et des Archaeobactéries) se distinguent par des liaisons de type éther reliant un alcool gras (phytanol) et le glycérol (KATES *et al.*, 1965). Chez les méthanogènes, des diéthers de diphytanylglycérol et des tétraéthers de dibiphytanyldiglycérol ont été mis en évidence (Figure 5, p. 17) (LANGWORTHY, 1977).

## C. LE METHANOPHOSPHAGENE

Le 2,3 cyclopyrophosphoglycérate (Figure 6, p. 19) ou méthanophosphagène a été isolé et identifié chez *Mb. thermoautotrophicum* par SEELY et FAHRNEY (1983) et KANODIA et ROBERTS (1983). Il peut représenter jusqu'à 5 % du poids sec cellulaire quand la bactérie est cultivée en excès de phosphate. Il sert probablement de stockage de phosphate et de carbone et serait impliqué dans des mécanismes de régulation (EVANS *et al.*, 1985). Il existe uniquement chez les Méthanobactériales (TOLMAN *et al.*, 1986).

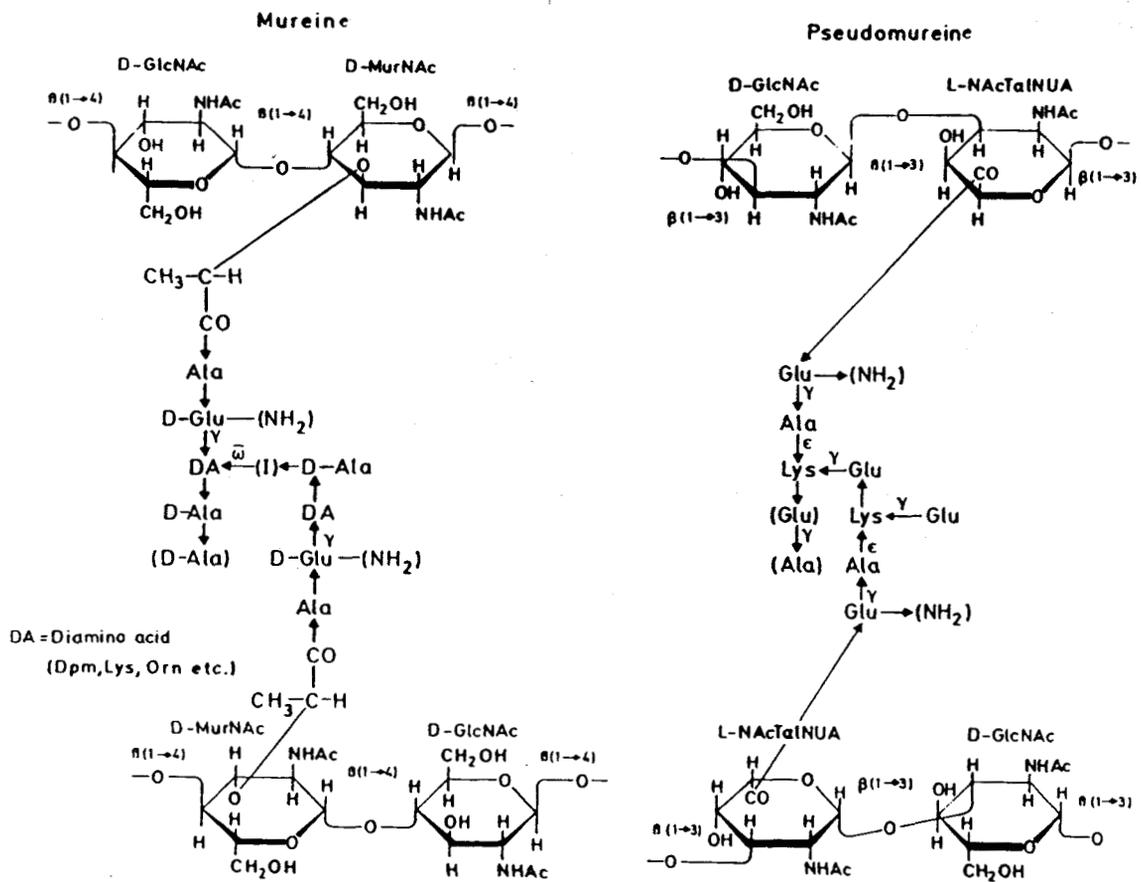


Figure 3 : Structures comparées de la muréine et de la pseudomuréine (KANDLER, 1982)



Figure 4 : Unité de répétition de la méthanocondroïtine (KREISL, 1986).

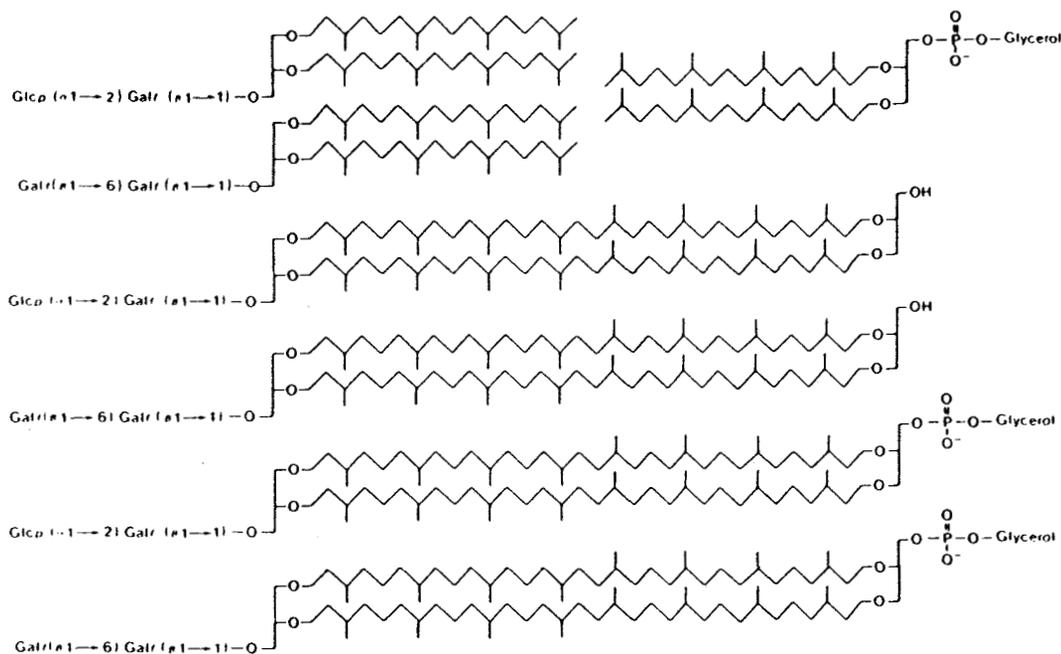


Figure 5 : Lipides polaires extraits de *Methanospirillum* (KUSHWAHA, 1981).

## D. LES COENZYMES SPECIFIQUES

Les structures de ces coenzymes sont décrites dans la Figure 7 p. 19 et 21 et l'étude des coenzymes spécifiques des méthanogènes était indispensable à la compréhension des mécanismes du catabolisme et de l'anabolisme. Il s'agit essentiellement de coenzymes responsables soit du transport d'électrons, soit du transport de dérivés monocarbonés.

### 1. Les corrinoïdes

la forme 5-hydroxybenzimidazolyl cobamide est détectée en quantités très variables selon les souches et le substrat de croissance. Leur rôle de transporteur de méthyl dans la méthanogenèse à partir de méthanol est bien démontré (VAN DER MEIJDEN 1983). Ils interviennent également dans la synthèse d'acétyl CoA chez les méthylotrophes (HOLDER, 1985).

### 2. Le coenzyme M ou acide 2 mercaptoéthane sulfonique (MAC BRIDE et WOLFE, 1971)

C'est un transporteur de méthyle présent chez toutes les méthanogènes (BALCH, 1979). Il est rapidement dimérisé en présence d'oxygène par la création d'un pont disulfure. La forme méthylée est le précurseur direct du  $\text{CH}_4$ .

### 3. L'acide 7 mercaptoheptanoyl thréoninephosphate (HS-HPT) (NOLL *et al.*, 1986)

Anciennement nommé composant B (GUNSALUS et WOLFE, 1980), il intervient dans l'étape de réduction du méthyl-CoM en  $\text{CH}_4$ . Il présente une analogie

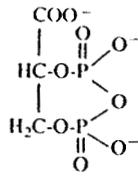
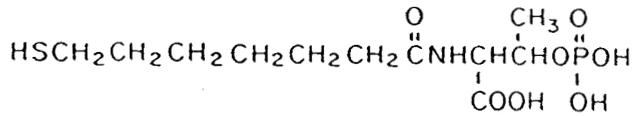
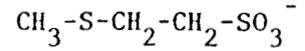
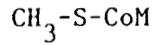


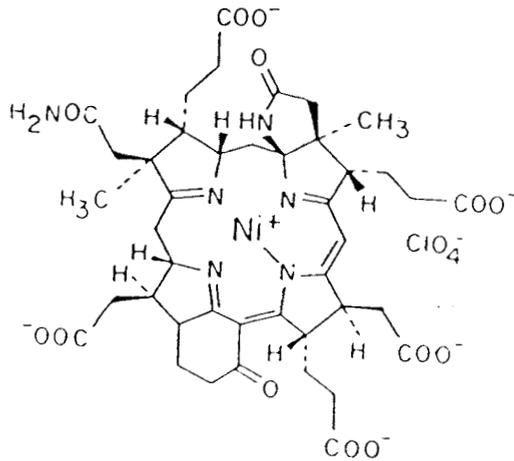
Figure 6 : Structure du 2,3-diphosphoglycérate cyclique.



7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate (NOLL *et al.* 1986)  
(HS-HTP)

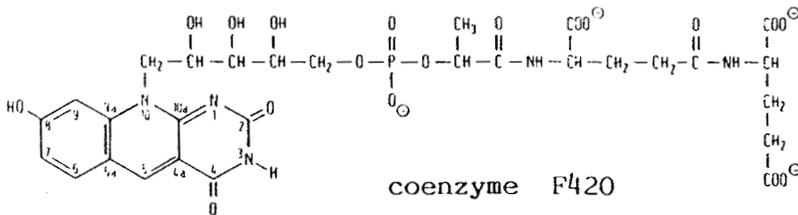


(MAC BRIDE *et WOLFE*, 1971)



coenzyme F430

(PFALTZ, 1982)



coenzyme F420

(EIRICH *et al.*, 1978)

Figure 7 : Structure des coenzymes spécifiques des méthanogènes.

structurale avec l'acide pantothénique.

#### 4. Le coenzyme F<sup>4</sup>20

Plusieurs formes diffèrent par le nombre de résidus glutamyl (EIRICH, 1978 ; VAN BEELEN, 1983). Elles sont présentes à des concentrations variables (GORRIS, 1986). Analogue aux flavines, il s'agit d'un transporteur d'électrons associé à différentes activités enzymatiques du catabolisme et de l'anabolisme. Sous sa forme oxydée, il absorbe à 420 nm pour émettre une fluorescence jaune à 405 nm.

#### 5. Le coenzyme F<sup>4</sup>30

C'est un transporteur d'électrons abondant chez toutes les méthanogènes. Inséré dans un complexe tétrapyrrolique dérivé de la corphine, l'atome de nickel est perpendiculaire au plan du cycle (PFALTZ, 1982). Il est jaune non fluorescent et absorbe à 430 nm. Avec le coenzyme M il constitue le groupement prosthétique de la méthylréductase (KELTJENS et al., 1982).

#### 6. La méthanoptérine

Elle a été identifiée chez *Mb. thermoautotrophicum* (KELTJENS, 1983) et chez *Ms. barkeri* (VAN BEELEN, 1984). Chez les *Methanosarcinaceae*, elle possède un résidu glutamyl supplémentaire dans la chaîne latérale (sarcinaptérine). La MPT est une amino-2-hydroxy-4-pteridine substituée par une chaîne latérale. Elle absorbe à 340 nm et émet une fluorescence bleue. Les analogies structurales avec l'acide folique sont frappantes. Sous la forme active H<sub>4</sub> MPT, son rôle de transporteur de groupements monocarbonés est essentiel pour les hydrogénophiles. Il s'agit du F<sup>4</sup>32 de GUNSALUS et WOLFE (1978), du "Yellow Fluorescent Compound" (YFC) de DANIELS

(KELTJENS, 1983) ← ——— méthanoptérine ——— →  
 (VAN BEELEN, 1984) ← ——— sarcinaptérine ——— →

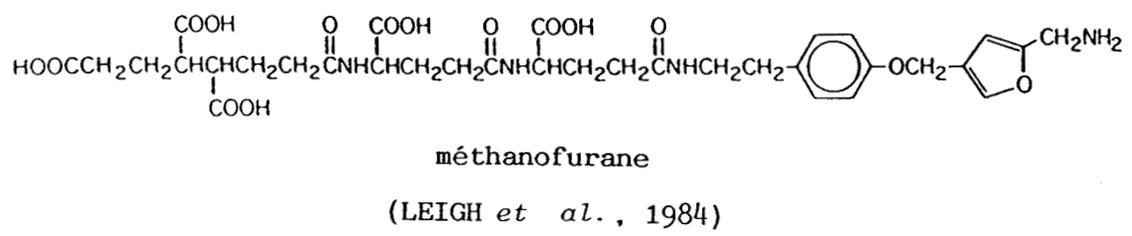
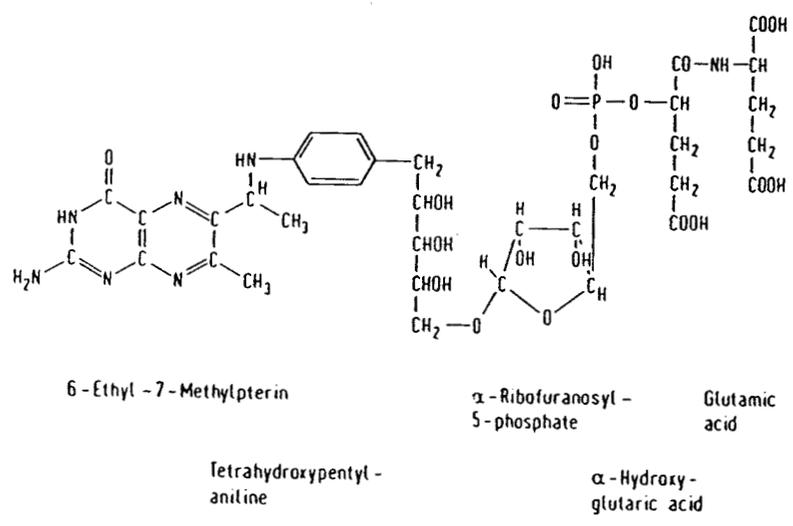


Figure 7 : Structure des coenzymes spécifiques des méthanogènes.

(1978) et du "formaldehyde activating factor" d'ESCALANTE-SEMERENA (1984).

## 7. Le méthanofurane

Anciennement nommé facteur CDR (Carbon Dioxide Reduction factor), ce composé doit son nom à la présence d'un cycle furanique (LEIGH *et al.*, 1984). Il joue un rôle clef dans la fixation du CO<sub>2</sub> pour *Mb.thermoautotrophicum* (LEIGH *et al.* 1985).

## CHAPITRE II

### METABOLISME ENERGETIQUE

#### I. CATABOLISME

Les méthanogènes puisent leur énergie de la formation du  $\text{CH}_4$  (WOLFE, 1971) dans des écosystèmes méthanogènes, avec une pression partielle d' $\text{H}_2$  de 1  $\mu\text{M}$ . Le  $\Delta G'^{\circ}$  de la réaction  $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$  est de -62,7 kJ (THAUER *et al.*, 1977). Pour les acétoclastes, la réaction  $\text{CH}_3\text{-COO}^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{CH}_4$  est exergonique :  $\Delta G'^{\circ} = -31$  kJ. Si la voie catabolique de la réduction du  $\text{CO}_2$  en  $\text{CH}_4$  est en grande partie élucidée, en revanche, le mécanisme de la méthanogenèse à partir d'acétate est moins bien cerné. Cependant, quels que soient l'espèce et le substrat de croissance, les méthanogènes ont une étape métabolique commune, la réduction du méthyl-CoM en  $\text{CH}_4$ .

#### A. FORMATION DU METHYL-COM

Les voies de formation du  $\text{CH}_4$  à partir des différents substrats convergent au niveau d'un intermédiaire commun (BARKER, 1956) : le méthyl-CoM.

Pour *Mb. thermoautotrophicum*, la formation de méthyl-CoM à partir de  $\text{CO}_2$  implique une série d'étapes de réductions du radical monocarboné aux stades formate (hypothétique), formaldéhyde, méthényl, méthylène et méthyl. Le radical monocarboné est véhiculé jusqu'au coenzyme M par des transporteurs spécifiques : méthanofurane et tétrahydrométhanoptérine. Hormis la fixation de  $\text{CO}_2$  et sa réduction en formyl MFR dont le mécanisme est couplé à la déméthylation du méthyl-CoM par l'effet RPG inexplicé (GUNSALUS et WOLFE, 1977), la compréhension des

réactions est assez avancée (Figure 8, p. 25) et certains enzymes ont été purifiés. La formyl-MFR :  $H_4$ MPT formyltransférase (DONNELLY et WOLFE, 1986) catalyse le transfert du résidu formyl du MFR à la MPT. Les réductions suivantes jusqu'au stade méthyl font intervenir une méthényl- $H_4$ MPT cyclohydrolase (DIMARCO *et al.*, 1986), une méthylène- $H_4$ MPT : F420 oxydo-réductase (HARTZELL *et al.*, 1985), une méthylène- $H_4$ MPT réductase et une méthyl- $H_4$ MPT : HSCoM méthyl transférase, (les deux derniers enzymes cités étant spéculatifs) selon un mécanisme analogue aux réactions impliquant l'acide folique. L' $H_2$  est la source d'électrons pour toutes ces étapes de réduction, par la réaction :  $H_2 \longrightarrow 2H^+ + 2e^-$  catalysée par une ou plusieurs hydrogénases comportant des centres fer-soufre, du FAD et du nickel. L'enzyme est capable de réduire le F420 (JACOBSON *et al.*, 1982 ; KOJIMA *et al.*, 1983). Le F420 intervient probablement pour toutes les étapes de réduction mais ce rôle n'a été clairement défini que pour la méthylène- $H_4$ MPT : F420 oxydo-réductase.

