

# Étude biochimique de la nitrogénase d'*Azospirillum brasilense*

Seydou T. SANOGHO\*

---

## Résumé

*Azospirillum brasilense*, bactérie fixatrice d'azote, a été cultivée à pression constante d'oxygène dissous, dans un fermenteur de 15 l. L'activité nitrogénasique in vivo se révèle supérieure en dérépression à celle mesurée après la croissance. En condition de dérépression à 37 °C sous 99 % N<sub>2</sub> et 1 % O<sub>2</sub>, l'activité apparaît après 3 heures d'incubation puis augmente linéairement pendant 2 heures pour atteindre une valeur maximum de l'ordre de 160 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg prot./min, alors que la valeur mesurée en condition de croissance est de 10 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg prot./min.

Les extraits bruts obtenus à partir de cellules déréprimées perdent 80 % de leur activité, si elles sont congelées dans l'azote liquide avant d'être brisées à la presse de French. En revanche, les extraits bruts obtenus à partir de cellules non congelées peuvent être conservés dans l'azote liquide pendant des mois sans perte apparente d'activité.

La nitrogénase d'*A. brasilense* (Ab 1) a été partiellement purifiée. L'électrophorèse réalisée en présence de SDS a montré qu'elle était composée de 2 types de sous-unités de masses moléculaires voisines de celles observées pour les sous-unités de la nitrogénase de *Klebsiella pneumoniae* (Kp 1).

**Mots-clés :** *Azospirillum* — Nitrogénase — Dépression — Purification.

---

## Abstract

*Azospirillum brasilense*, a nitrogen-fixing bacterium, was grown at a constant concentration of dissolved oxygen in 15 l batch cultures: Nitrogenase activity measured in vivo was higher with derepressed cells than with cells grown under conditions of nitrogen fixation. With these derepressed cultures, under 99 % N<sub>2</sub> and 1 % O<sub>2</sub>, nitrogenase activity was detected after 3 hours at 37 °C and a maximum activity of 160 nmoles/mg prot./min. was reached 2 hours later, while specific activity measured in cultures after growth reached a maximum value of 100 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg prot./min.

Crude extracts prepared from cells frozen in liquid nitrogen before lysis showed a 80 % loss of activity as compared with that of extracts of nonfrozen cells. However, all crude extracts, when frozen in liquid nitrogen, remained active for months without any loss of activity.

Nitrogenase from *A. brasilense* (Ab 1) was purified from these extracts. When loaded on to 10 % polyacrylamide gel in the presence of SDS, it showed two bands in the same migration zone as *Klebsiella pneumoniae* Kp 1; the molecular weights of Ab 1 subunits are similar to those of *K. pneumoniae* (Kp 1).

**Key words :** *Azospirillum* — Nitrogenase — Derepression — Purification.

## Introduction

BECKING (1963) avait constaté, avec un *Spirillum* isolé de sols tropicaux, l'incorporation de <sup>15</sup>N en présence d'extrait de levure. DAY et DÖBEREINER (1976), en utilisant la méthode de réduction de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, avaient montré que cette bactérie,

réisolée à partir des racines de *Digitaria decumbens* au Brésil, pouvait fixer l'azote. Depuis lors, le genre *Spirillum* a suscité beaucoup d'intérêt et plusieurs souches ont été réisolées à partir de graminées tropicales (*Oryza sativa*, *Sorghum vulgare*, *Zea mays*) et de dicotylédones (*Phyllanthus parviflorus*, *Amaranthus spinosus*) (LAKSHMI et al., 1976).

---

\* Laboratoire de microbiologie du sol. ISFRA, B.P. 241, Bamako, Mali.

Bactérie Gram-négative, vibrioïde, mobile, elle contient des granules de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, ce qui lui a valu le nom spécifique de *lipoferum*. En culture pure, en milieu dépourvu d'azote combiné et en conditions microaérophiles, elle réduit  $C_2H_2$  en  $C_2H_4$  (DAY et DÖBEREINER, 1976; OKON *et al.*, 1976).

