

ORGANISATION FONCTIONNELLE DES GENES  
*NIF* DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* : ETUDE BIOCHIMIQUE

J. Houmard, D. Bogusz, L. Sibold, D. Kahn, C. Elmerich & R. Bigault  
 Unité de Physiologie Cellulaire, Département de  
 Biochimie et Génétique Microbienne  
 Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 PARIS

Il est maintenant établi que, chez *Klebsiella pneumoniae*, l'ensemble des gènes impliqués dans la réduction de l'azote en ammoniacque (gènes *nif*) se trouve sur un segment continu d'ADN, entre l'opéron histidine et le gène *shi A*. Les études génétiques ont permis la mise en évidence d'au moins 14 cistrons, répartis en 7 ou 8 unités de transcription. Parmi ces gènes, 3 codent pour les sous-unités qui composent la nitrogénase, l'enzyme responsable de la réduction de l'azote en ammoniacque. Dans le but de connaître l'organisation fonctionnelle des gènes *nif* de *K. pneumoniae*, nous avons étudié biochimiquement et génétiquement un grand nombre de mutants *Nif<sup>-</sup>*, obtenus soit par insertion du bactériophage Mu, soit par mutagenèse à l'éthylméthane-sulfonate, soit encore par délétion. Les résultats de l'étude génétique sont présentés dans la communication ci-jointe (C. Elmerich et coll.)

L'étude biochimique a consisté à comparer les autoradiogrammes de gels à deux dimensions réalisés avec des extraits bruts de cellules, marquées en conditions de dérèpression avec des acides aminés <sup>14</sup>C. Nous avons aussi réalisé des expériences de complémentation *in vitro* avec des extraits bruts de mutants et les différents composants purifiés de la nitrogénase d'une part, mais aussi entre extraits bruts de différents mutants. Parallèlement nous avons recherché, à l'aide d'antisera spécifiques, la présence des différentes sous-unités de la nitrogénase. Enfin, nous avons regardé quels sont les mutants qui, *in vitro*, sont capables de faire fonctionner la nitrogénase à partir d'un donneur d'électron physiologique tel le pyruvate.

Ces différentes approches nous ont permis :

1. d'identifier les produits (poids moléculaire et point isoélectrique) de certains des gènes *nif*, tels que *nif<sup>f</sup> J*, *nif<sup>f</sup> H*, *nif<sup>f</sup> D*, *nif<sup>f</sup> K*, *nif<sup>f</sup> U*, *nif<sup>f</sup> S* et *nif<sup>f</sup> B*;
2. de confirmer l'existence ainsi que le sens de transcription de quelques opérons, en particulier *nif<sup>f</sup> K*, *D*, *H*;
3. de mettre en évidence le rôle régulateur du produit du gène *nif<sup>f</sup> A*, dont l'absence conduit à la non-synthèse d'un grand nombre des produits des gènes

4. de révéler la nature cryptique de certains mutants (*nif* J, *nif* F) chez lesquels on observe une activité nitrogénase *in vitro*, en utilisant le dithionite comme donneur d'électrons.