Pour les acétoclastes, on sait que le radical méthyl de l'acétate est transformé en  $CH_4$  selon le schéma :  ${}^{\bullet}CH_3-COOH \longrightarrow {}^{\bullet}CH_4 + CO_2$  (PINE et BARKER, 1955). On connaît très peu le mécanisme de formation du méthyl-CoM et l'hypothèse actuelle (Figure 9, p. 25) est inspirée de la synthèse de l'acétate chez les acétogènes (LJUNGDAHL, 1986). L'hypothèse actuelle est que l'acétyl-CoA serait l'intermédiaire activé de l'acétate (GRAHAME et STADTMAN, 1987), le complexe enzymatique responsable de sa rupture comporterait une CO-deshydrogénase (NELSON *et al.*, 1987) et des corrinoïdes dont la fonction est inconnue (EIKSMANN et THAUER, 1985).

La méthylation du coenzyme M à partir de  $CH_3OH/H_2$  pour *Ms.barkeri* requiert deux fractions protéiques (MEIJDEN *et al.*, 1983a).  $MT_1$  dont le groupement prosthétique HBI cobamide est méthylé par le méthanol en présence d'ATP et  $H_2$ . Le résidu méthyl est ensuite transféré au CoM par  $MT_2$ . L'ATP a un rôle activateur,

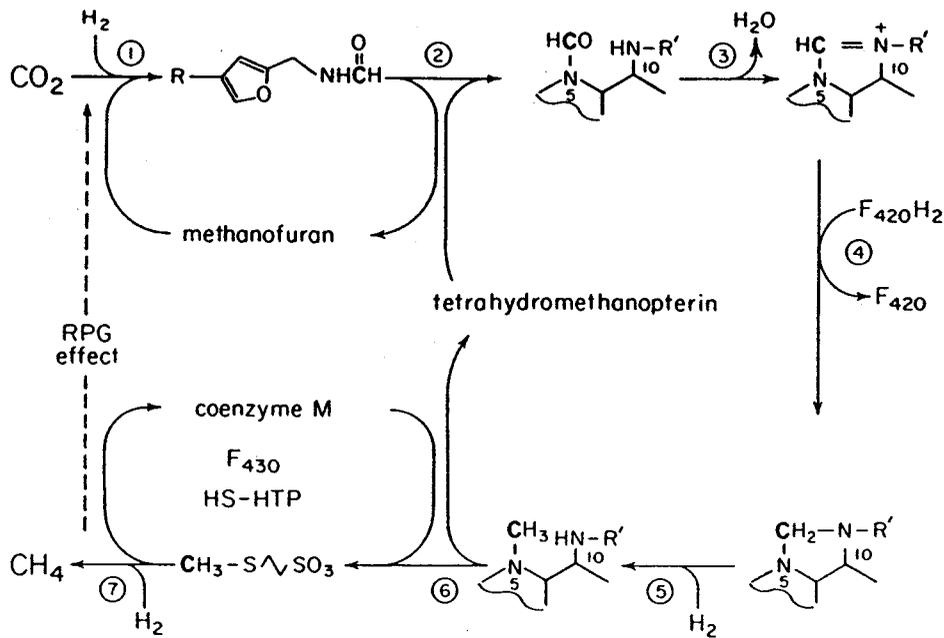


Figure 8 : Formation du méthane à partir de  $\text{CO}_2$ . 1, formyl-MFR synthetase; 2, formyl-MFR: $\text{H}_4\text{MPT}$  formyltransferase; 3, methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}$  cyclohydrolase; 4, methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$ : $\text{F}_{420}$  oxidoreductase; 5, methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  reductase; 6, methyl- $\text{H}_4\text{MPT}$ : $\text{HS-CoM}$  methyltransferase; and , 7,  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$  methylreductase.

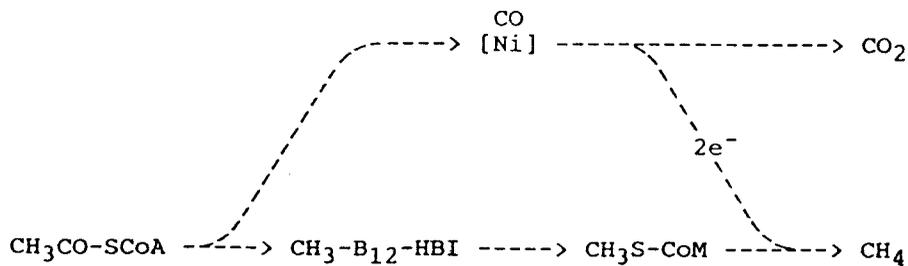


Figure 9 : Formation du méthane à partir d'acétate.

(NELSON *et al.*, 1987)

c'est le seul cas où des corrinoïdes sont clairement impliqués dans les transports de C1 (Figure 10, p. 28).

## B. LE COMPLEXE METHYL COM METHYLREDUCTASIQUE

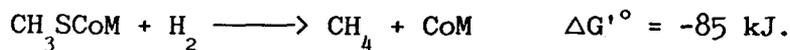
Le fonctionnement du complexe méthylréductase de *Mb. thermoautotrophicum* (hydrogénophile) nécessitait la présence de quatre fractions protéiques : A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> et C et des cofacteurs : ATP, Mg<sup>2+</sup>, FAD et HS-HPT (NAGLE et WOLFE, 1983, Figure 11a, p. 28). La fraction A<sub>1</sub> comporte une hydrogénase dépendante du F420 et du FAD (NAGLE et WOLFE, 1983). Le composant A<sub>2</sub> a été purifié (ROUVIERE *et al.*, 1985) il est formé d'une chaîne polypeptidique de masse 55 000. A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> (ROUVIERE et WOLFE, 1987) se lient à l'ATP et seraient impliqués dans l'activation de la réaction par l'ATP décrite par GUNSALUS et WOLFE (1978). L'ion Mg<sup>2+</sup> est un effecteur de la réaction (WHITMAN et WOLFE, 1983) indépendant de l'ATP. Le composant C est la méthyl-réductase proprement dite. Il est formé de trois sous-unités dans une stoechiométrie  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  (ELLEFSON, 1981). Il comporte du coenzyme M et du coenzyme F430 dans un rapport 2:2. (HAUSINGER *et al.*, 1984, HUSTER *et al.*, 1985, KELTJENS *et al.*, 1982), le F430 étant clairement impliqué dans la réduction du méthyl-CoM (HARTZELL et WOLFE, 1986). Récemment NOLL et WOLFE (1987) ont montré que le composant C contenait également du HS-HPT.

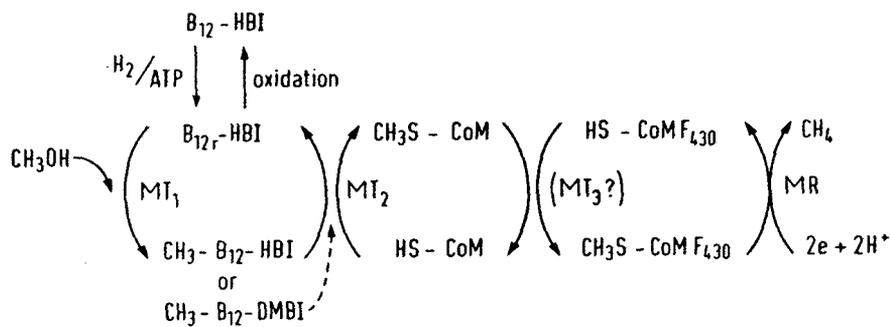
Les composants A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, le FAD et l'hydrogène peuvent être remplacés par un système donneur d'électrons artificiel (ANKEL FUCHS et THAUER, 1986) comportant le DTT réduit et la B12a mais ce système "minimum" n'est efficace que pour *Mb. thermoautotrophicum* souche Marburg utilisée par ces auteurs. Dans ce mécanisme (Figure 11b, p. 28), la B12a est réduite en B12s par le D.T.T. L'importance des corrinoïdes dans l'activation de la méthylréductase avait été préalablement montré par NAGLE et WOLFE (1983) et WHITMAN et WOLFE (1982, 1983).

Comme pour les hydrogénophiles, l'étape finale de la méthanogénèse à partir d'acétate est la déméthylation réductive du méthyl-CoM. En extrait acellulaire, le CO ou l'H<sub>2</sub> peuvent servir de donneur d'électrons (NELSON et FERRY, 1984). La CO deshydrogénase est impliquée dans cette réaction. Des centres fer-soufre et du nickel interviennent dans les transferts électroniques, sans que l'on connaisse l'accepteur physiologique d'électrons le F420 ne pouvant jouer ce rôle *in vitro*.

Le CO libre n'a jamais été mis en évidence comme intermédiaire. En fait, le résidu carboxyle de l'acétate serait après rupture de la liaison carbone-carbone le substrat physiologique de la CO deshydrogénase. Un système minimum permettant la synthèse de CH<sub>4</sub> à partir de méthylcoenzyme M a été défini par DEBEIRE (communication personnelle) (1988) sur le modèle *Methanotherix* (Figure 11c, p. 28) avec le composant C purifié en utilisant le citrate de titane comme agent réducteur, il ne peut être remplacé par le CO et la CO deshydrogénase. Par ailleurs, selon un mécanisme hypothétique. LOVLEY et FERRY (1985) proposent que l'hydrogène pourrait être un intermédiaire entre le CO et la réduction du méthylcoenzyme M. Cette hypothèse, étayée par l'observation de la production et de la consommation concomitante d'hydrogène par une culture de *Methanosarcina sp.*, pourrait expliquer en fait que la méthylréductase fonctionne avec de l'hydrogène en extrait acellulaire.

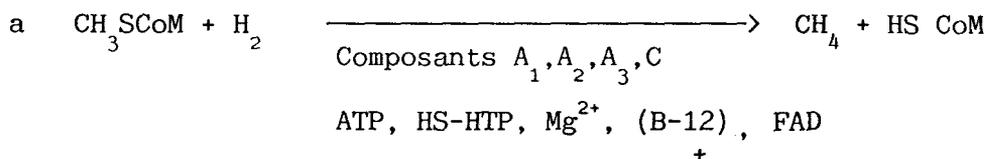
La réduction du méthyl-CoM, commune à toutes les méthanogènes, est la seule réaction pouvant engendrer une libération d'énergie libre suffisante pour être couplée à la phosphorylation de l'ADP, par exemple chez les hydrogénophiles :



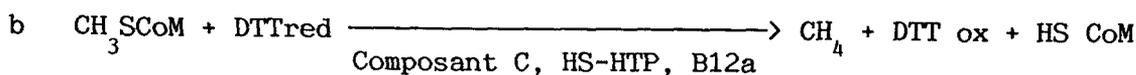


- $MT_1$  = Methanol :  $B_{12r}$ -HBI methyltransferase  
 $MT_2$  =  $CH_3$ - $B_{12}$ -HBI : HS-CoM methyltransferase  
 $MT_3$  =  $CH_3S$ -CoM : HS-CoM  $F_{430}$  methyltransferase  
 $MR$  =  $CH_3S$ -CoM  $F_{430}$  methylreductase

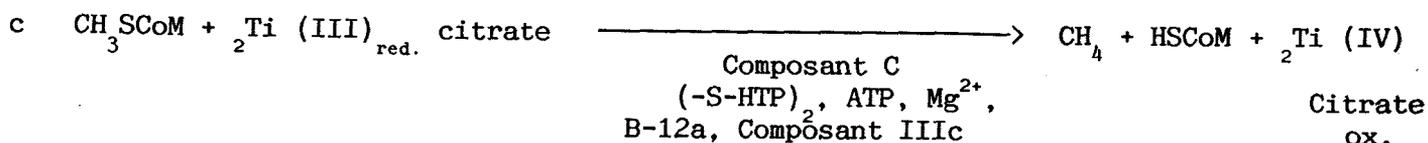
Figure 10 : Formation du méthane à partir du méthanol.



Mb.thermoautotrophicum souche  $\Delta H$



Mb.thermoautotrophicum souche Marburg



Mtx-soehngeni souche FE

Figure 11 : Reconstitutions du système méthylréductasique

a : GUNSALUS et WOLFE, 1980

b : FUCHS et THAUER, 1985

c : DEBEIRE (communication personnelle) (1988)

On considère que le *quantum* d'énergie nécessaire à la formation d'1 ATP *in vivo* est de  $-44 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Pour les acétoclastes, le problème est différent puisque la réaction : Acétate +  $\text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$  libère  $-36 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , imposant un mécanisme chimiosmotique. En tout état de cause, la réduction du méthyl coenzyme M doit fournir une énergie supérieure à 1 ATP puisqu'un ATP est nécessaire à l'activation de l'acétate.

Le mécanisme du couplage est connu dans ses grandes lignes.

## II. BIOGENESE DE L'ATP

Comme pour les organismes aérobies, l'énergie de croissance des anaérobies peut provenir de deux mécanismes fondamentaux : la phosphorylation au niveau du substrat (SLP) et la phosphorylation par création d'un gradient de protons transmembranaire (ETP).

Si l'on excepte le cas de la "respiration fumarate", le mécanisme SLP constitue le mode de formation d'ATP au cours des fermentations dans lesquelles l'accepteur final d'électrons est organique. Au cours des réactions, il se forme des liaisons riches en énergie ( $\Delta G'^{\circ} < -20,9 \text{ kJ/mole}$ ) dont l'hydrolyse permet la phosphorylation de l'ADP par une kinase. Les composés comportant une liaison riche en énergie impliqués dans les mécanismes SLP sont peu nombreux. Parmi ceux-ci, l'acétyl-CoA joue un rôle fondamental (Figure 12, p. 30). La libération d'énergie au cours des fermentations est assez faible, la fermentation d'une mole de glucose rapporte 2 ATP par la voie glycolytique d'EMBDEN MEYERHOFF et un seul par les voies d'ENTNER DOUDOROFF et des pentoses phosphates, contre 38 pour un organisme aérobie.

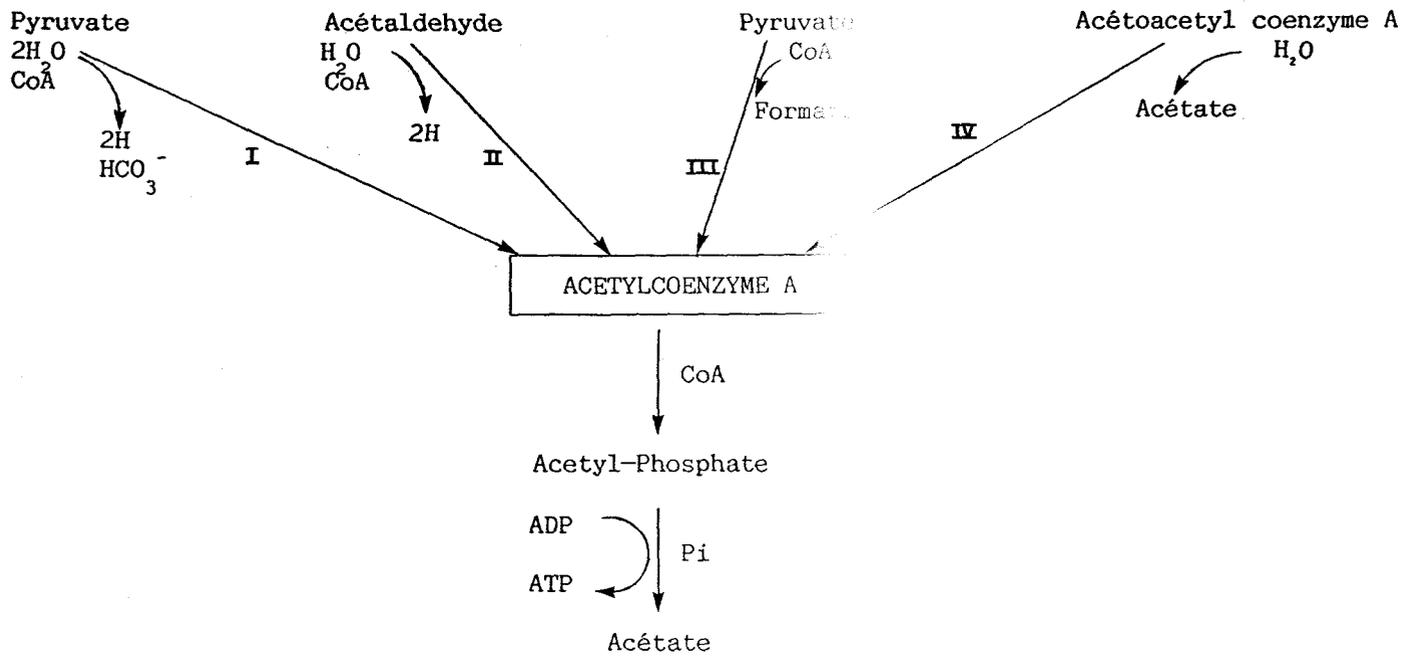


Figure 12 : Rôle de l'acétyl coenzyme A dans le métabolisme énergétique.

- : I Pyruvate ferredoxine oxydo-réductase (*Clostridium*)
- II Acétaldéhyde deshydrogénase (*Clostridium-Desulforomonas*)
- III Pyruvate formate lyase (*Clostridium-scherichia*)
- IV Thiolase (*Clostridium-Escherichia*).

Dans les mécanismes ETP (MITCHELL, 1961) les transports électroniques génèrent une force protonmotrice qui consiste en un gradient de protons et une différence de potentiel de part et d'autre d'une membrane. Cette force protonmotrice libère de l'énergie selon  $\Delta G'^{\circ} = -n F \Delta E'^{\circ}$

n : nombre d'électrons mis en jeu

F : constante de faraday 96 KJ/mole

E : potentiel d'oxydoréduction standard

et conduit à la synthèse d'ATP pour  $\Delta E'^{\circ} = 0,16$  volt. La phosphorylation de l'ADP par une ATP synthétase membranaire est couplée à la translocation du proton. Chez les anaérobies, la force protonmotrice peut être obtenue de deux manières : par photophosphorylation anoxygénique (phototrophes) ou par certains types de fermentation (chimolithotrophes).