Le genre *Spirillum* a été revu sur le plan taxinomique par TARRAND *et al.* (1978). En se basant sur l'homologie de l'ADN, ils ont révisé le genre *Spirillum* en *Azospirillum* qui comprend deux groupes. Le groupe I renferme des bactéries qui utilisent le glucose, produisent des acides en milieu peptone-glucose et exigent de la biotine pour leur croissance. Elles sont fixatrices d'azote et appartiennent à l'espèce *Azospirillum lipoferum*. Le groupe II comprend des bactéries qui n'utilisent pas le glucose, mais utilisent les sels d'acides du cycle de Krebs, n'acidifient pas le milieu peptone-glucose et n'exigent pas de biotine pour leur croissance. Elles sont fixatrices d'azote et appartiennent à l'espèce *Azospirillum brasilense*. La souche ATCC 29145 en est le prototype. Une récente étude immunologique faite par DE POLLI *et al.* (1980) a confirmé l'existence de différences antigéniques entre les deux groupes.

Les bactéries du groupe *A. brasilense* comprennent deux sous-groupes :

— *A. brasilense nir<sup>-</sup>* regroupe les souches qui ne possèdent pas de nitrate-réductase et qui ne sont donc pas dénitrifiantes;

— *A. brasilense nir<sup>+</sup>* regroupe des souches qui possèdent la nitrate-réductase et qui sont de ce fait dénitrifiantes. La souche Sp 7 (ATCC 29145) est *A. brasilense nir<sup>+</sup>* (SCOTT *et al.*, 1979).

*Azospirillum brasilense* peut utiliser le malate, le succinate, le lactate, le pyruvate ou le succinate comme sources de carbone; en conditions microaérophiles et en milieu dépourvu d'azote combiné, elle peut réduire  $N_2$  en  $NH_4^+$ . Ainsi, les sels d'acides du cycle de Krebs lui fournissent l'énergie nécessaire pour la croissance et la fixation de l'azote. Mais en anaérobiose stricte ou à des tensions d'oxygène  $\leq 0,002$  atmosphère, on n'observe pas d'activité nitrogénasique (DAY et DÖBEREINER, 1976; OKON *et al.*, 1976).

L'addition d'ions  $NH_4^+$  au milieu de culture réprime l'activité nitrogénasique, mais stimule la croissance (LUDDEN *et al.*, 1978). Lorsque la source d'ions  $NH_4^+$  est épuisée, on observe une dérépression de la nitrogenase et la bactérie peut alors fixer l'azote. Ceci indique donc que l'ammonium, produit final de la fixation, contrôle la synthèse de la nitrogenase.

La régulation de l'activité de la nitrogenase et de sa synthèse par les ions  $NH_4^+$  a été étudiée chez d'autres bactéries. On sait que le premier produit

de l'incorporation de  $NH_4^+$  est le glutamate. GAUTHIER et ELMERICH (1977) ont montré que la synthèse de la nitrogenase chez *Azospirillum brasilense* était sous la dépendance de la glutamine-synthétase. Une partie des ions  $NH_4^+$  sont excrétés dans le milieu de culture et leur accumulation provoque alors l'arrêt de la synthèse de la nitrogenase (GAUTHIER, 1978).

Tous les complexes nitrogenase sont constitués de deux protéines : la molybdoferrodoxine ou composant 1 ou nitrogenase et l'azoferredoxine ou composant 2 ou nitrogenase réductase. La nitrogenase est un tétramère  $\alpha_2\beta_2$  de masse moléculaire voisine de 200 000, contenant du molybdène, du fer et du soufre labile, et qui est sensible à l'oxygène. La nitrogenase réductase est un dimère  $\alpha_2$ , de masse moléculaire voisine de 60 000, ne contenant pas de tryptophane. Elle contient du fer et du soufre labile et elle est beaucoup plus sensible à l'oxygène que la nitrogenase.

Aucune des deux protéines n'est active seule, mais quand elles sont associées en présence de Mg-ATP, d'un donneur d'électrons, en anaérobiose stricte, elles réduisent  $N_2$  en  $NH_4^+$ . Cette réduction de  $N_2$  s'accompagne d'un dégagement de  $H_2$ .

La nitrogenase réductase de *Rhodospirillum rubrum* et celle d'*Azospirillum brasilense* sont cependant inactives lorsqu'on les isole. LUDDEN et BURRIS (1976) ont montré qu'en ajoutant un composant membranaire à la nitrogenase réductase inactives de *R. rubrum*, on pouvait l'activer à condition que le milieu réactionnel contienne en plus des ions  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  et de l'ATP. Ce composant membranaire, appelé facteur activant (A.F.), était sensible à l'oxygène et à la trypsine (NORLUND *et al.*, 1978).

CARRITHERS *et al.* (1979) ont montré qu'il existait deux types, A et R, de nitrogenase réductase, en fonction des conditions de culture de *R. rubrum*. Celle de type A serait présente chez les bactéries cultivées dans un milieu, dont la source d'azote combiné serait épuisée. En revanche, si le milieu de culture de la bactérie renferme de l'azote gazeux, c'est celle de type R qui est synthétisée. Cette dernière nécessite une activation pour être fonctionnelle. LUDDEN et BURRIS (1979) ont montré que la nitrogenase réductase de *R. rubrum* était constituée de deux sous-unités différentes au lieu d'un seul type et que l'une des deux sous-unités renfermait de l'adénine et du ribose. Une fois activée, cette nitrogenase réductase ne présente plus qu'une unité, comme les autres nitrogenase réductases connues. OKON *et al.* (1978), LUDDEN *et al.* (1978) ont montré que le facteur activant de *R. rubrum* pouvait contribuer à augmenter l'activité nitrogénasique des extraits bruts d'*Azospirillum brasilense*. A l'inverse, les extraits bruts inactifs d'*A. brasilense* étaient capables d'activer la nitrogenase réductase de *R.*

*rubrum*, ce qui laissait supposer une similitude entre ces deux protéines.

Une étude physiologique de la souche ATCC 29145 d'*Azospirillum brasilense* a été réalisée par Gauthier (1978), mais la biochimie de la nitrogénase n'avait pas été abordée. Nous avons donc entrepris cette étude, en essayant de développer une méthode de culture et de mesure de l'activité nitrogénasique *in vivo*, ce qui nous a conduit à l'étude de l'activité nitrogénasique *in vitro* et à tenter de purifier la nitrogénase.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. SOUCHES BACTÉRIENNES

La souche utilisée d'*Azospirillum brasilense* est ATCC 29 145 (Von BULOW et DÖBEREINER, 1975), désignée Sp 7 000 pour des raisons de commodité. Trois autres souches ont été étudiées, il s'agit de mutants Nif- de la souche Sp 7 : Sp 7 201, Sp 7 202 et Sp 7 203.

### 1.2. MILIEUX DE CULTURE

Le milieu complexe Difco contient, en g/l : bouillon nutritif (8);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,25); KCl (1,0);  $MnCl_2$  (0,001).

Le milieu synthétique : la base saline de ce milieu est celle de Kaliniskaïa, additionnée des différents oligo-éléments. Elle contient, en g/l :  $PO_4HK_2$  (1,67);  $PO_4H_2K$  (0,87);  $SO_4Mg \cdot 7H_2O$  (0,29); NaCl (0,48);  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,07);  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (0,01); extrait de levure (0,1);  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0,005);  $SO_4Mn \cdot 2H_2O$  (0,025);  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,00024);  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$  (0,00004);  $H_3BO_3$  (0,00028). Le pH est ajusté à 6,8.

On appelle milieu K, cette base supplémentée par du D-L. malate à 20 mM.

### 1.3. TECHNIQUES DE CULTURE

#### Précultures

Les précultures sont faites en milieu complexe dans des fioles d'Erlenmeyer agitées à l'air à 30 °C, à raison de 50 ml par fiole de 300 ml. Onensemence le milieu avec une colonie provenant d'une culture faite sur milieu gélosé. La croissance est suivie par la mesure de la densité optique à 570 nm.

#### Cultures en fermenteur

Les cultures sont faites en fermenteur de 15 l dans lequel le mélange azote-air est tel que la tension d'oxygène est de 1 %.

Pour les cultures en croissance le milieu utilisé

est le milieu K contenant de l'extrait de levure et l'inoculum provient d'une préculture dont la densité optique est égale à 0,8 %. L'inoculation est faite à 1/100.

Pour les cultures en dérépression, on centrifuge une préculture de 15 l et on resuspend le culot cellulaire dans 100 ml de milieu K sans azote. Cette suspension servira d'inoculum pour un fermenteur renfermant le milieu dépourvu d'azote combiné.