Selon la composition en chlorophylles et en caroténoïdes, les bactéries phototrophes sont classées en bactéries vertes ou pourpres. La photophosphorylation anoxygénique ne libère pas d'O<sub>2</sub> ; l'eau n'est jamais donneur d'électrons, ceux-ci peuvent être minéraux : dérivés du soufre (bactéries du soufre) ou organiques : glucose, acétate, alcool. L'énergie lumineuse ( $E = h\nu$ ) est absorbée sous forme de quanta par la bactériochlorophylle qui émet un électron (oxydation) ; son potentiel passe alors de + 440 mv à -300 mv. L'électron est intégré à une chaîne de transporteurs membranaires ; ferroprotéines, quinones, cytochromes, qui créent la force protonmotrice ; le système est cyclique (Figure 13, p. 32).

Les fermentations dans lesquelles l'accepteur final d'électrons est une substance minérale permettent la formation d'un gradient de protons transmembranaire à l'origine du gain d'énergie. Le phénomène est mis en évidence

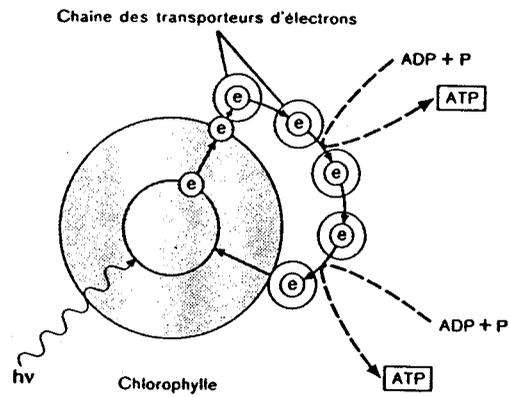


Figure 13 : Photophosphorylation cyclique.

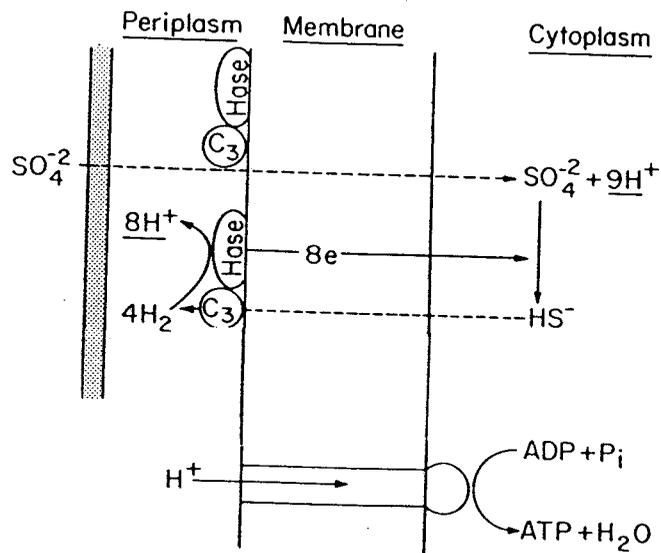


Figure 14 : Synthèse d'ATP chez les sulfato-réductrices.

par la croissance d'anaérobies strictes sur  $H_2/CO_2$  (méthanogènes)  $H_2/SO_4^-$  (sulfatoréductrices),  $H_2/NO_3^-$  (dénitrifiantes) et  $H_2/NO_2^-$  (dénitritantes). Dans le cas des sulfatoréductrices, le gradient de protons est obtenu par une hydrogénase périplasmique spécifique d'un cytochrome  $C_3$  ( $E'^0 = -300$  mv) (PECK, 1984, Figure 14, p 32). Pour les méthanogènes, les deux types de mécanismes ont été envisagés.

#### A. LE MECANISME SLP

L'hypothèse est énoncée par LANCASTER (1986) qui fait intervenir un intermédiaire formyl-phosphate capable de phosphoryler l'ATP, le mécanisme est couplé à la méthylréductase (Figure 15, p. 34), mais aucun fait d'expérience ne vient illustrer cette hypothèse.

#### B. LE MECANISME ETP

Un gradient artificiel de protons imposé à des cellules de *Ms.barkeri* (MOUNTFORT, 1978) et de *Mb.thermoautotrophicum* (DODDEMA *et al.*, 1979) conduit à la synthèse d'ATP, faisant ainsi la démonstration d'un mécanisme ETP chez les méthanogènes. Le lien entre la méthanogenèse sur  $H_2/CH_3OH$  chez *Ms.barkeri* (BLAUT et GOTTSCHALK, 1982) et la synthèse chimiosmotique de l'ATP a été prouvée (Figure 16, p. 34). En effet :

- L'addition du protonophore TCS élimine le gradient membranaire d' $H^+$ , diminue la concentration d'ATP en maintenant la formation de  $CH_4$ .
- L'inhibiteur d'ATP-ase DCCD inhibe la formation de  $CH_4$  mais n'interfère pas avec le gradient d' $H^+$ . Cette inhibition est levée par le T.C.S.

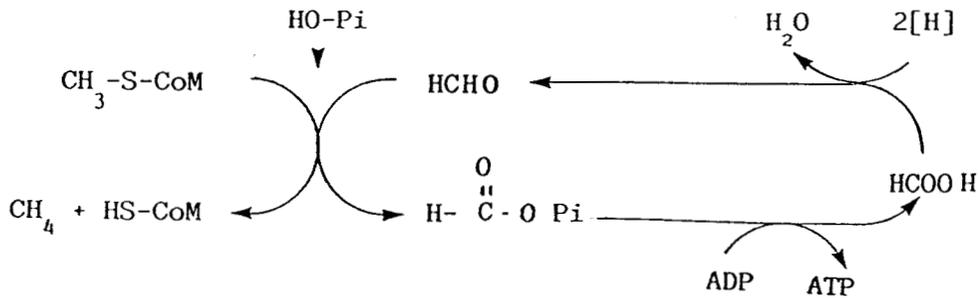


Figure 15 : Mécanisme SLP hypothétique chez les méthanogènes.  
LANCASTER (1986)

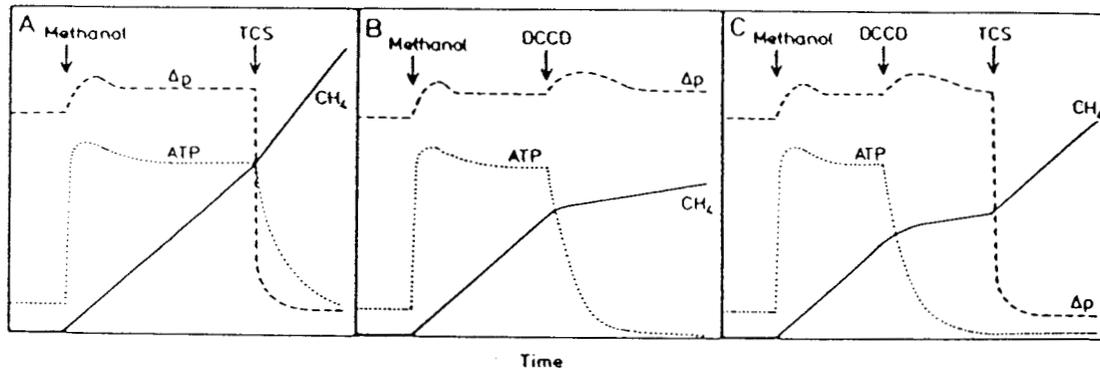


Figure 16 : Formation de méthane à partir de méthanol et d'hydrogène (*Methanosarcina barkeri*) (BLAUT et GOTTSCHALK, 1982)  
a : effet du protonophore TCS  
b : effet de l'inhibiteur d'ATP ase DCCD  
c : effet du DCCD suivi du TCS

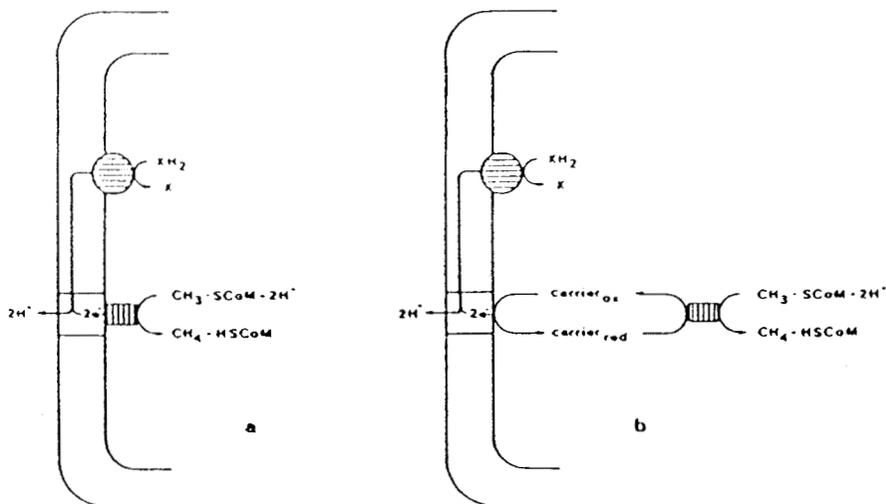


Figure 17 : Schémas hypothétiques impliquant la méthylréductase dans le gradient électrochimique d'H<sup>+</sup>.  
a Méthyl réductase associée à la membrane  
b Méthyl réductase et transporteurs cytosolubles.

Ces expériences relient clairement dans cet ordre méthanogénèse, gradient de protons et synthèse d'ATP en excluant un mécanisme SLP. Le mécanisme est probablement généralisable aux autres substrats.

### C. MISE EN PLACE DU GRADIENT DE PROTONS

La réduction du  $\text{CH}_3\text{-CoM}$  en  $\text{CH}_4$  est la seule étape suffisamment exergonique pour permettre la synthèse d'ATP. Deux modèles pour le transfert d'électrons du système donneur au méthyl-CoM sont envisageables :

- le transfert d'électrons du donneur au composant C membranaire, la réduction du méthyl-CoM crée le gradient de protons.
- Les électrons sont transférés au composant C, cytosolique, par l'intermédiaire de transporteurs solubles non mis en évidence.

La localisation immunocytochimique du composant C est selon certains auteurs membranaire (OSSMER *et al.*, 1986 ; ALDRICH *et al.*, 1987) ou cytosolique et membranaire (GUNSALUS et WOLFE, 1978 ; THOMAS, 1985). Dans ce cas, le composant C cytosolique peut provenir d'une "sur-production" de la cellule et être indépendant de la fonction énergétique.

## CHAPITRE III

### ANABOLISME

#### I. ASSIMILATION DU SUBSTRAT CARBONE CHEZ LES METHANOGENES

Certaines bactéries méthanogènes hydrogénophiles sont capables de se développer sur un milieu minéral avec du CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone, et sont donc des autotrophes. Les espèces acétoclastes et celles utilisant le méthanol et les méthylamines sont des hétérotrophes, on préfère cependant parler d'acétotrophes et de méthylotrophes.

Plusieurs voies sont connues pour l'assimilation autotrophe du CO<sub>2</sub> chez les anaérobies, il s'agit du cycle réductif des pentoses phosphates, du cycle réductif des acides tricarboxyliques (TCA) et la voie de l'acétyl-coenzyme A.

Le cycle réductif des pentoses phosphates (Figure 18, p. ) est assez peu répandu parmi les anaérobies, il a été mis en évidence chez certaines bactéries pourpres non dépendantes du soufre tel que *Rhodospseudomonas* (CODD, 1984). Le cycle réductif TCA (Figure 19, p. 37) est plus répandu ; parmi les Eubactéries : *Chlorobium limicola* (EVANS *et al.*, 1986) ; *Hydrogenobacter thermophilus* (SHIBA *et al.*, 1985) et parmi les Archaeobactéries : *Thermoproteus* (SCHAFER *et al.*, 1986). Le mode de fixation le plus répandu est la voie de l'acétyl-CoA (Figure 20, p. 37). Cette voie est spécifique aux anaérobies : méthanogènes (ZEIKUS, 1983 ; FUCHS, 1986) acétogènes (WOOD *et al.*, 1986 ; DIEKERT et THAUER, 1978) et les réductrices de sulfates (JANSEN *et al.*, 1984).

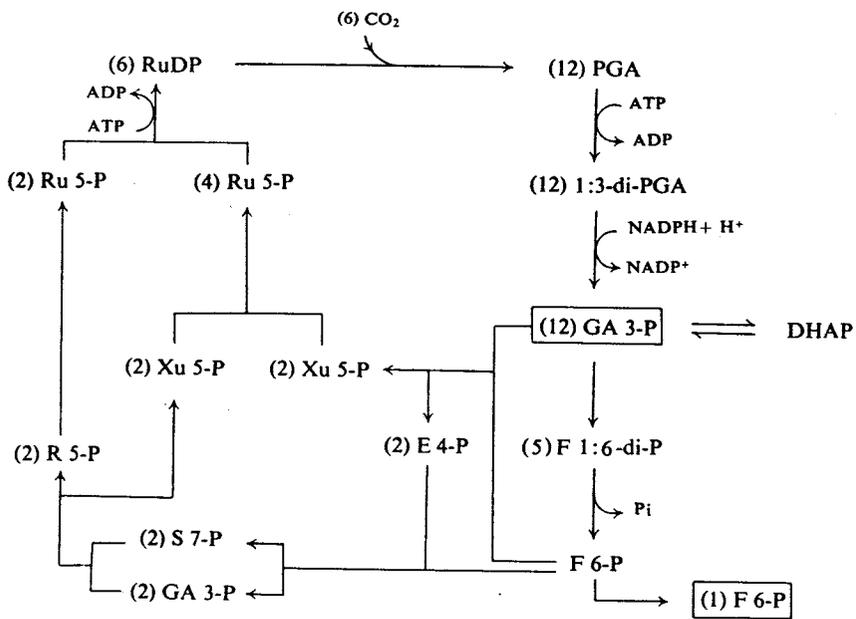


Figure 18 : Fixation du CO<sub>2</sub> par le cycle de CALVIN.

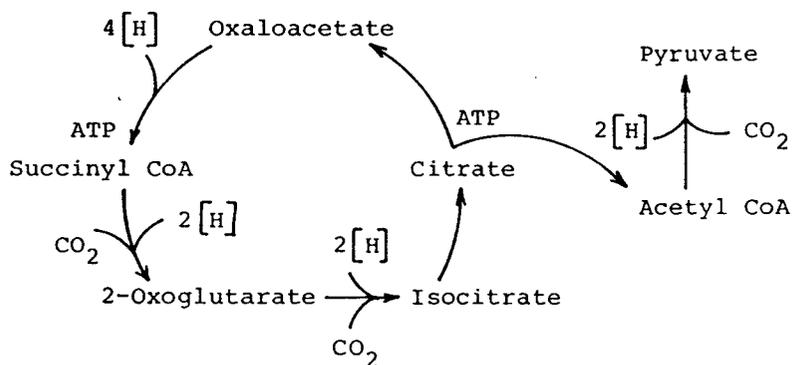


Figure 19 : Fixation du CO<sub>2</sub> par le cycle réductif des acides tricarboxyliques.

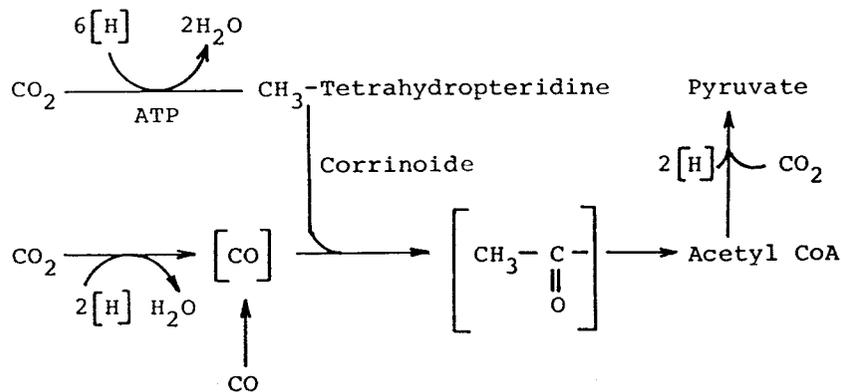
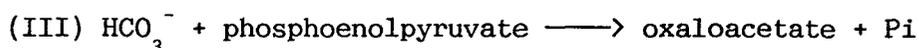
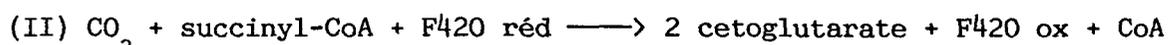
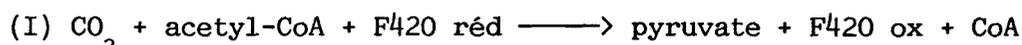


Figure 20 : Fixation du CO<sub>2</sub> par la voie de l'acétylcoenzyme A

## A. FIXATION DU CO<sub>2</sub> CHEZ LES METHANOGENES HYDROGENOPHILES

La fixation du CO<sub>2</sub> chez les méthanogènes hydrogénophiles aboutit à la formation d'acétyl-CoA qui est le premier intermédiaire stable formé (STUPPERICH *et al.*, 1983). Le mécanisme de cette synthèse (Figure 21, p. 39) utilise la voie de la méthanogénèse jusqu'à l'intermédiaire méthyl -H<sub>4</sub> MPT. Le (-CH<sub>3</sub>) est alors non pas transféré au coenzyme M, mais à une protéine à corrinoïde, avec formation de 5-OH benzimidazolyl Co-méthylcobamide (Co-méthyl facteur III). L'étape finale est la condensation du (-CH<sub>3</sub>) avec le (-CO) provenant du CO<sub>2</sub>, et le coenzyme A par un complexe comportant une CO deshydrogénase à nickel (Ni-E), (HAMMEL *et al.*, 1984). Outre la synthèse *de novo* de l'acétyl-CoA, trois réactions de carboxylation ont été mises en évidence chez *Mb.thermoautotrophicum* :



Elles sont catalysées respectivement par la pyruvate synthase (I), l' $\alpha$ CG synthase (II) (ZEIKUS *et al.*, 1977) et la PEP carboxylase (KENEALY *et al.*, 1982). La pyruvate synthase et l' $\alpha$ CG synthase sont spécifiques du transporteur d'électrons F<sup>4</sup>20 plutôt que du NAD, du NADP ou de la ferredoxine. Les enzymes clefs du cycle réductif des pentoses phosphate (phosphoribulokinase et ribulose 1, 5, bisphosphate carboxylase) et du cycle réductif TCA (isocitrate deshydrogénase) n'ont pas été détectés (TAYLOR *et al.*, 1976 ; ZEIKUS *et al.*, 1977 ; DANIELS *et al.*, 1978) ; *Mb.thermoautotrophicum* possède en fait un cycle TCA incomplet et qui fonctionne dans le sens réductif, son rôle est purement anabolique, il est nécessaire pour la synthèse d'acide aspartique, d'acide glutamique et de leurs

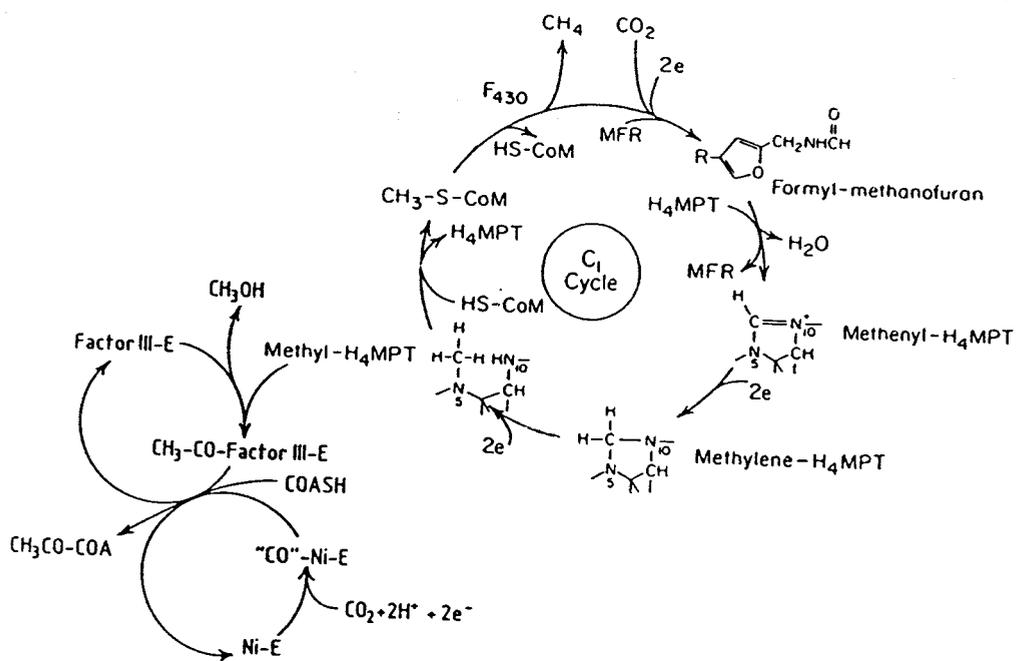
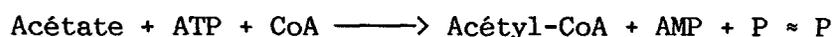


Figure 21 : Synthèse d'acetyl coenzyme A chez les hydrogénophiles.

dérivés (Figure 22, p. 41).

## B. ANABOLISME A PARTIR D'ACETATE

L'acétyl-CoA est le premier intermédiaire formé ; des activités importantes d'activation de l'acétate sont détectées chez les acétoclastes pour lesquels les voies de l'anabolisme et du catabolisme doivent diverger à partir de cet intermédiaire. Deux mécanismes menant à la formation d'acétyl-CoA sont possibles : par l'action d'une acétate CoA ligase (Acétate thiokinase) :



comme pour *Mtx.soehngeni* (KOHLEK et ZEHNDER, 1984) ou par l'action successive d'une acetate kinase et d'une phosphotransacetylase comme chez *Ms.barkeri* (KENEALY et ZEIKUS, 1982a) et pour *Ms.thermophila* (GRUSON, 1985).

*Mb.thermoautotrophicum* est capable d'utiliser l'acétate comme source de carbone cellulaire (il n'y a pas de formation de CH<sub>4</sub> avec ce substrat), dans ce cas l'acétate est activé par le système thiokinase (OBERLIES *et al.*, 1980).

*Ms.barkeri* utilise deux réactions de carboxylation pour incorporer du CO<sub>2</sub> (WEIMER et ZEIKUS, 1979), la pyruvate synthase, spécifique du F420, et probablement une pyruvate carboxylase, comme le montrent des expériences de marquage sans que l'activité enzymatique ait pu être dosée. *Ms.barkeri* possède contrairement à *Mb.thermoautotrophicum* une isocitrate deshydrogénase à NADP au sein d'un cycle TCA incomplet (Figure 23, p. 41) et fonctionnant dans le sens oxydatif, son rôle étant anabolique. Pour les acétoclastes, 1/3 du carbone cellulaire est dérivé du CO<sub>2</sub>.

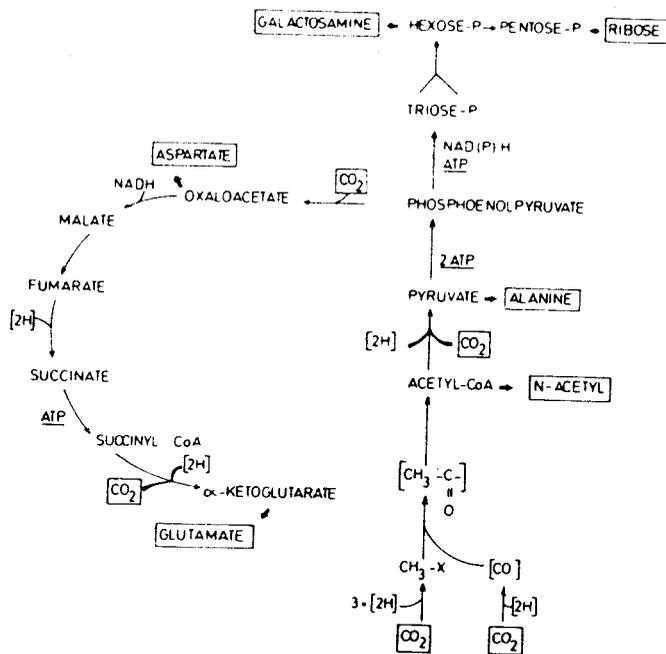


Figure 22 : Assimilation du CO<sub>2</sub> chez *Methanobacterium thermoautotrophicum*.  
(FUCHS et STUPPERICH E. 1984)

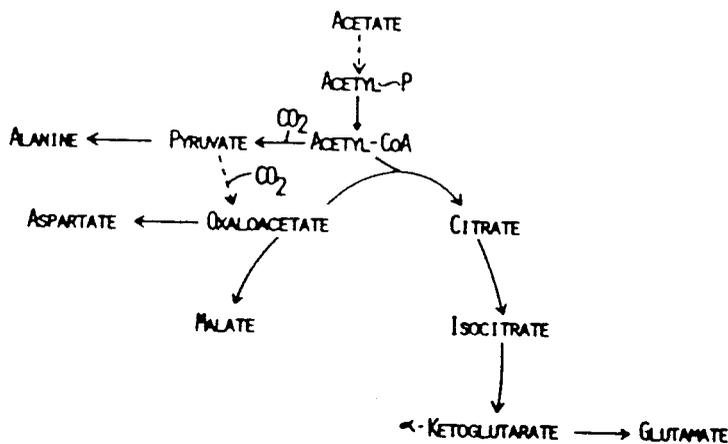


Figure 23 : Assimilation de l'acétate et du CO<sub>2</sub> chez *Methanosarcina barkeri*.  
(WEIMER et ZEIKUS, 1979).

## II. NEOGLUCOGENESE

Les méthanogènes n'utilisant pas le cycle de Calvin possèdent un mécanisme original de biosynthèse des sucres dans lequel l'acetyl-CoA est le premier intermédiaire, pour les hydrogénophiles comme pour les acétoclastes.

La synthèse de glucose 6-phosphate a été étudiée en détail chez *Mb. thermoautotrophicum* (JANSEN *et al.*, 1982). une première approche a été obtenue par l'utilisation des techniques de marquage : en court terme au  $^{14}\text{CO}_2$  et en marquage à long terme avec du ( $^{14}\text{C}$ ) pyruvate. Cette approche a été complétée par la recherche dans les extraits cellulaires des enzymes impliqués dans ce métabolisme. Pour des temps de contact très courts, l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  par une culture en phase exponentielle de croissance se fait d'abord au niveau des acides aminés (Ala) puis au niveau du 3-phosphoglycérate et enfin dans les sucres phosphate. L'expérience a confirmé la non-intervention du cycle de CALVIN et que les sucres sont synthétisés *de novo* à partir du  $\text{CO}_2$ . A partir de [ $2^{14}\text{C}$ ] pyruvate, l'analyse des positions de marquage des glucosamines extraites de la paroi, en  $\text{C}_2$  et  $\text{C}_5$  suggèrerait une voie utilisant la condensation de trioses-phosphates. De fait, les activités impliquées dans un tel schéma ont été retrouvées dans les extraits cellulaires : la pyruvate synthase (ZEIKUS *et al.*, 1977), la PEP synthétase (EYZAGUIRRE *et al.*, 1982) qui permet la synthèse directe du phosphoenolpyruvate à partir de pyruvate et d'ATP, contournant ainsi la réaction irréversible de la pyruvate kinase. Puis l'enolase, les phosphoglycerate mutase et kinase, la glyceraldehyde phosphate deshydrogénase (JANSEN *et al.*, 1982) et la triose phosphate isomérase (FUCHS *et al.*, 1983) assurant la synthèse des trioses phosphates. Les activités aldolase et fructose 1-6-bisphosphatase (FUCHS *et al.*, 1983) sont restées longtemps indétectables, présentant la particularité d'être sensibles à l' $\text{O}_2$ , et l'aldolase fonctionnant uniquement dans le sens condensation

et en présence de  $Mg^{2+}$ . Le mécanisme total de synthèse de glucose 6-phosphate à partir de phosphoenolpyruvate est celui de la glycolyse d'EMBDEN MEYERHOFF en sens inverse (Figure 24, p. 45). Le même schéma est soupçonné pour *Msp.hungatei* (EKIEL *et al.*, 1983). Aucun mécanisme de régulation de cette voie n'est connu, tout au plus peut-on dire que l'activité PEP synthétase possède des effecteurs potentiels : l'AMP, l'ADP, le phosphate inorganique et l' $\alpha$ -cetoglutarate sont inhibiteurs (EYZAGUIRE *et al.*, 1982) et la fructose 1,6-bisphosphatase est inhibée par le PEP et dans une moindre mesure par les  $A_3PG$ , GTP et UTP.

Chez les méthanogènes acétoclastes, les renseignements disponibles étaient très fragmentaires. EKIEL *et al.*, (1985) ont étudié les différentes voies de biosynthèse de *Mtx.concillii* par la RMN du  $^{13}C$ . Le marquage sur les  $C_1$  et  $C_6$  du glucose à partir de ( $2-^{13}C$ ) acétate correspond à une voie de synthèse analogue à celle de *Mb.thermoautotrophicum*. Aucun des enzymes impliqués n'a été mis en évidence.

### III. LE GLYCOGENE

L'accumulation de glycogène est un phénomène commun chez les bactéries; la distinction aérobie/anaérobie n'existe pas à ce niveau. L'accumulation intervient généralement quand les conditions de milieu sont limitantes en un élément tel que source d'azote, de soufre, de phosphate, généralement en phase stationnaire de croissance. Son rôle est défini comme une substance de réserve servant à fournir le matériel carboné et l'énergie de maintenance dans des conditions de non prolifération (PREISS et WALSH, 1981).

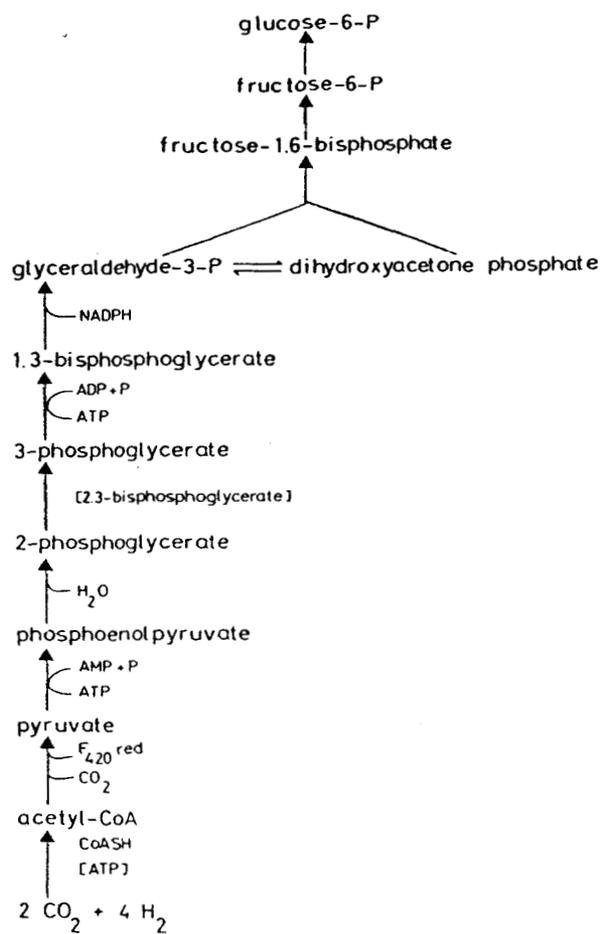


Figure 24 : Néoglucogénèse chez *Methanobacterium thermoautotrophicum*  
 (JANSEN *et al.*, 1982)

## A. LE GLYCOGENE CHEZ LES BACTERIES METHANOGENES

Du glycogène a été isolé et identifié chez quelques bactéries méthanogènes, *Methanobolus* et *Methanococcus* accumulant également glycogène et polyphosphates quand les conditions de croissance sont limitantes en azote (KONIG *et al.*, 1985). Dans les mêmes conditions, *Ms-thermophila* TM1 en accumule 2 % (rapport glycogène/protéine) (MURRAY et ZINDER, 1987). D'autres observations ont fait état d'inclusions cytoplasmiques pouvant être du "matériel de réserve". Chez *Ms-barkeri* (ZEIKUS, 1977), pour différentes souches de *Methanosarcina* (SHERER et BOCHEM, 1983 ; TOUZEL *et al.*, 1985 ; ZHILINA, 1976) pour *Methanoplanus* (WILDGRUBER *et al.*, 1982 ; Van BRUGGEN *et al.*, 1986), *Methanogenium* (ZABEL *et al.*, 1984) et *Methanosphaera* (MILLER et WOLIN, 1985). Mais aucune donnée n'était disponible quant aux mécanismes de sa synthèse et de sa dégradation, seulement quelques informations étaient connues concernant la mobilisation possible du glycogène en cas de carence de source carbonée.

## B. MOBILISATION DU GLYCOGENE

KONIG *et al.* (1985) ont montré que le taux de glycogène de *Methanobolus* diminue après 24 heures dans un milieu dépourvu de source de carbone et que durant le même temps, du CH<sub>4</sub> est produit en quantité correspondant à un carbone de glucose converti. Par contre, *Ms.thermophila* est dans les mêmes conditions capable d'utiliser toute sa réserve de glycogène sans production de CH<sub>4</sub> (MURRAY et ZINDER, 1987). Ces auteurs établissent que cette dégradation s'accompagne de la production d'ATP. Ces données indiquent que le glycogène peut être dégradé en cas de besoin, en générant de l'énergie disponible pour la maintenance et que les méthanogènes possèdent un mécanisme de glycolyse. EVANS *et al.* (1985), par l'étude en RMN du <sup>13</sup>C des molécules formées à partir de (<sup>13</sup>C) Glc en extrait acellulaire, ont

montré que le glucose pouvait être métabolisé par une telle voie chez *Mb. thermotrophicum*, contrairement à ce que pensent FUCHS *et al.* (1983) et SPOTT et JARREL (1981). En supposant l'existence d'une voie glycolytique, les réactions de la néoglucogenèse sont donc être réversibles. Une question qui reste néanmoins en suspens est de savoir si le glycogène peut être dégradé jusqu'au  $\text{CH}_4$ . Dans l'expérience d'EVANS *et al.*, à partir du ( $^{13}\text{C}$ )Glc, aucun marquage n'est retrouvé au niveau de l'acétyl-CoA, du pyruvate, de l'alanine et de l'aCG, ce qui excluerait la possibilité de formation de  $\text{CH}_4$  qui doit passer obligatoirement par l'intermédiaire acetyl-CoA.

## MATERIEL ET METHODES

## I. PREPARATION DES EXTRAITS A-CELLULAIRES

### A. CULTURE EN MASSE DE METHANOTHRIX SOEHNGENII

*Methanothrix soehngeni* souche FE, a été cultivée en fermenteur de 200 l (SETRIC) sur le milieu minéral BC (basal carbonate) de TOUZEL et ALBAGNAC (1983) en présence d'extrait de levure à 0,1 g/l et avec de l'acétate de sodium comme source de carbone, dont le pH était maintenu constant par addition d'acide acétique glacial au 1/2. Après 35 jours de culture, les cellules ont été récupérées au moyen d'une centrifugeuse en continu, réfrigérée, à 50 000 xg. Quand l'opération était effectuée en anaérobiose, le bol était balayé par un courant d'azote ; à la fin de la centrifugation, les orifices étaient bouchés par des bouchons butyl et le bol a été vidé en chambre anaérobie. Les cellules ont été placées en flacon de verre et stockées à -80°C.

### B. PREPARATION DES EXTRAITS

Les cellules décongelées ont été reprises par un tampon de composition variable, homogénéisées au polytron et lysées à la presse de FRENCH à 130 000 kPa. Ces opérations pouvaient également être réalisées en anaérobiose, dans ce cas, la cellule de la presse était remplie dans la chambre anaérobie et l'extrait cellulaire était récupéré dans un flacon bouché, serti, sous courant d'azote débarrassé des dernières traces d'oxygène par passage sur des copeaux de cuivre portés à 350°C. Toutes ces manipulations ont été effectuées à la température de 4°C : les parois et les cellules intactes ont été éliminées par centrifugation à 15 000 xg pendant 20 min.