Dans les deux cas, le pH est maintenu à 7,0 avec HCl 1 N, et la température d'incubation à 37 °C.

Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une seringue, sous argon, afin de mesurer l'activité nitrogénasique *in vivo* et la densité optique de la culture.

Ces mesures sont faites sur des aliquotes de 3 ml dans des fioles d'Erlenmeyer de 30 ml contenant une atmosphère d'argon et 0,5 % d'oxygène.

### 1.4. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ NITROGÉNASIQUE

L'activité de la nitrogénase est mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène. Le chromatographe à ionisation de flamme utilisé à cet effet est de marque Pye Unicam, muni d'une colonne de 40×0,2 cm remplie de Porapak T. La température de la colonne est de 50 °C et le gaz vecteur est de l'azote dont le débit est de 20 ml/mn.

#### Mesure de l'activité nitrogénasique sur des cellules entières

Après avoir injecté les 3 ml de culture dans la fiole d'Erlenmeyer, on laisse incubé pendant 5 minutes à 37 °C avec agitation; on injecte ensuite 10 % d'acétylène dans la fiole et on mesure l'éthylène formé après 5 minutes, puis toutes les 10 minutes, pendant 1 heure.

L'activité spécifique est exprimée en nanomoles d'éthylène par minute et par milligramme de protéine. Les protéines sont mesurées par la méthode du bleu de Coomassie G 250 (SEDMARK et GROSSBERG, 1977).

#### Mesure de l'activité nitrogénasique *in vitro*, sur des extraits acellulaires

Les cellules d'*Azospirillum brasilense* sont lysées mécaniquement sous azote, à l'aide d'une presse de French, dans un tampon 300 mM Tris-acétate de pH 8,5, contenant 0,5 mg/ml de  $Na_2S_2O_4$ , 0,1 mg/ml de dithiothreitol (DTT) et 0,1 mg/ml de DNase.

Toujours en anaérobiose, les extraits acellulaires sont alors centrifugés 30 mn à 10 000 g et ce premier surnageant (Sg 1) est ensuite centrifugé pendant 120 mn à 45 000 g. On obtient un second surnageant (Sg 2) que l'on congèle dans l'azote liquide. Sur cet extrait brut, un dosage d'activité,

d'une part, et un dosage de protéines, d'autre part, sont effectués de façon à définir l'activité spécifique (A.S.). Les mesures d'activité nitrogénasique *in vitro* sont effectuées dans les fioles à sérum de 10 ml à 30 °C et en anaérobiose stricte. Pour obtenir une activité nitrogénasique *in vitro*, il faut fournir au milieu réactionnel, en plus de l'extrait nitrogénasique, les substances suivantes à des concentrations définies dans 25 mM HEPES NaOH à pH 7,3 : un système générateur d'électrons et de protons, 10 mM de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , de l'ATP à 5 mM, un système régénérateur d'ATP comprenant 40 mM de créatine phosphate et 0,1 mg/ml de créatine kinase, ainsi que 15 mM  $\text{MgCl}_2$  et 0,5 mM  $\text{MnCl}_2$ .

L'activité spécifique est exprimée en nmoles de  $\text{C}_2\text{H}_4$ /mg de protéine/minute.

### 1.5. PURIFICATION DE LA NITROGÉNASE

#### Séparation des composants de la nitrogénase

On prépare une colonne de diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE) (5 × 8,5 cm), équilibrée en tampon 50 mM Tris-acétate pH 7,7, contenant 0,1 mg/ml DTT et 0,5 mg/ml de dithionite de façon à se placer en milieu réducteur et à établir l'anaérobiose.

Avant le dépôt de l'échantillon, on vérifie le pH et on contrôle l'anaérobiose à l'aide d'un papier contenant du méthyl-viologène. L'échantillon est dilué au 1/3 avec le même tampon, puis on le pré-adsorbe sur du DEAE pré-équilibré dans des tubes de centrifugation Jouan-Levy. On centrifuge à 5 000 rpm pendant 10 minutes et on élimine le surnageant.

L'extrait ainsi pré-adsorbé sur du DEAE est déposé sur la colonne sous atmosphère d'argon, puis on procède au lavage. On règle le débit à 230 ml/h et on lave une première fois avec 140 ml de 50 mM Tris-acétate à pH 7,7 puis avec 100 ml du même tampon contenant du NaCl à 50 mM.