## II. TECHNIQUES ENZYMATIQUES

### A. TECHNIQUES DE DOSAGE

#### 1. Enzymes de la néoglucogénèse

D'une manière générale, les réactions ont été suivies en cinétique au spectrophotomètre (KONTRON UV810) grâce à des réactions couplées ou par visualisation directe du produit. Les incubations ont été réalisées dans le spectrophotomètre thermostaté à 35°C. Dans le cas d'activités sensibles à l'O<sub>2</sub>, les cuves étaient préalablement balayées par un courant d'N<sub>2</sub> (passé sur cuivre) pendant 10 min. L'extrait enzymatique était injecté au travers du bouchon par une seringue HAMILTON étanche aux gaz. Les mesures des différentes activités enzymatiques ont été réalisées selon les protocoles suivants :

- Acétate kinase (OBERLIES *et al.*, 1980): l'ATP formé est mesuré par la réduction de NADP en présence de glucose, d'hexokinase (HK) et de glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH).

Tricine/K <sup>+</sup>	100 mM	pH 8,2	Glucose	10 mM
Acetyl-phosphate	2 mM		NADP	1 mM
ADP	2 mM		HK	2,8 U
MgCl <sub>2</sub>	5 mM		G6PDH	1,4 U
Glutathion (SH)	2 mM			

- Phosphotransacetylase (OBERLIES *et al.*, 1980) : La réaction est suivie directement à 233 nm par la formation d'acétyl-CoA.

Tris/Cl <sup>-</sup>	100 mM	pH 7,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mM	
Acetyl-phosphate	2 mM	
CoA	0,1 mM	

- Acetate thiokinase (OBERLIES *et al.*, 1980) : L'apparition d'AMP est mesurée par l'oxydation du NADH en présence d'adénylate kinase (AK), de pyruvate kinase (PK) de lactate deshydrogénase (LDH) et de phosphoenolpyruvate (PEP).

Tricine/K <sup>+</sup>	100 mM	pH 8,2	PEP	2 mM
Acetate de Na	1 mM		NADH	0,4 mM
CoA	0,2 mM		PK	0,8 U
ATP	1,5 mM		AK	0,7 U
Glutathion	2 mM		LDH	3 U
MgCl <sub>2</sub>	2 mM			

- Pyruvate deshydrogénase (ZEIKUS *et al.*, 1977) : la réduction du méthyl viologène est suivie à 578 nm ( $\epsilon = 9,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

tricine/K <sup>+</sup>	100 m M	pH 8,6
pyruvate de Na	10 mM	
CoA	0,1 mM	
Méthyl viologène	10 mM	

- Glycéraldéhyde-3-Phosphate deshydrogénase (ZEIKUS *et al.*, 1977) : la réaction est suivie par l'oxydation de NAD(P)H. L'acide 1,3-diphosphoglycérique très

instable est synthétisé directement dans l'essai par la phosphoglycérate kinase (PGK) à partir d'ATP et de 3 phosphoglycérate (3 PG).

Tricine K <sup>+</sup>	100 mM	pH 8,1	ATP	2 mM
Glutathion (SH)	2 mM		MgCl <sub>2</sub>	2 mM
3 PG	2 mM		NAD(P)H	0,5 mM
			PGK	1,5 U

- Enolase (JANSEN *et al.*, 1982) : La formation de PEP a été suivie par l'oxydation du NADH en présence d'ADP, de pyruvate kinase (PK) et de lactate deshydrogénase (LDH).

Tricine/K <sup>+</sup>	100 mM	pH 8,1	NADH	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM		ADP	0,5 mM
β-mercaptoéthanol	50 mM		PK	0,4 U
2-phosphoglycérate	2 mM		LDH	5,5 U

- Phosphoglycérate mutase (JANSEN *et al.*, 1982) : la formation de 2-phosphoglycérate (2 PG) est suivie par l'oxydation du NADH en présence d'ADP, d'énolase (E) de pyruvate kinase et de lactate deshydrogénase.

Tris cl <sup>-</sup>	100 mM	pH 7,8	ADP	0,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	4 mM		NADH	0,4 mM
2,3 diphosphoglycérate	0,5 mM		E	1,4 U
DTT	1 mM		PK	2,7 U

LDH 3,7 U

- Phosphoglycérate-kinase (JANSEN *et al.*, 1982) : La formation de 1,3-bisphosphoglycérate a été suivie par l'oxydation du NADH en présence de glycéraldéhyde-phosphate deshydrogénase (GAPDH).

Tris/Cl <sup>-</sup>	100 mM	pH 7,1	NADH	0,4 mM
MgSO <sub>4</sub>	5 mM		GAPDH	2,4 U
ATP	5 mM			
DTT	1 mM			

- Triose phosphate isomérase (FUCHS *et al.*, 1983) : La formation de dihydroxyacétone phosphate a été suivie par l'oxydation du NADH en présence de glycérolphosphate deshydrogénase (GPDH)

Tris/Cl <sup>-</sup>	100 mM	ph 8,0	NADH	0,4 U
DTT	1 mM		GPDH	3 U
MgCl <sub>2</sub>	10 mM			
D-L-glycéraldehyde 3-Phosphate	2 mM			

- Fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FUCHS *et al.*, 1983) : La formation du fructose 1,6-bisphosphate est suivie par la réduction du NADP, en présence de Fru 1,6-diphosphate phosphatase, de phosphoglucose isomérase (PGI) et de glucose 6-phosphate

deshydrogénase (G6PDH). Les trioses phosphates ont été obtenus à partir de la D-L-glycéraldéhyde 3-phosphate et de la triose phosphate isomérase.

Tris/Cl <sup>-</sup>	100 mM	pH 8,0	NADP	0,5 mM
DTT	2		F1,6 P Phosphatase	25 nkat
MgCl <sub>2</sub>	20		PGI	25 nkat
D-L-glycéraldéhyde 3-phosphate	10 mM		G6PDH	50 nKAT
TPI	0,3	µkat		

- Fructose biphosphatephosphatase (FUCHS *et al.*, 1983) : La formation du fructose 6-phosphate a été suivie par la réduction de NADP en présence de PGI et de G6PDH.

Tris Cl	100 mM	pH 8,0	NADP	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM		PGI	60 nkat
DTT	2 mM		GGPDH	60 nkat
F1,6-P	2 mM			

- Phosphoenolpyruvate synthétase (EYZAGUIRRE *et al.*, 1982) : La formation de PEP a été mesurée par l'oxydation du NADH en présence de KHCO<sub>3</sub>, de PEP carboxylase (PC) et de malate deshydrogénase (MDH).

tricine/K <sup>+</sup>	100 mM	pH 7,8	NADH	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM		KHCO <sub>3</sub>	40
ATP	5 mM		PC	16 nkat

Pyruvate de Na	1 mM	MDH	0,1 $\mu$ kat
DTT	2 mM		

## 2. Enzymes impliqués dans la synthèse du glycogène

- Phosphoglucomutase : La formation de glucose 6-phosphate a été mesurée par la réduction du NADP en présence de Glc 6-phosphate deshydrogenase.

Tris/cl <sup>-</sup>	50 mM pH 7,5	NADP	0,2 mM
Glc 1-P	4 mM	GG-PDH	8 n kat
Glc 1,6-diP	0,02 mM		
MgCl <sub>2</sub>	5 mM		
DTT	1 mM		

- ADP-Glc synthétase : L'activité est mesurée par une technique faisant appel à un substrat marqué [<sup>14</sup>C]Glc 1-phosphate. Dans un volume de 200  $\mu$ l :

Tris/Cl <sup>-</sup>	50 mM pH 8
ATP	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM
[ <sup>14</sup> C]Glc-1-Phosphate	0,5 mM 2ci/mole

La séparation des produits et des substrats a été réalisée en HPLC, par une méthode d'appariement d'ions que nous avons adaptée (PIMENOF *et al.*, 1986). La radioactivité est mesurée directement en sortie de colonne par un scintillateur

en continu (RADIOMATIC) après mélange de l'éluat et du liquide scintillant. Les conditions chromatographiques étaient : 2 colonnes en série (Micro bondapack : C18) ; l'éluat est réalisé à 1,2 ml/min par :  $\text{CH}_3\text{CN}$  20 % ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM et tétrabutylaminophosphate d'ammonium (PIC A, WATERS) : 0,01 M.

- Glycogène synthase : L'incorporation de [ $^{14}\text{C}$ ] glucose dans le glycogène a été mesurée dans la fraction insoluble dans l'éthanol à 70 % (ORON et LARNER, 1979). Dans un volume de 100  $\mu\text{l}$ .

Tris/ $\text{Cl}^-$	50 mM	pH 7,4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100 mM	
Glutathion (SH)	10 mM	
$\text{MgCl}_2$	5 mM	
SAB	50 $\mu\text{g}$	
Glycogène	0,25 mg	
$\text{ADP}[^{14}]\text{Glc}$	80 $\mu\text{m}$	2,25 ci/mole.

L'essai a été incubé à 30°C. La réaction est arrêtée par 2 ml d'éthanol à 70 % et à -20°C, après 10 min, la solution était déposée sur un filtre Wathman GF/F en fibre de verre, lequel était rincé par 2 x 10 ml d'éthanol 70 % sur porte filtre Millipore puis par 3 x 1 ml sur verre fritté. Le filtre était séché 20 min, placé dans un pillulier de comptage avec 5 ml de liquide scintillant (Insta-gel).

#### B. PURIFICATION DE LA GLYCOGENE SYNTHASE

Toutes les étapes et manipulations des fractions enzymatiques ont été réalisées à une température ne dépassant jamais 5°C.

### 1. Chromatographie d'échange d'ions

Le support était une DEAE-cellulose (DE 52 WHATMAN) équilibrée dans le Tris-Cl 30 mM pH 8,0 avec du DTT 1 mM. Une colonne de 250 ml permettait de travailler avec 1 g de protéines estimé selon le dosage de BRADFORD. Le rinçage était effectué avec le tampon d'équilibrage jusqu'à obtenir une quantité de protéines dans l'éluat inférieure à 0,1 mg/ml. La chromatographie était ensuite développée par un gradient de 0 à 0,3 M en NaCl.

### 2. Chromatographie d'interactions hydrophobes

L'extrait à chromatographier était amené à 1 M en sulfate d'ammonium. Après une heure, les protéines précipitées étaient éliminées par centrifugation à 2000 g pendant 20 min. Le supernageant était ensuite appliqué sur une colonne de phényl-Sépharose CL4B (50 ml de gel par g de protéine) équilibrée dans le Tris-Cl<sup>-</sup> 50 mM pH 7,4, DTT 1 mM et sulfate d'ammonium 1 M (Tampon I). Après rinçage avec le tampon I, la chromatographie était développée par le Tris/Cl<sup>-</sup> 50 mM pH 7,4, DTT 1 mM et sulfate d'ammonium 0,1 M (tampon II).

### 3. Chromatographie d'affinité

Les fractions provenant de la chromatographie sur phényl-Sépharose ont été déposées sur une colonne de concanavalin A-Sépharose, de capacité théorique de 10 fois la quantité de sucres existant dans la fraction. La colonne était équilibrée dans le tampon II. Après rinçage exhaustif (dosage au Bradford = 0), la chromatographie était développée par l' $\alpha$ -méthyl-glucoside 0,5 M dans le tampon II.

## C. TECHNIQUES D'ANALYSES

### 1. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées selon la méthode de BRADFORD (1976) avec la sérum albumine bovine fraction V comme étalon.

### 2. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux ont été dosés par la méthode au phénol-sulfurique de DUBOIS *et al.* (1956).

### 3. Electrophorèse en conditions non dénaturante

Elles ont été réalisées en gel de polyacrylamide à différentes concentrations d'acrylamide de 7 %, 10 % et 12 %, selon le protocole de LAEMMLY (1970).

### 4. Electrophorèse en conditions dénaturante

Elles ont été réalisées en gel de polyacrylamide en présence de SDS 0,1 % soit à une concentration d'acrylamide de 10 % ou par un gradient 5-25 %. Les échantillons étaient dénaturés à 100°C pendant 2 min dans le tampon de lyse (Tris-Cl 3 M pH 8,9 ; 5 % SDS, 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, 20 % glycérol).

### 5. Détermination de la masse moléculaire de la glycogène synthase

La MM de la protéine native a été estimée par filtration sur gel sur une colonne 3 x 100 cm de Sephacryl S200 dans le tampon II. Une fraction "phényl-

Sépharose" a été concentrée 10 fois par ultrafiltration (AMICON) et incubée à 25°C, pendant 1 heure avec de l' $\alpha$ -amylase pancréatique avant d'être injectée sur la colonne.

#### 6. Dosage de l'ATP

La concentration d'ATP a été estimée après traitement de l'extrait acellulaire à l'éthanol en chromatographie liquide haute performance par une technique d'appariement d'ions (PIMENOV *et al.*, 1986).

## RESULTATS

## CHAPITRE I

### ETUDE DE LA NEOGLUCOGENESE CHEZ *METHANOTHRIX SOEHNGENII*

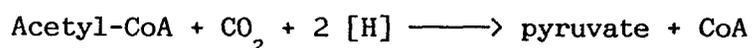
#### I. SYNTHESE DU PEP

##### A. ACTIVATION DE L'ACETATE

Les extraits acellulaires catalysaient la formation d'acétyl coenzyme A à partir d'acétate d'ATP et de coenzyme A, chaque constituant étant nécessaire à la réaction. Aucune activité acétate kinase ni phosphotransacétylase n'a été détectée. Dans le dosage de l'acétate thiokinase, c'est la libération d'AMP qui est mesurée via l'adénylate kinase et le système de couplage. Le  $P_{1,5}$  di (adénosine-5') pentaphosphate, qui est un inhibiteur spécifique de l'adénylate kinase, permet de mettre en évidence que le résidu adénylique formé est bien l'AMP (Figure 25, p. 63). L'activité spécifique de l'acétate thiokinase ainsi démontrée était de 50 nkat (3 U) par mg de protéine. *Mtx.soehngeni* souche opfikon, utilise le même système que la souche FE (KOHLER et ZEHNDER, 1984), et avec une activité spécifique tout à fait comparable de 83 nkat/mg. Cet enzyme est probablement spécifique du genre *Methanothrix* alors que les acétate kinase et phosphotransacétylase seraient spécifiques du genre *Methanosarcina*.

##### B. FORMATION DU PYRUVATE

La réaction était catalysée par la pyruvate synthase :



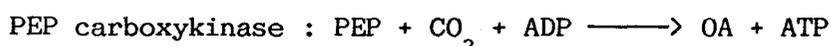
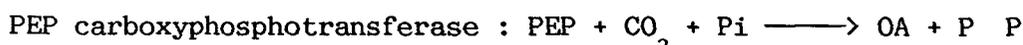
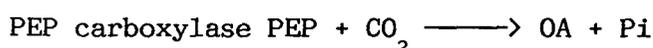
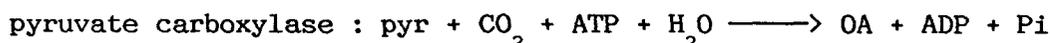
Cette activité a été dosée dans le sens de la formation d'acétyl-CoA avec un accepteur d'électrons artificiel : le méthyl-viologène (MV) dont le potentiel redox est  $E'^{\circ} = -446$  mvolt. Le dosage était obligatoirement réalisé dans des conditions d'anaérobiose car d'une part, le MV réduit était immédiatement réoxydé par l'oxygène, d'autre part la préparation enzymatique est rapidement inactivée en présence d'air. L'activité spécifique mesurée dans ces conditions était de 3,50 nkat (0,21 u) par mg de protéine. Les coenzymes NAD, NADP et FAD n'étaient pas réduits. Le F<sup>4</sup>20 isolé de *Mb.thermoautotrophicum* selon la méthode de SCHONHEIT *et al.* (1981) pouvait servir d'accepteur d'électrons mais son efficacité était moindre : 2,5 nkat (0,15 u) par mg. Etant donnée la faible concentration intracellulaire de F<sup>4</sup>20 de *Mtx.soehngeni* (GORRIS et VAN DER DRIFT, 1986), il n'est pas acquis contrairement à *Mb.thermoautotrophicum* (ZEIKUS *et al.*, 1977) que cet accepteur soit celui impliqué *in vivo*.

### C. FORMATION DU PHOSPHOENOLPYRUVATE

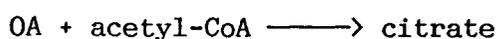
La PEP synthétase : pyruvate + ATP  $\longrightarrow$  phosphoenolpyruvate + AMP + Pi a été mise en évidence dans les extraits acellulaires avec une activité spécifique de 0,33 nkat (0,020 U) par mg de protéine. La réaction irréversible de la pyruvate kinase est rendue possible par l'utilisation de deux liaisons riches en énergie, la libération d'AMP a été par ailleurs mise en évidence par couplage avec le système adénylate kinase-pyruvate kinase et lactate deshydrogénase. Des organismes photosynthétiques utilisent une réaction légèrement différente catalysée par la pyruvate-phosphate dikinase : pyruvate + ATP + Pi  $\longrightarrow$  Phosphoenolpyruvate + AMP + P<sub>x</sub> P, cette activité n'a pas été retrouvée chez *Mtx soehngeni*.

#### D. CONCLUSION

La synthèse de PEP à partir d'acétate fait intervenir les activités acétate thiokinase, pyruvate synthase et PEP synthétase. L'ATK possédait une activité spécifique très élevée, plaçant ainsi l'acétyl CoA comme intermédiaire vraisemblable à la fois des voies anaboliques et cataboliques. La pyruvate synthase est impliquée dans l'assimilation d'un CO<sub>2</sub>. Le pyruvate est également un métabolite essentiel : c'est le précurseur de l'alanine, nous avons mis en évidence l'activité glutamate pyruvate transaminase avec une activité spécifique de 0,28 nkat (0,017 u) par mg de protéine. La PEP synthétase a également été mise en évidence chez *Mb.thermoautotrophicum* (EYZAGUIRRE, 1982). Le PEP, outre son rôle dans la néoglucogenèse est le précurseur de l'oxaloacétate (OA) par une PEP-carboxylase chez *Mb.thermoautotrophicum* (KENEALY et ZEIKUS, 1982) et par une activité non encore détectée chez *Ms.barkeri* (WEIMER et ZEIKUS, 1979). Nous avons essayé sans succès différents systèmes pour la synthèse d'OA :



Chez *Ms.barkeri*, l'OA permet grâce à la citrate synthase l'accès au cycle réductif et incomplet des TCA qui mène à l' $\alpha$ -cétoglutarate et donc au glutamate :



Nous avons pu mettre en évidence chez *Mtx soehngeni* l'activité glutamate oxalate transaminase avec une activité spécifique de 0,41 nkat (0,025 u) par mg de

protéine.