On élue ensuite successivement avec 100 ml de 0,10 M NaCl, puis 200 ml de 0,20 M NaCl, puis 100 ml de 0,40 M NaCl, puis 300 ml de 0,45 M NaCl, et enfin avec 100 ml de 0,20 M  $\text{MgCl}_2$  dans du tampon 50 mM Tris-acétate pH 7,7.

Les fractions sont recueillies dans des flacons sous argon. La densité optique de l'éluat est enregistrée à 280 nm. L'activité des différentes fractions est mesurée seule ou en complémentarité avec la nitrogénase réductase purifiée de *Klebsiella pneumoniae* (Kp 2).

#### Purification de la nitrogénase (Ab 1)

Les fractions présentant une activité nitrogénasique avec Kp 2 sont celles qui contiennent la nitrogénase. Elles sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sous argon, à l'aide de filtres DIAFLO UM 10.

Cette purification comporte plusieurs étapes. Pendant toute l'opération, la température de la colonne est maintenue à 15 °C à l'aide d'un cryostat.

#### 1<sup>re</sup> étape: filtration sur Sephacryl S 300

Une colonne de 2,6 × 60 cm contenant du Sephacryl S 300 est équilibrée par du tampon 50 mM Tris-acétate pH 7,7, avec 0,5 mg/ml de dithionite, 0,1 mg/ml de DTT et 120 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Le débit est réglé à 38,7 ml/h. On vérifie le pH et l'anaérobiose.

L'ultrafiltrat est pompé et déposé sur la colonne sous argon. L'élution est réalisée à l'aide du même tampon.

La densité optique des fractions est mesurée à 280 nm et l'activité est dosée par complémentarité avec Kp 2.

#### 2<sup>e</sup> étape: DEAE-cellulose, gradient linéaire

Les fractions du S 300 ayant montré une activité par complémentarité avec Kp 2 sont rassemblées et concentrées sous argon sur filtre DIAFLO UM 10. Une colonne de 1,6 × 11 cm contenant du DEAE cellulose est équilibrée par du tampon 50 mM Tris-acétate pH 8,7, contenant 0,5 mg/ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , et 0,1 mg/ml de DTT. Le débit de la colonne est réglé à 38,7 ml/h. L'ultrafiltrat est pompé et adsorbé sur la colonne sous atmosphère d'argon. L'élution est réalisée par un gradient linéaire 100-300 mM NaCl dans 100 ml de tampon.

Les fractions sont recueillies comme précédemment, leur activité dosée en complémentarité avec Kp 2, et la concentration en protéine mesurée.

#### 3<sup>e</sup> étape: filtration Sephadex G 100

Les fractions actives du précédent DEAE sont rassemblées. Une colonne de 2,6 × 62 cm contenant du Sephadex G 100 est équilibrée par le même tampon, contenant en plus 120 mM de  $\text{MgCl}_2$ . On vérifie le pH et l'anaérobiose.

L'échantillon est concentré par ultrafiltration; l'ultrafiltrat est déposé sur la colonne et l'élution est réalisée avec le même tampon. Le débit de la colonne est réglé à 54 ml/h. Sur les fractions recueillies, on fait des dosages d'activité et de protéine.

#### Électrophorèse

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS) est utilisée pour suivre les différentes étapes de la purification de la nitrogénase et pour estimer son degré de pureté. La méthode est celle de LAEMMLI (1970), avec des gels à 10 % de polyacrylamide.

## 2. Résultats

### 2.1. MESURE DE L'ACTIVITÉ NITROGÉNASIQUE *in vivo*

Le tableau I récapitule les valeurs moyennes obtenues.

*Cinétique de l'activité nitrogénasique pendant la croissance*

La souche Sp 7 000 est cultivée en milieu K additionné de 100 µg/ml d'extrait de levure.

On observe généralement l'activité quand la densité optique est de l'ordre de 0,3, la source d'azote combiné du milieu de culture devant être épuisée. L'activité une fois apparue, augmente progressivement et son maximum est enregistré pour une densité optique de l'ordre de 0,54; elle atteint alors 115 nmoles/mg protéine/mn, puis elle décroît lorsque la densité optique dépasse 0,9.

*Cinétique de la dérépression de l'activité nitrogénasique*

La nitrogénase est déréprimée généralement après 3 heures d'incubation et l'activité s'accroît pendant 2 heures. Lorsque la densité optique de la culture en milieu Difco est ≤ 0,6 ou ≤ 1, il n'est pas possible d'obtenir la dérépression de l'activité nitrogénasique.

TABLEAU I

Activité nitrogénasique après croissance en conditions de fixation ou de dérépression à 37 °C

	Densité optique à 570 nm	Activité nitrogénasique (nmoles/mg P/mn)
Cellules (après croissance)	0,10 0,54 0,91	0 115 106
Cellules (en dérépression)	0,53 0,82 0,89 0,92	0 82 110 160

2.2. MESURE DE L'ACTIVITÉ NITROGÉNASIQUE *in vitro*

Les activités nitrogénasiques obtenues aux différentes étapes de la purification sont rapportées au tableau II.

D'après le tableau II, on peut noter :

-- que la totalité de l'enzyme se retrouve dans les surnageants, puisque les différents culots ne présentent pas d'activité nitrogénasique;

-- qu'en présence de la nitrogénase réductase purifiée de *Klebsiella pneumoniae*, Kp 2, l'activité augmente sensiblement pour Sg 2.

Avec les mêmes conditions expérimentales on

TABLEAU II

Activité nitrogénasique de différentes fractions

	Activités spécifiques (nmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg prot./mn)	
	Extrait seul (1 mg/essai)	Extrait + Kp2 (60 µg/essai)
Extrait brut acellulaire.....	4,6	6,7
Centrifugation 10 000 g, 30 minutes		
Culot (C 1).....	0	0
Surnageant (Sg 1).....	0	7,9
Centrifugation 45 000 g, 120 minutes		
Culot (C 2).....	0	0
Surnageant (Sg 2).....	6,0	9,74

a pu observer que les différentes souches Nir ne réduisent l'acétylène, ni en culture *in vivo*, ni *in vitro*, même après complémentation par Kp 2.

*Influence de l'azote liquide sur la conservation de l'activité nitrogénasique*

Les activités nitrogénasiques de la plupart des extraits obtenus se situaient entre 1 et 2 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg prot./mn. C'est pourquoi nous avons

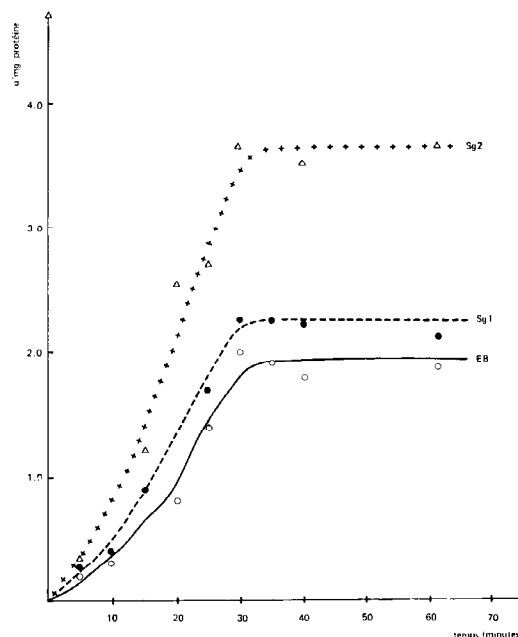


Fig. 1. — Influence du temps de réaction sur l'activité nitrogénasique. Une unité (u) est définie comme étant une nmole de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> produite par minute.

cherché à savoir si ces faibles activités étaient dues à la congélation des cellules entières dans l'azote liquide.

Des cellules provenant du même fermenteur ont été divisées en deux lots. Les cellules du premier lot ont été resuspendues directement dans le tampon 300 mM Tris-acétate pH 8,5, en présence de dithionite, de DTT et de DNase; elles sont brisées à la

presse de French et l'extrait obtenu est congelé dans de l'azote liquide. Les cellules du second lot sont d'abord congelées dans l'azote liquide, décongelées quelques jours plus tard et brisées à la presse de French.

Les deux extraits ainsi obtenus sont dosés et leurs activités spécifiques comparées. Le tableau III récapitule les valeurs obtenues.