Ces premières étapes de l'assimilation de l'acétate que nous avons mis en évidence dépassent largement le cadre de la néoglucogenèse (Figure 26, p. 63). Une étude plus approfondie des enzymes et des régulations éventuelles apporterait beaucoup dans la compréhension du métabolisme de *Mtx soehngeni*.

## II. FORMATION DES TRIOSES PHOSPHATES

Nous avons mis en évidence les activités : émolase : 0,75 nkat (0,045 u) par mg de protéine, phosphoglycérate mutase : 0,15 nkat (0,009 u) par mg de protéine, 3 phosphoglycerate kinase : 0,27 nkat (0,016 u) par mg de protéine, glycéraldehyde phosphate deshydrogenase : 1 nkat (0,06 u) par mg de protéine et la triose phosphate isomérase : 2,5 nkat (0,15 u) par mg de protéine.

L'activité phosphoglycérate mutase est strictement dépendante du 2-3-diphosphoglycérate ; sans son ajout au milieu réactionnel, l'activité est détectée mais avec une activité spécifique plus faible. En éliminant la fraction micromoléculaire (colonne PD 10 PHARMACIA), aucune activité n'est détectable. La glycéraldehyde phosphate dehydrogénase est 4 fois plus active avec le NADP qu'avec le NAD. L'enzyme est probablement spécifique du NADP.

Ces activités sont somme toute assez classiques et leur présence a été reportée chez *Mb. thermoautotrophicum* (JANSEN *et al.*, 1982).

## III. FORMATION DES HEXOSES PHOSPHATES

Nous avons pu mettre en évidence une activité aldolase, l'activité

spécifique est faible 0,03 nkat (1,8 mu) par mg de protéine. En aucun cas, la scission du fructose 1,6-diphosphate n'a pu être mise en évidence. L'activité requiert la présence de groupements -SH et présente une assez grande instabilité sans qu'une relation avec une possible sensibilité à l'oxygène puisse être démontrée comme pour *Mb-thermoautotrophicum* (FUCHS *et al.*, 1983).

La fructose 1,6-diphosphatase a également été détectée avec une activité spécifique de 0,15 nkat (0,09 u) par mg de protéine. Elle est totalement inhibée par l'EDTA et nécessite la présence d'ions  $Mg^{2+}$  et de groupements SH.  $Mn^{2+}$  peut se substituer à  $Mg^{2+}$  avec une efficacité de 35 %. L'activité est insensible à l'oxygène. Cette activité est considérée comme une étape clef de la néoglucogenèse. Nos tentatives pour aborder une étude plus approfondie se sont heurtées à un problème de dégradation protéolytique, mis en évidence par un décalage du spectre de pH vers les pH basiques, le pH optimal étant de 9,5 (Figure 27, p. 66). Un phénomène identique a été décrit par MIZUNUMA et TASHIMA (1986) et NIMMO et TIPTON (1975). L'emploi d'inhibiteurs de protéases : PMSF, Leupeptine, pendant la lyse des cellules a été inefficace pour résoudre ce problème.

La formation de glucose 6-phosphate est réalisée par une Glc6-Pisomérase : 0,17 nkat (0,01 u) par mg de protéine.

#### IV. CONCLUSION

Nous avons mis en évidence par le dosage des activités enzymatiques (Figure 28, p. 67 ; Tableau III, p. 67) la voie de la synthèse du Glc 6-Phosphate chez *Mtx.soehngeni* à partir d'acétate et de  $CO_2$ . La voie de biosynthèse à partir du PEP correspond à la voie inverse de la glycolyse d'EMBDEN MEYERHOFF, c'est-à-dire *via* la condensation aldolique des trioses phosphates. Le bilan net de la

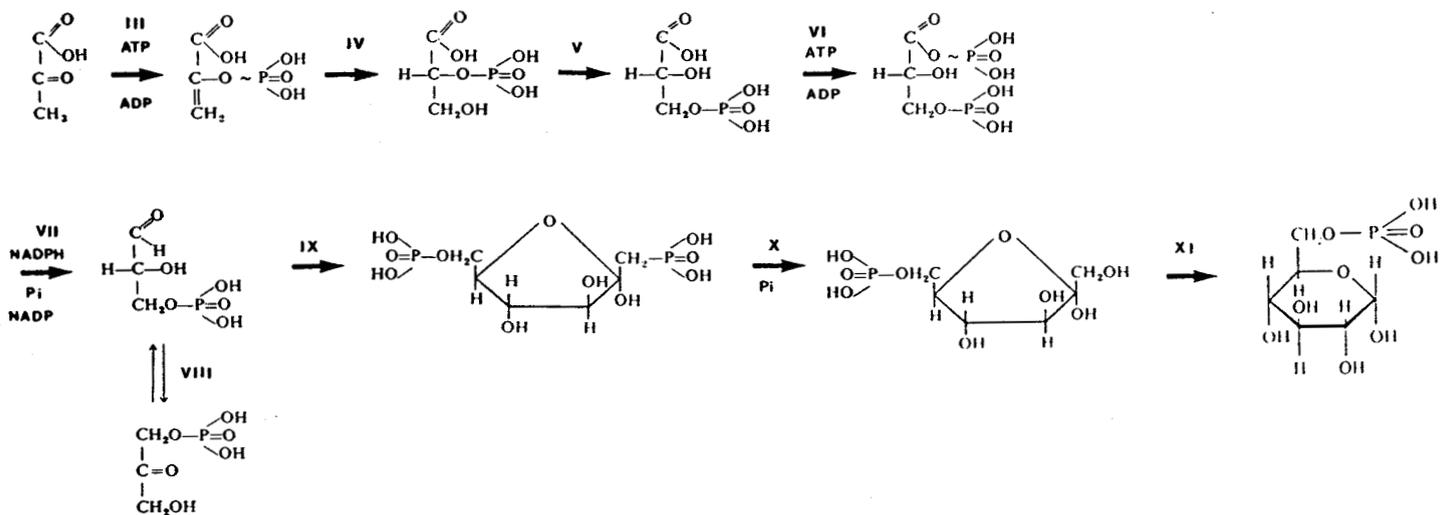
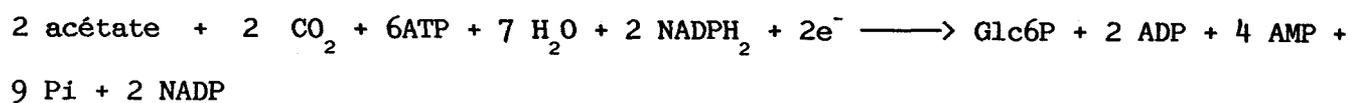


Figure 28 : Néoglucogénèse chez *Methanotherix soehngeni* FE.

Enzyme	Activité nkat / spécifique mg protéine
i Acetate thiokinase	50
ii Pyruvate synthase	3.50
iii Phosphoenolpyruvate synthetase	0.33
iv Enolase	0.75
v Phosphoglycerate mutase	0.15
vi Phosphoglycerate kinase	0.27
vii Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.03
viii Triosephosphate isomerase	2.50
ix Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	0.03
x Fructose-1,6-bisphosphate phosphatase	0.15
xi Phosphoglucose isomerase	0.17

Tableau III : Activité des enzymes catalysant la synthèse de glucose 6-phosphate à partir d'acétate chez *Methanotherix soehngeni* FE.

néoglucogenèse est :



Cette voie est identique à celle décrite par *Mb. thermoautotrophicum* et nos résultats sont compatibles et complémentaires de ceux obtenus par analyse en RMN d'EKIEL *et al.* pour *Mtx. concilii*.

## CHAPITRE II

### BIOSYNTHESE DU GLYCOGENE CHEZ *METHANOTHRIX-SOEHNGENII*

Un polysaccharide a été isolé dans la fraction soluble des extraits acellulaires de *Methanothrix soehngeni* souche FE. Le glucose a été le seul produit détecté par CPG après hydrolyse à l'acide trifluoroacétique. De plus, les résultats des hydrolyses enzymatiques à l'amylase et à l'amyloglucosidase ont permis de mettre en évidence des liaisons de type  $\alpha$  1-4 et  $\alpha$  1-6. La longueur moyenne des chaînes était de 13 résidus de glucose. Enfin, le spectre infra-rouge était identique à celui du glycogène commercial de foie de lapin (MERCK). Le polysaccharide a donc été identifié à du glycogène, substance de réserve commune chez les bactéries. Au cours de la culture du microorganisme en fermenteur de 200 l, le taux de glycogène des cellules est demeuré constant et représentait environ 2 % du poids sec cellulaire.

La biosynthèse du glycogène est différente chez les mammifères et les bactéries. Le précurseur des résidus glucosyls est soit l'UDP-Glc soit l'ADP-Glc. Par ailleurs, le site de régulation de la synthèse est différent. Chez les mammifères, il intervient au niveau de la glycogène synthase et procède par une combinaison de mécanismes de contrôle de l'activité impliquant la phosphorylation-déphosphorylation de plusieurs sites à sérine, dans lesquels viennent se greffer des phénomènes allostériques tels que l'activation par le Glc 6-phosphate. Ces mécanismes de régulation sont d'autre part sous contrôle hormonal très fin. L'enzyme est ainsi régulée très strictement. Chez les Eubactéries, la synthèse de glycogène est régulée au niveau de la formation du précurseur nucléotidique qui est l'ADP-Glc. Selon la spécificité de l'intermédiaire métabolique activateur, les ADP-Glc synthetases sont classées en plusieurs groupes (tableau IV, p. 70), elles

phototrophes	non phototrophes	activateur
<i>Rhodospirillum</i> sp.	—	Pyruvate
<i>Rhodocyclus purpureus</i>	—	
<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	<i>Arthrobacter viscosus</i>	Fructose-6-phosphate
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Pyruvate
<i>Chromatium vinosum</i>		
<i>Chlorobium limicola</i>		
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>		Fructose-6-phosphate
<i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i>		Fructose-1,6-bisphosphate
<i>Rhodopseudomonas globiformis</i>		Pyruvate
<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	Fructose-6-phosphate
	<i>Micrococcus luteus</i>	Fructose-1,6-bisphosphate
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	
	Enterics	Fructose-1,6-bisphosphate Pyridoxal-phosphate NADPH
	<i>Serratia</i> sp.	
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	None
	<i>Enterobacter hafniae</i>	
Cyanobacteria		
Green algae		3-Phosphoglycerate

Tableau IV : Regroupements des ADP-Glucose synthétases selon la spécificité de l'activateur.

(PREISS et WALSH, 1981)

sont généralement inhibées par l'ADP, l'AMP et le phosphate inorganique. La glycogène synthase quant à elle ne présente aucun phénomène de régulation (PREISS et WALSH, 1981).

## I. RECHERCHE DES ENZYMES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DU GLYCOGENE

### A. PHOSPHOGLUCOMUTASE

Cet enzyme catalyse la réaction  $\text{Glc 1-P} \longleftrightarrow \text{Glc 6-P}$ . L'activité spécifique est de 0,18 nkat par mg de protéine, en présence de 0,02 mM de glucose 1,6 diphosphate. Comme dans le cas de la phosphoglycérate mutase vis-à-vis du 2,3 diphosphoglycérate, l'activité est strictement et classiquement dépendante du glucose 1,6 diphosphate.

### B. ADP-Glc SYNTHETASE

Cet enzyme catalyse la réaction :  $\text{ATP} + \text{Glc 1-P} \longrightarrow \text{ADP-Glc} + \text{P P}$ . Quelles que soient les conditions du dosage, nous n'avons pu la mettre en évidence. Le bon fonctionnement du système de dosage a été vérifié par la mesure de l'activité ADP-Glc pyrophosphatase :  $\text{ADP-Glc} \longrightarrow \text{AMP} + \text{Glc 1-P}$  soit 60 p.moles par minute et par mg de protéine. L'activité est probablement perdue au cours de la préparation de l'extrait, la protéine enzymatique serait instable dans nos conditions opératoires.

### C. GLYCOGENE SYNTHASE

Une activité glucosyl transférase a été mesurée à la fois avec l'UDP-Glc (0,7 mM) et l'ADP-Glc (0,7 mM) comme donneurs de résidus glucosyls. Les vitesses

d'incorporation étaient comparables, respectivement de 10,8 et 33 pkat par mg. Des premières expériences ont montré que l'affinité avec laquelle ils étaient utilisés était très différente : 625  $\mu\text{M}$  pour l'UDP-Glc et 8 $\mu\text{M}$  pour l'ADP-Glc. Par ailleurs, des expériences de compétition entre les précurseurs ont montré que l'addition d'un excès de 10 fois en ADP-Glc à un milieu réactionnel contenant 0,35 mM d'UDP [ $^{14}\text{C}$ ]Glc résultait en l'inhibition totale de l'incorporation de radioactivité dans la fraction précipitable à l'alcool. Par contre, un excès d'UDP-Glc de 100 fois était nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition à partir de 0,35 mM d'ADP [ $^{14}\text{C}$ ]Glc. Ces premiers résultats indiquaient l'existence d'activités glucosyl transférasiques dans les extraits, capables d'utiliser l'ADP-Glc et l'UDP-Glc et suggéraient la présence d'une seule glycogène-synthase capable d'utiliser les deux précurseurs nucléotidiques, mais avec des affinités différentes. De plus, l'affinité très supérieure pour l'ADP-Glc le désignait comme précurseur potentiel de la glycogène synthase *in vivo*, l'importance physiologique de l'activité UDP-glucosyl transférasique n'étant que peu compatible avec des concentrations cytoplasmiques en UDP-Glc.

## II. PURIFICATION DE LA GLYCOGENE SYNTHASE

### A. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

Nous avons réalisé une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose (DE-52). L'activité enzymatique a été éluée avec une force ionique correspondant à 0,15 M de NaCl, accompagnée d'une fraction protéique présentant une couleur jaune soutenue (Figure 29, p. 73<sup>bis</sup>). En immunoblotting contre des anti-séras anti sous unités du composant C de *Ms.mazei* MC<sub>3</sub> (THOMAS, 1986), la fraction présentait les trois bandes caractéristiques du composant C de la méthylréductase, cette protéine

représente environ 10 % des protéines totales de l'extrait cellulaire de *Mtx. soehngeni*. La purification moyenne au cours de cette étape était de 2 à 4 fois pour un rendement d'environ 50 %. Les tentatives de purification suivant cette étape (chromatographie d'affinité sur Con.A-sepharose, voir Matériel et Méthodes, p. 56) n'ont pas permis d'obtenir une fraction glycogène-synthase non contaminée par cette protéine. Cette protéine était connue pour être retenue dans certaines conditions sur une colonne de phényl-Sépharose (ROUVIERE et WOLFE, 1987). Nous avons donc tenté d'utiliser cette propriété pour l'éliminer en tant que contaminant de la glycogène synthase.

#### B. CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTIONS HYDROPHOBES

En présence de 1 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , la majeure partie des protéines, dont le composant C, est retenue sur la colonne de phenyl-Sepharose. La fraction non retenue comportait le glycogène et l'activité était retrouvée uniquement dans cette fraction. En effet, le glycogène et les glycogène-synthases possèdent des interactions assez fortes chez les bactéries. La purification était de 5 à 7 fois pour un rendement de 65 à 70 %. L'intérêt de cette étape, outre ses bonnes performances, résidait dans l'élimination du composant C et dans l'obtention de l'enzyme sous forme liée au glycogène, ce qui permettait d'envisager une technique d'affinité pour la suite de la purification. Nous avons par ailleurs pu montrer que l'enzyme était beaucoup plus stable sous cette forme.

#### C. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

A l'issue de la chromatographie d'interactions hydrophobes, la fraction active a été dialysée jusqu'à obtenir une concentration de 0,1 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  environ, avant d'être appliquée sur une colonne de concanavoline A-Sepharose.

L'enzyme lié au glycogène était retenu dans ces conditions et pouvait être libéré par l' $\alpha$ -Me-Glc 0,5 M. La préparation était purifiée d'un facteur 170 pour un rendement avoisinant les 100 %. L'enzyme-glycogène est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  en présence de 1 mg/ml de sérum albumine. Le glycérol était un mauvais conservateur, les pertes étant de 60 à 70 % en quelques jours en sa présence. Le protocole et les résultats de la purification sont donnés dans le tableau V, p. 73 <sup>bis</sup>.

### III. PROPRIETES DE LA GLYCOGENE SYNTHASE

#### A. PROPRIETES PHYSICOCHEMIIQUES

Différentes tentatives d'électrophorèse en milieu non dénaturant dans des gels à 12 ; 10 et 7 % en acrylamide se sont soldées par des échecs. Après coloration, les gels présentaient un halot diffus plus ou moins loin du dépôt. La présence du glycogène associé peut expliquer ce phénomène. En SDS PAGE, une seule bande a été mise en évidence après coloration au bleu de coomassie ou au nitrate d'argent, l'enzyme était donc purifié jusqu'à homogénéité. La masse moléculaire était de 32 000 daltons (Figure 30, p. 75). Pour obtenir la masse moléculaire de la protéine native, nous avons dû séparer le complexe enzyme glycogène par hydrolyse avec de l' $\alpha$ -amylase avant d'effectuer une filtration sur gel sephacryl S 200. La MM ainsi obtenue était de 130 000 daltons (Figure 31, p. 75) suggérant une protéine composée de 4 sous-unités identiques.