TABLEAU III  
Effet de l'azote liquide sur la conservation de l'activité nitrogénasique

	Activité nitrogénasique <i>in vitro</i> (nmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg prot./mn)		
	premier jour	1 semaine plus tard	2 mois plus tard
Lot de cellules brisées, puis congelées.....	9,5	9,31	9,0
Lot de cellules congelées, puis brisées.....	1,9	1,7	non testée

Les activités des extraits du second lot sont très faibles, de 80 % inférieures à celles des cellules du premier lot. Lorsqu'on congèle les cellules entières d'*Azospirillum brasilense* dans l'azote liquide, on peut donc s'attendre à une perte d'au moins 80 % de l'activité nitrogénasique des extraits. Il est donc préférable de briser d'abord les cellules et de congeler les extraits, puisque l'activité de ceux-ci reste pratiquement inchangée, même après deux mois dans l'azote liquide.

#### *Influence du temps d'incubation sur la vitesse de réaction*

La figure 1 montre que la variation de l'activité nitrogénasique est linéaire pendant environ 25 minutes dans les conditions déterminées.

#### *Influence de la concentration en substrat*

La figure 2 montre qu'avec 1 ml de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> dans une fiole de 10 ml, la concentration est optimale, soit 10 % du volume de la fiole.

#### *Influence de certains constituants du milieu réactionnel sur la vitesse de réaction*

##### *Influence de la concentration en ATP*

Dans le mélange réactionnel, nous avons fait varier seulement la concentration en ATP. La figure 3 montre que la concentration optimale est de 5 mM ATP, lorsque le milieu renferme 15 mM de MgCl<sub>2</sub> et 0,5 mM de MnCl<sub>2</sub>.

Le milieu réactionnel utilisé dans les différents dosages était donc convenable, puisqu'il contenait 5 mM d'ATP, 15 mM de MgCl<sub>2</sub> et 0,5 mM de MnCl<sub>2</sub>.

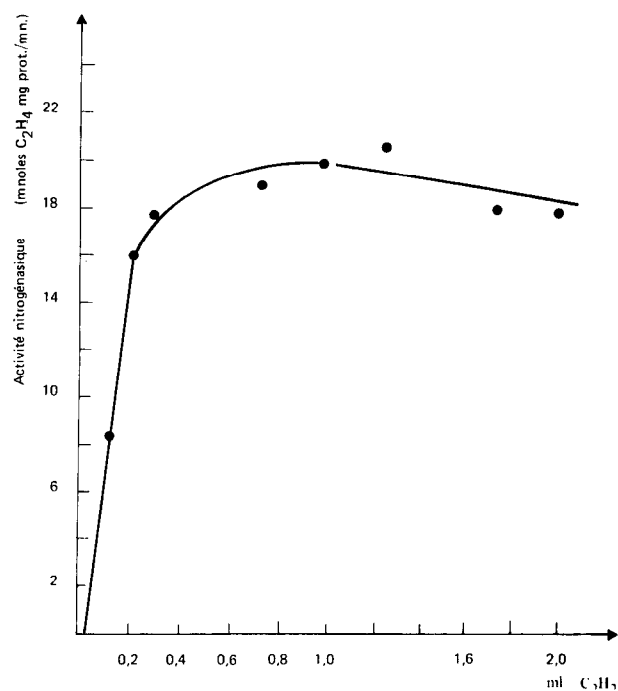


Fig. 2. — Influence de la concentration en acétylène sur l'activité nitrogénasique.

##### *Influence de la concentration en Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>*

Dans les différents milieux réactionnels utilisés, la concentration du dithionite était égale à 10 mM. Il s'agissait de savoir si cette concentration était optimale. La figure 4 indique que la concen-

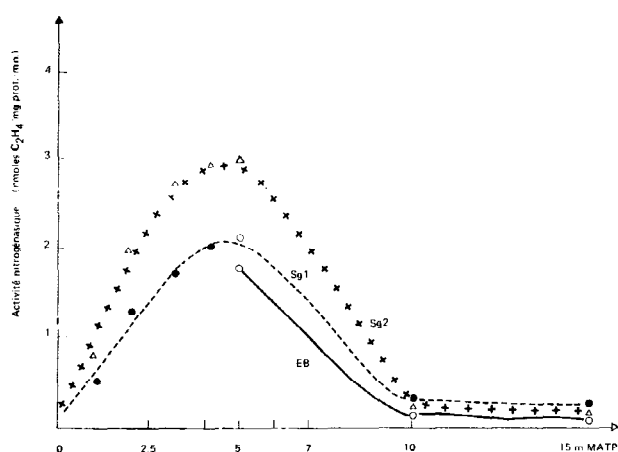


Fig. 3. — Influence de la concentration en ATP.