#### B. PROPRIETES CATALYTIQUES

L'enzyme purifié possédait une activité spécifique de 0,99 U/mg avec l'ADP-Glc. L'enzyme possédait une large plage d'optimum de pH, son activité spécifique

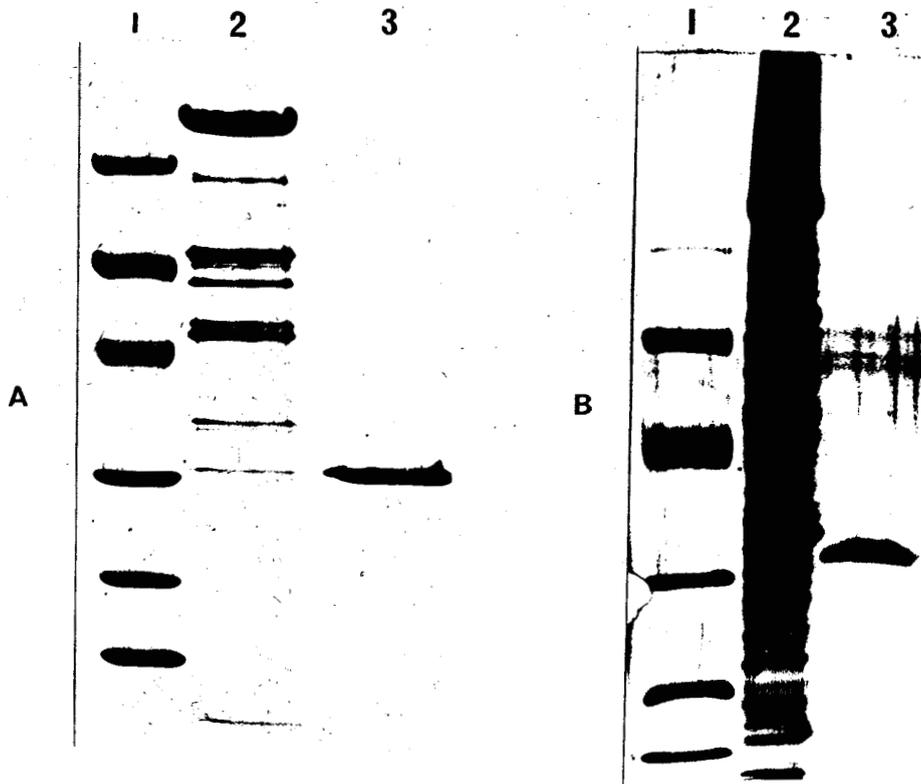


Figure 30. : Analyse des fractions purifiées en SDS-PAGE.

A : révélation au bleu de coomassie

B : révélation au nitrate d'argent

ligne 1 : témoins de masse moléculaire : 94 000 ; 67 000 ; 43 000 ;  
30 000 ; 20 100 et 14 400.

2 : fraction obtenue après la phényl-Sépharose

3 : fraction obtenue après la concanavaline A-Sépharose.

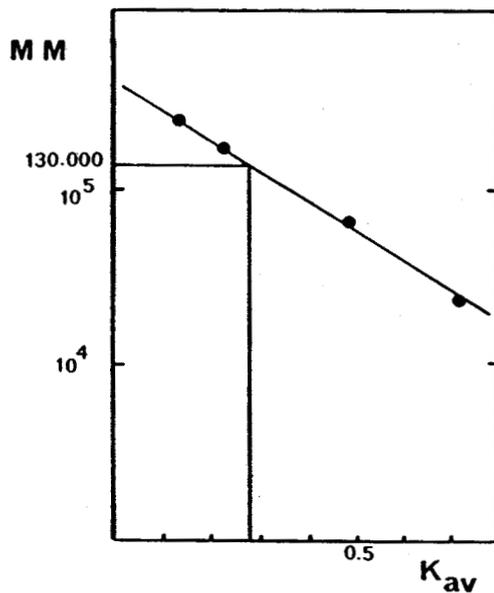


Figure 31 : Mesure de la masse moléculaire de l'enzyme par filtration sur gel,

étalons de masse moléculaire : 232000 ; 158 000 ; 67 000 et 43 000.

variant de 20 % entre pH 6,6 et 8,8. A pH 7,4, son activité était de 0,99  $\mu$ mole par minute et par mg de protéine. La température optimale était de 25-30°C pour 5 min d'incubation (Figure 32, p. 77). Pour les valeurs de température supérieures, l'enzyme était rapidement inactivé. A 30°C, la demi-vie de la préparation de glycogène-synthase était de 1 min 20 sec (Figure 33, p. 77). A 25°C dans notre milieu réactionnel, l'enzyme était stable pendant 30 min., au bout d'une heure, la perte représentait environ 10 %. D'autre part le milieu réactionnel avait un rôle protecteur vis-à-vis de l'enzyme essentiellement dû à la présence du glutathion, du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et de la SAB, l'omission d'un de ces composés conduisait à la perte d'activité de 20 à 25 %, à 25°C après 30 min. d'incubation. Les constantes de vitesse maximale  $V_{\text{max}}$  et d'affinité  $K_M$  ont été déterminées avec une concentration saturante en glycogène. Pour l'ADP-Glc, la  $V_{\text{max}}$  calculée par la représentation de LINEWEAVER et BURK était de 18,3 nkat (1,1 u) par mg de protéine et le  $K_M$  était de 9  $\mu$ M. La préparation présentait également une activité UDP-Glc glucosyl transférase avec une  $V_{\text{max}}$  de 7,7 nkat (0,46 u) par mg de protéine et une constante d'affinité de 2,5 mM. Ces résultats confirment et complètent ceux obtenus en système non purifié. Une seule glucosyl transférase est impliquée dans les extraits acellulaires et l'ADP-Glc est selon toute vraisemblance le précurseur *in vivo* de la synthèse de glycogène. Cette propriété l'apparente aux glycogène synthases d'origine eubactérienne dont aucune ne possède de régulation. Nous avons voulu vérifier si tel était bien le cas pour *Mtx.soehngenii*.

### C. PROPRIETES DE REGULATION

Nous avons testé des intermédiaires glycolytiques et différents nucléotides susceptibles de modifier l'activité, tous à la concentration de 1 mM. Les intermédiaires, l'UTP, le GTP, l'AMP et le phosphate inorganique n'avaient aucun effet sur l'activité enzymatique. Au contraire, l'ATP et l'ADP dans une

Effecteur testé	Activité %
None	100
Glucose 6-phosphate	106
Glucose 1-phosphate	103
Fructose 6-phosphate	101
Fructose 1-6-diphosphate	100
3-phosphoglycerate	109
Phospho-enol-pyruvate	103
Pyruvate	109
Inorganic phosphate	98
AMP	98
ADP	62
ATP	2
UTP	100
GTP	100

Tableau VI : Effet des intermédiaires glycolytiques de nucléotides et de phosphate inorganique sur l'activité glycogène-synthase.

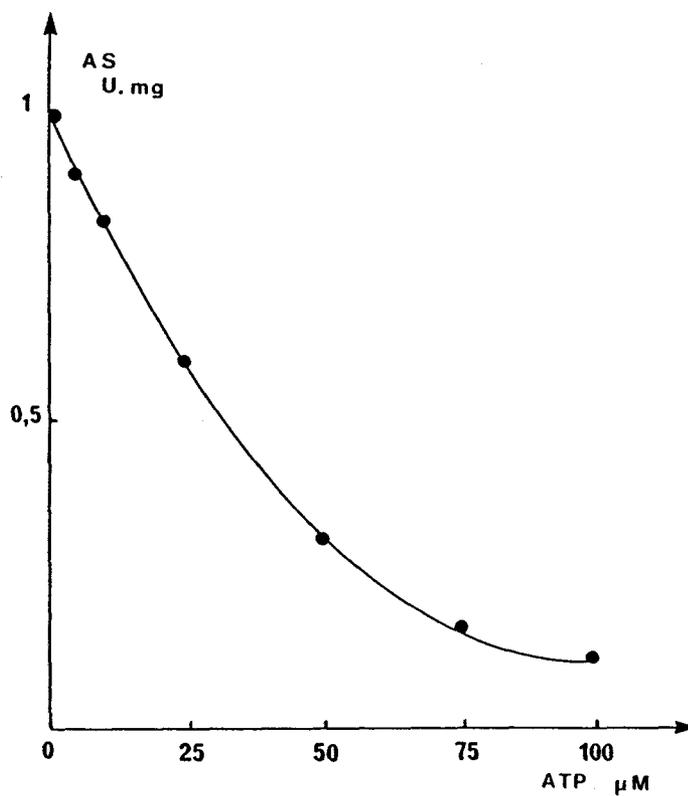


Figure 34 : Activité glycogène-synthase en fonction de différentes concentrations d'ATP. [ADP-Glc] = 80 μM.

moindre mesure, inhibaient fortement l'activité (tableau VI, p. 78). L'inhibition par l'ATP 1 mM était presque totale ; des concentrations beaucoup plus faibles se sont révélées encore très actives (Figure 34, p. 78). D'autre part, il n'était pas possible de lever l'inhibition produite par 250  $\mu$ M d'ATP avec le Glucose 6-phosphate ou le pyruvate à 10 mM. Le mécanisme et les constantes d'inhibition vis-à-vis de l'ATP et de l'ADP ont été étudiées. Pour l'ADP, le mécanisme était de type compétitif, ce qui relève d'une inhibition classique par un produit de la réaction. La constante d'inhibition était de 150  $\mu$ M. Pour l'ATP, nous avons également démontré un mécanisme de type compétitif (Figure 35, p. 80) avec un  $K_i$  de 5  $\mu$ M. La stimulation par le  $Mg^{2+}$  pourrait être due à la formation d'un complexe Mg-ADP qui n'est plus sous cette forme un inhibiteur effectif de la glycogène synthase selon PREISS et GREENBERG (1965).

#### IV. CONCLUSIONS

Cette purification est la première décrite pour une glycogène-synthase d'origine archaebactérienne. Au cours des deux étapes chromatographiques, l'enzyme n'est jamais séparé du glycogène, ce qui augmente notablement sa stabilité. La chromatographie d'affinité permet d'obtenir un facteur de purification élevé, le ligand 4-aminobutyl utilisé pour la glycogène-synthase d'*E.Coli* (CATTANEO *et al.*, 1979 ; FOX *et al.*, 1976) n'est pas efficace dans notre cas. La concanavaleine A est capable de fixer le glycogène auquel l'enzyme reste fixé (SOLLING H. et WANG, 1973) et son utilisation s'est révélée très intéressante. La procédure entière donne une purification de plus de 800 fois pour un rendement de 67 %. La sous unité de la glycogène synthase de *Mtx.soehngeni* a une masse moléculaire de 32 000 daltons valeur à comparer avec les mammifères et les levures : 77 à 100 000 daltons (CAMICI *et al.*, 1984 ; HUANG et CABIB, 1974 ; Mc VERRY et KIM, 1974 ; SMITH *et al.*, 1971) et  $49 \pm 2000$  daltons pour *E.Coli* B (FOX *et al.*, 1976). Comme

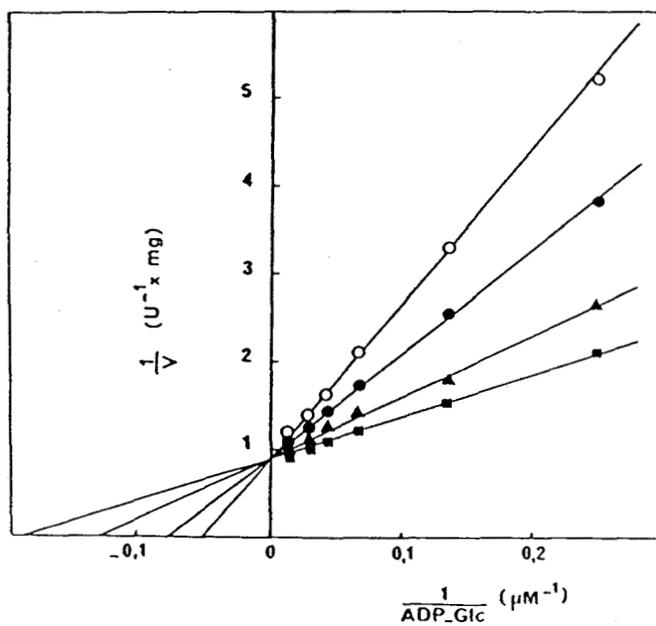


Figure 35 : Mécanisme de l'inhibition par l'ATP.

Courbes en double inverse donnant  $1/v$  en fonction de  $1/[\text{ADP-Glc}]$ , pour différentes concentrations d' $[\text{ATP}]$ .

■ :  $0 \mu\text{M}$  ; ▲ :  $1 \mu\text{M}$  ; ● :  $5 \mu\text{M}$  ; ○ :  $10 \mu\text{M}$

pour les Eubactéries, elle utilise l'ADP-Glc préférentiellement à l'UDP-Glc (CATTANEO *et al.*, 1979 ; PREISS et GREENBERG, 1965). De même, les intermédiaires glycolytiques n'ont pas d'effet activateur. L'ADP n'a pas de rôle régulateur *in vivo*, par contre nous avons pu montrer que l'ATP était un inhibiteur compétitif puissant, ce qui semble surprenant à priori puisque l'ATP est un substrat de la synthèse de glycogène au niveau de l'ADP-Glc synthétase. Au cours de la croissance dans le fermenteur (croissance linéaire), l'ATP est présent dans les cellules à faible concentration (15  $\mu$ m), mais cependant suffisante pour inhiber au moins en partie la glycogène synthase. De fait, le taux de glycogène des cellules est stable pendant la croissance. En considérant que l'acétate est un substrat faiblement énergétique pour les méthanogènes, *Mtx. soehngenii* doit pouvoir utiliser préférentiellement l'ATP pour les synthèses (paroi, enzymes) plutôt que pour le stockage de carbone. Cependant, la signification physiologique réelle d'une telle régulation et les conditions menant à la synthèse ou à l'utilisation du glycogène restent à déterminer en considérant par ailleurs les propriétés inconnues des autres activités impliquées dans son métabolisme c'est-à-dire la biosynthèse du précurseur nucléotidique et la dégradation du glycogène.

## CONCLUSION GENERALE

Alors que la néoglucogénèse était bien déterminée chez les méthanogènes hydrogénophiles, seuls des résultats fragmentaires étaient disponibles dans la littérature sur la néoglucogénèse à partir d'acétate. Les travaux que nous avons réalisés ont permis de montrer que l'activation de l'acétate en acétyl-coenzyme A est dépendante de l'acétate thiokinase, ce système étant différent des autres *Methanosarcinaceae*. L'acétyl-coenzyme A serait également un intermédiaire de la méthanogénèse (GRAHAME et STADTMAN, 1987), l'activité spécifique très élevée de cet enzyme dans nos extraits est en faveur de cette hypothèse. Nous avons ensuite identifié les enzymes responsables de la synthèse de phosphoenolpyruvate à partir de l'acétyl-coenzyme A : la pyruvate synthase et la PEP synthétase. Ces deux enzymes avaient également été retrouvés chez *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Selon les travaux de EYZAGUIRRE *et al.*, 1982, l'étape irréversible catalysée par la PEP synthetase serait le siège de phénomènes de régulations. Une meilleure compréhension de ce métabolisme nécessitera une étude plus approfondie de cet enzyme.

La néoglucogénèse procède ensuite par la voie inverse de la glycolyse d'EMBDEN-MEYERHOFF, nous avons en effet pu mesurer toutes les activités enzymatiques conduisant à la synthèse de glucose 6-Phosphate. Cette voie est également utilisée chez les Mb.thermoautotrophicum.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la glycogénogénèse de *Methanotherix soehngeni*. Le glycogène est en effet assez répandu parmi les Archaeobactéries et la compréhension de son rôle de réserve énergétique et de réserve de carbone chez les méthanogènes présente des intérêts à la fois sur le plan technologique et fondamental. Nous avons pu dans un premier temps montrer la présence de glycogène et caractériser l'activité glycogène synthase en extrait acellulaire. Cet enzyme utilise préférentiellement l'ADP-glucose comme précurseur

nucléotiotique. Dans un deuxième temps, nous avons purifié cet enzyme en mettant au point un protocole original en deux étapes, avec des rendements satisfaisants. L'enzyme est obtenu sous forme d'un complexe avec le glycogène. Il faut noter qu'il s'agit de la première purification d'un tel enzyme d'une Archaeobactérie, et la comparaison avec les enzymes d'Eucaryotes et d'Eubactéries présente un intérêt phylogénétique. L'enzyme est constitué de sous-unités de MM 32 Kdaltons, ce qui la différencie des autres règnes. La masse moléculaire de la protéine native est de 130 kdaltons, ce qui suggère la présence de 4 sous-unités. L'enzyme purifié utilise préférentiellement l'ADP-glucose à l'UDP-glucose comme donneur de résidus glucosyls, ce qui l'apparente dans ce domaine aux Eubactéries.

Nous avons entrepris l'étude de la régulation, au niveau de l'enzyme purifié. Les intermédiaires glycolytiques, l'AMP et le phosphate inorganique n'ont pas d'effet sur l'activité, tandis que l'ADP et l'ATP sont inhibiteurs. L'inhibition par l'ADP, produit de la réaction est classique, celle par l'ATP ( $K_i = 5 \mu\text{M}$ ) est par contre à la fois originale, mais aussi surprenante, puisqu'il s'agit d'un substrat de la synthèse de l'ADP-glucose, précurseur de la synthèse du glycogène et qu'en fait aucune régulation n'intervient pour cet enzyme chez les Eubactéries.

Une meilleure compréhension de ce phénomène nécessitera l'étude des autres enzymes impliqués dans le métabolisme du glycogène (l'ADP-glucose synthetase et l'activité dégradant le glycogène) et d'autre part, l'étude des conditions physiologiques menant à l'accumulation et à l'utilisation de ce matériel de réserve. Des études similaires chez d'autres méthanogènes et chez d'autres Archaeobactéries utilisant le glycogène (*Sulfolobus*, *Thermoproteus*) permettront de savoir si ce type de régulation est généralisable.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

	<i>page</i>
- ALDRICH H.C., BEIMDORM D.B., BOKRANZ M. and SCHONHEIT (1987). Arch. Microbiol., 147, 190-194.	35
- ANKEL-FUCHS D. and THAUER R.K. (1986). Eur. J. Biochem., 156, 171-177.	28
- BALCH W.E., GOX G.E., MAGRUM L.J. WOESE C.R and WOLFER S. (1979). Microb. Rev. 43, 260-296.	14,18
- BARKER H.A. (1956).In "Bacterial fermentations". John Wiley & Sons, Inc., New-York, p. 1-27.	23
- BLAUT M. and GOTTSCHALK G. (1982). Arch. Microbiol., 133, 230-235.	34
- BRADFORD M.M. (1976). Anal. Biochem., 72, 248-254.	56
- BRIDE Mc. and WOLFE R.S. (1971). Biochem., 10, 2317-2324.	19
- CAMICI M., DE PAOLI-ROACH A.A. and ROACH P.J. (1984). J. Biol. Chem. 259, 3429-3434.	79
- CATTANEO J., MAGNAN M. and BIGLIARDI J. (1979). Arch. Biochem. Biophys., 196, 449-458.	79
- CODD G.A. (1984). In "Aspects of Microbial Metabolism and Ecology". Ed. G.A. CODD,London, Academic Press, 129-173.	36
- DANIELS L. and ZEIKUS J.G. (1978). J. Bact. 136, 75-84.	22,38
- DIEKERT G.B., THAUER R.K. (1978). J. Bacteriol., 136, 597-666.	36
- DI MARCO A.A., DONNELLY M.I. and WOLFE R.S. (1986). J. Bacteriol., 168, 1372-1377.	24
- DODDEMA H.J., VAN DER DRIFT C., VOGELS G.D. and VEENHUIS M. (1979). J. Bacteriol.140, 1081-1089.	33
- DONNELLY M.I. and WOLFE R.S. (1986). Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 1, 156-174.	24
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON G..n REBERS P.A., SMITH F. (1956). Anal. Chem., 28, 350-356.	56
- EIKSMANN B. and THAUER R.K. (1985). Arch. Microbiol., 142, 175-179.	24

- EIRICH L.D. (1978). Ph. D. thesis. Univ. of ILLINOIS at Urbana-Champaign.	19
- EKIEL I., SMITH I.C.P. and SPROTT G.D. (1983). J. Bacteriol., 156, 316-326.	43
- EKIEL I., SPROTT G.D. and PATEL G.B. (1985). J. Bacteriol., 162, 905-908.	43,62
- ELLEFSON W.L. and WOLFE R.S. (1981). J. Biol. Chem., 256, 4259-4262.	26
- ESCALANTE-SEMERENA J.C., LEIGH J.A. and WOLFE R.S. (1984) In microbiol. growth on C1 compounds. R.L. Crawford, R.S. Hanson (ed). Elsevier.	22
- EVANS M.C.W., BUCHANAM B.B., ARNON D.A. (1966). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 55, 928-934.	36
- EVANS J.N.S., TOLMAN C.J., KANODIA S. and ROBERTS M.F. (1985). Biochemistry, 24, 5693-5698.	16,45
- EYZAGUIRRE G., JANSEN K. and FUCHS G. (1982). Arch. Microbiol., 132, 67-74.	42,43,53 61,82
- FOX J., KAWAGUCHI K., GREENBERG E. and PREISS J. (1976). Biochemistry, 15, 849-855.	79
- FUCHS G., WINTER H., STEINER I. and STUPPERICH E. (1983). Arch Microbiol., 136, 160-162.	42,46,52 53,64
- FUCHS G. et STUPPERICH E. In microbiol. growth on C1 compounds. R.L. Crawford R.S. Hanson (ed). Elsevier p. 199-202	41
- FUCHS G. (1986). FEMS Microbiol. Rev., 39, 181-213.	36
- GORRIS L.G.M. and VAN DER DRIFT C. (1986). In Biology of anaerobic bacteria. DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G., MONTREUIL J., ROMOND C., SAUTIERE P. and GUILLAUME G. eds, pp. 144-150.	20,60
- GOTTSCHALK G., BLAUT M., JUSSOFIE A., MAYER F., MULLER V., OSSMER R. (1987). In : "Microbiol growth on C1 compounds". M.W. VAN VERSEVELD, J.A. DUINE (ed), pp. 203-209	34
- GRAHAME D.A. and STADTMAN T.C. (1987). Biochem. Biophys. Res. Commun., 147, 254-258.	24,83
- GRUSON B. (1985). D.E.A. de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I.	40
- GUNSALUS R.P., WOLFE R.S. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 790-795.	23

- GUNSALUS R.P. and WOLFE R.S. (1978). FEMS Microbiol. Lett. 3, 191-193.	20,35
- GUNSALUS R.P. and WOLFE R.S. (1978). J. Bacteriol., 135, 851-857.	26,35
- GUNSALUS R.P. and WOLFE R.S. (1980). J. Biol. Chem., 255, 1891-1895.	18,28
- HAMMEL K.E., CORNWELL K.L., DIEKERT G.R. and THAUER R.K. (1984). J. Bacteriol., 157, 975-978.	38
- HARTZELL P.L., ESCALANTE-SEMERENA J.C., ZUILIUS G. and DONNELLY M.I. (1985). Biochem. Biophys. Res. Comm., 133, 884-890.	24
- HARTZELL P.L. and WOLFE R.S. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 6726-6730.	26
- HAUSINGER R.P., ORME-JOHNSON W.H. and WALSH C. (1984). Biochemistry, 23, 801-804.	26
- HOLDER U., SCHMIDT D.E., STUPPERICH E. and FUCHS G. (1985). Arch. Microbiol., 141, 229-238.	18
- HUANG K.P. and CABIB E. (1974). J. Biol. Chem., 249, 3851-3857.	79
- HUSER B.A., WUHRMANN K. and ZEHNDER A.J.B. (1982). Arch. Microbiol., 132, 1-9.	14
- HUSTER R., GILLES H. and THAUER R.K. (1985). Eur. J. Biochem., 148, 107-111.	26
- JACOBSON F.S., DANIELS L., FOX J.A., WASLH C.T. and ORMEJOHNSON W.H. (1982). J. Biol. Chem., 257, 3385-3388.	24
- JANSEN K., STUPPERICH E. and FUCHS G. (1982). Arch. Microbiol., 132, 355-364.	42,51 52,63
- JANSEN K., THAUER R.K., WIDDEL F., FUCHS G. (1984). Arch. Microbiol., 138, 257-262.	36
- KANDLER O. (1982). Zentralbl. Bakteriolog., Microbiol. Hyg., Abt. 1, Orig. C3, 149- 160.	17
- KANDLER O. and KONIG H. (1978). Arch. Microbiol., 118, 141-152.	
- KANODIA S. and ROBERTS M.F. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 5217-5221.	16
- KATES M., YENGOYAN L.S. and SASTRY P.S. (1965). Biochem. Biophys. Acta., 98, 252-258.	16

- KELTJENS J.T., WHITMAN W.B., CAERTELING C.G., VAN KOOTEN A.M., WOLFE R.S. and VOGELS G.D. (1982). Biochem. Biophys. Res. Commun., 108, 495-503.	20,26
- KELTJENS J.T., CAERTELING C.G., VAN HOOTEN A.M., VAN DISK H.F. and VOGELS G.D. (1983). Biochem. Biophys. Acta., 743, 351-358.	21
- KENEALY W.R. and ZEIKUS J.G. (1982). FEMS Microbiol. Lett., 14, 7-10.	61
- KENEALY W.R. and ZEIKUS J.G. (1982). J. Bacteriol., 151, 932-941.	38
- KENEALY W.R. and ZEIKUS J.G. (1982a). J. Bacteriol., 151, 932-941.	40
- KREISL P. and KANDLER O. (1986). System Appl. Microbiol., 7, 293-299.	17
- KOHLER H.P.E. and ZEHNDER A.J.B. (1984). FEMS Microbiol. Lett., 21, 287-292.	40,59
- KOJIMA N., FOX J.A., HAUSINGER R.P., DANIELS L., ORME-JOHNSON W.H., WALSH C. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 378-382.	24
- KONIG H., NUSSERE H. and STETTER K.O. (1985). FEMS Microbiol. Lett., 28, 265-269.	45
- KUSHWAHA S.C., KATES M., SPROTT G.D. and SMITH I.C.P. (1981). Biochim. Biophys. Acta, 664, 156-173.	17
- LAEMMLI U.K. (1970). Nature (London), 227, 680-685.	57
- LANCASTER J.R. (1986). FEBS Lett., 199, 12-18.	34
- LANGWORTHY T.A. (1977). Biochem. Biophys. Acta., 487, 37-50.	16
- LEIGH J.A., RINEHART K.L. and WOLFE R.S. (1984). J. Am. Chem. Soc., 106, 3636-3640.	21
- LEIGH J.A., RINEHART K.L. and WOLFE R.S. (1985). Biochemistry, 24, 995-999.	22
- LJUNGDAHL L.G. (1986). Ann. Rev. Microbiol., 40, 415-450.	24
- LOVLEY D.R., FERRY D.G. (1985). Appl. Environ. Microbiol., 49, 247-249.	27
- McVERRY P.H. and KIM K.H. (1974). Biochemistry, 13, 3505-3511.	79

- MEIJDEN P., JANSEN L.P.J.M., VAN DER DRIFT C. and VOGELS G.D. (1983). 18  
FEMS Microbiol. Lett., 19, 247-251.
- MEIJDEN P., HEYTHUYSEN H.J., POWELS A., HOUVEN F., VAN DER DRIFT C. 24  
and VOGELS G.D. (1983a).  
Arch. Microbiol. 134, 238-242.
- MILLER T.L. and WOLIN M.J. (1985). 45  
Arch. Microbiol., 141, 118-122.
- MIZUNUMA H. and TASHIMA Y. (1986). 64  
J. Biochem., 99, 1781-1788.
- MITCHELL P. (1961). 31  
Nature (London), 191, 144-148.
- MOUNTFORT D.O. (1978). 33  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 1346-1351.
- MURRAY P.A. and ZINDER S.H. (1987). 45  
Arch. Microbiol., 147, 109-116.
- NAGLE D.P. and WOLFE R.S. (1983). 26  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 2151-2155.
- NELSON N.J.K. and FERRY J.G. (1984). 27  
J. Bacteriol., 160, 526-532.
- NELSON N.J.K., TERLESKY K.C. and FERRY J.G. (1987). 25  
In "Microbial growth on C1 Compounds". M.W. VAN VERSEVELD,  
J.A. DUINE (ed), pp 70-76.
- NIMMO H.G. et TIPTON K.F. (1975). 64  
J. Biochem., 145, 323-324.
- NOLL K.M., RINEHART K.L., TANNER R.S. and WOLFE R.S. (1986). 19  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 4238-4242.
- NOLL K.M. RINEHART K.L., TANNER R.S. and WOLFE R.S. (1987). 26  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 83, 4238-4242.
- OBERLIES G., FUCHS G., THAUER R.K. (1980). 40,49,50  
Arch. Microbiol., 128, 248-252.
- ORON Y. et LARNER G. (1979). 54  
Anal. Biochem., 94, 409-410.
- OSSMER R., HUND T., HARTZELL P.L., KONHEISER U., KOHRING G.W., 35  
KLEIN A., WOLFE R. S., GOTTSCHALK and MAYER F. (1986).  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 5789-5792.
- PECK H.D. (1984). 31  
Physiological diversity of the sulfate reducing bacteria in  
Microbiol Chemoautotrophy, edited by W.R. STROHL and O.H. TUOVINEN,  
Ohio State University Press, Columbus.

- PELLERIN P. (1987). Thèse de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE-FLANDRES-ARTOIS.	16
- PFALTZ A., JAUN B., FASSLER A., ESCHENMOSER A., JAENCHEN R., GILLES H.M., DIEKERT G. and THAUER R.K. (1982). Helv. Chim. Act., 65, 828-864.	19
- PINE M.J. and BARKER H.A. (1955). J. Bacteriol., 71, 644-648.	24
- PIMENOT A.M., TIKHONOV Y.V., MEISNER I.S., TOGUZON R.T. (1986). J. Chromatogr., 365, 221-227.	57
- PREISS J. and GREENBERG E. (1965). Biochemistry, 4, 2328-2334.	79
- PREISS I. and WALSCH D.A. (1981). In : GINSBERG V., ROBBINS P. (eds). Biology of carbohydrates, Vol. 1, J. WILEY and sons, inc., New-York, pp. 203-313.	43,70
- ROTH R., DUFT R., BINDER A. and BACHOFEN R. (1986). System. Appl. Microbiol., 7,346-348.	
- ROUVIERE P.E., ESCALANTE-SEMERENA J.C. and WOLFE R.S. (1985). J. Bacteriol., 162,61-66.	26
- ROUVIERE P.E. and WOLFE R.S. (1987). J. Bacteriol., 169, 1737-1739.	26
- ROUVIERE P.E. and WOLFE R.S. (1987). Arch. Microbiol., 148, 253-259.	71
- SCHAFER S., BARKOWSKI C., FUCHS G. (1986). Arch Microbiol., 146, 301-308.	36
- SCHERER P.A. and BOCHEM H.P. (1983). Can. J. Microbiol., 29, 1190-1199.	45
- SCHONHEIT P., KEWELOH H. and THAUER R.K. (1981). FEMS Microbiol. Lett., 12, 347-349.	60
- SEELY R.J. and FAHRNEY D.E. (1983). J. Biol. Chem., 258, 10835-10838.	16
- SHIBA H., KAWASUMI T., IGARASHI Y., KODAMA T., MINODA Y. (1985). Arch. Microbiol. 141, 198-203.	36
- SMITH C.H., BROWN N.E. and LARNER J. (1971). Biochim. Biophys. Acta, 242, 81-88.	79
- SOOLING H. and WANG P. (1973). Biochem. Biophys. res. commun, 53, 1234-1239.	79
- SPROTT G.D. and JARREL K.F. (1981).	46

- Can. J. Microbiol., 27, 444-451.
- STUPPERICH E., HAMMEL K.E., FUCHS G. and THAUER R.K. (1983). 38  
FEBS Lett., 152, 21-23.
  - TAYLOR G.T., KELLY D.P. and PIRT S.J. (1976). 38  
In : Proceeding of the Symposium "Microbial production and utilization  
of gases (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO)". H.G. SCHLEGEL, G. GOTTSCHALK, N. PFENNING,  
eds.), pp. 173-180. Akademie der Wissenschaften zu Göttingen :  
E. GOLTZE.
  - THAUER K.R., JUNGERMANN K. and DECKER K. (1977). 23  
Bacterial. Rev., 41, 100-180.
  - THOMAS I. (1986). 35,71  
Thèse de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I.
  - TOLMAN C.J., KANODIA S., ROBERTS M.F. and DANIELS L. (1986). 16  
Biochem. Biophys. Acta. 886, 345-352.
  - TOUZEL J.P., PETROFF D. and ALBAGNAC G. (1981). 45  
System. Appl. Microbiol., 6, 66-71.
  - TOUZEL J.P. and ALBAGNAC G. (1983). 48  
FEMS Microbiol. Lett., 16, 241-265.
  - TOUZEL J.P., PRENSIER G., ROUSTAN J.L., THOMAS I., DUBOURGUIER H.C.,  
ALBAGNAC G. (1988). 14  
Int. J. Syst. Bacteriol., 38, 30-36.
  - VAN BEELEN P., GEERTS W.J., POL A. and VOGELS G.D. (1983). 20  
Anal. Biochem. 131, 285-290.
  - VAN BEELEN P., LABRO J.F.A., KELTJENS J.T., GEERTS W.J., VOGELS G.D.,  
LAARHOVEN W.H., GUYT W., HAASNOOT C.A.G. (1984). 20  
Eur. J. Biochem., 139, 359-365.
  - VAN BRUGGEN J.J.A., ZWART K.B., MERMANS J.G.F., VANHOVE E.M.,  
STUMM C.K.S. and VOGELS G.D. (1986). Arch. Microbiol., 144, 367-374. 45
  - WEIMER P.J., ZEIKUS J.G. (1979). 40,61,62,41  
J. Bacteriol., 137, 332-339.
  - WHITMAN W.B. and WOLFE R.S. (1982). 26  
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 41, 5157 (abstr.).
  - WHITMAN W.B. and WOLFE R.S. (1983). 26  
J. Bacteriol., 154, 640-649.
  - WILDBRUGER G., THOMM M., KONIG H., OBER K., RICCHIUTO T.  
and STETTER K.O. (1982). Arch. Microbiol., 132, 31-36. 45
  - WOESE C. (1977). 7  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5088-5090.
  - WOESE C.R. (1987). 8



Microbiol. Rev., 51, 221-271.	
- WOLFE R.S. (1971). Adv. Microb. Physiol., 6, 107-146.	23
- WOOD H.G., RAGSDALE S.W., PEZACKA E. (1986). Trends Biochem. Sci., 11, 14-18.	36
- ZABEL H.P., KONIG H., and WINTER J. (1984). Arch. Microbiol., 137, 308-315.	45
- ZEIKUS J.G. (1977). Bacterial Rev., 41, 514-541.	45
- ZEIKUS J.G., FUCHS G., KENEALY W. and THAUER R.K. (1977). J. Bacteriol, 132, 604-613.	38,42 50,60
- ZEIKUS J.G. (1983). Adv. Microb. Physicol., 24, 215-299.	36
- ZHILINA T.N. (1976). Mikro. Biol., 45, 481-489.	45

RESUME

Nous avons étudié la néoglucogénèse et la glycogénogénèse et sa régulation chez Methanothrix soehngeni, bactérie méthanogène acétoclaste.

La synthèse de glucose 6-phosphate à partir d'acétate est réalisée par l'acétate coenzyme A ligase, la pyruvate synthase et la phosphoénolpyruvate synthétase pour conduire à la formation de phosphoénolpyruvate classiquement transformé en glucose 6-phosphate par la voie reverse d'Emden-Meyerhoff.

La glycogène-synthase, associée au glycogène, a été purifiée jusqu'à homogénéité par l'emploi de deux étapes de chromatographie, d'hydrophobicité et d'affinité. La protéine native possède une masse moléculaire de 130.000 Da et est composée de quatre sous-unités identiques de 32.000 Da. L'activité spécifique est de 16,5 n.katal par mg de protéine, l'affinité de  $9 \cdot 10^{-6}$  M vis à vis de l'ADP-glucose.

Les intermédiaires glycolytiques, le phosphate inorganique et l'AMP n'ont pas d'effet sur l'activité enzymatique tandis que l'ATP et l'ADP (produit de la réaction) l'inhibent de manière compétitive ( $K_I$  respectifs  $5 \cdot 10^{-6}$  et  $150 \cdot 10^{-6}$  M). L'inhibition par l'ATP est d'un intérêt capital puisqu'aucune régulation n'a été décrite pour cet enzyme chez les Eubactéries. Néanmoins, l'importance physiologique de ce type de régulation reste à démontrer.

Nos travaux constituent en outre la première description complète d'une glycogène synthase d'une Archaeobactérie.

MOTS-CLES

Methanothrix soehngeni

méthanogène

Archaeobactérie

néoglucogénèse

glycogénogénèse