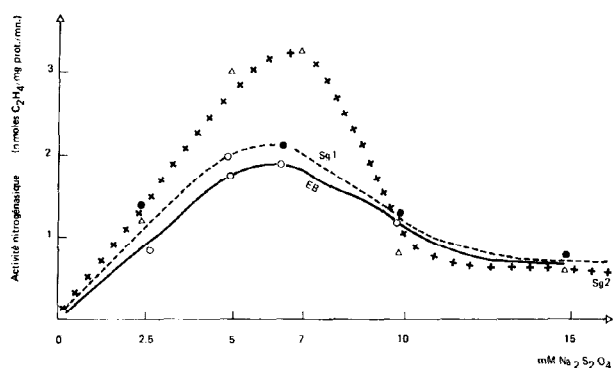


Fig. 4. — Influence de la concentration en  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .

tration optimale se situe entre 5 et 7 mM de dithionite; au-dessus de ces valeurs, on constate un effet inhibiteur. Dans les expériences ultérieures, la concentration employée était de 7 mM.

*Influence de la concentration en extraits*

La figure 5 montre que l'activité nitro-

génasique optimale était obtenue entre 0,8 et 1 mg de protéine dans la fiole, dans le cas de Sg 2; pour l'extrait brut natif et Sg 1, les concentrations optimales étaient légèrement supérieures, de l'ordre de 1,2 mg.

2.3. PURIFICATION DE LA NITROGÉNASE

Pour le fractionnement de la nitrogénase en ses deux composants Ab 1 et Ab 2, nous avons utilisé de la DEAE-cellulose. Les différentes fractions recueillies ont été dosées seules et en complémentation hétérologue avec Kp 2 purifiée, afin de repérer chacun des deux composants de la nitrogénase, puisque Ab 1 peut réagir avec Kp 2.

Les fractions recueillies à 300 mM de NaCl

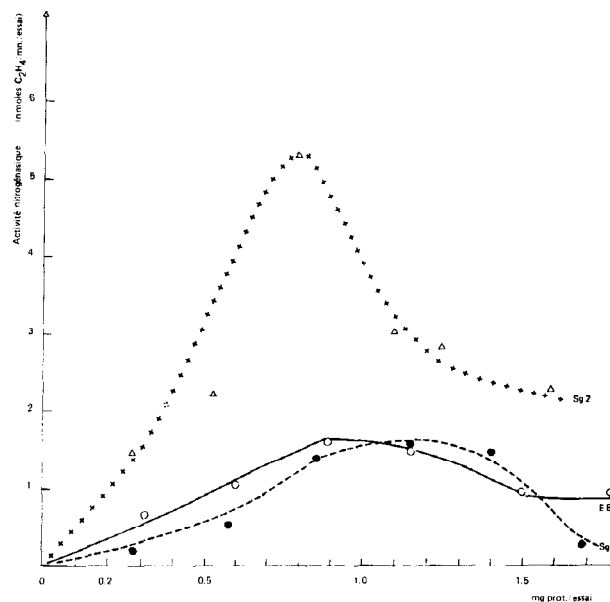


Fig. 5. — Influence de la concentration en protéine de l'extrait sur l'activité nitrogénasique.

TABLEAU IV  
Purification de Ab 1

Fractions	Volume (ml)	Protéines totales (mg)	Activité totale (UA)	Activité spécifique (nmoles/mg prot./mn)	Facteur de purification
Extrait brut.....	185	1 430	12 571	8,79	1
1 <sup>er</sup> DEAE-cellulose.....	165	118,9	7 806	6,0	6,1
Sephacryl S 300.....	51,0	13,17	1 049,4	79,68	9,49
2 <sup>e</sup> DEAE-cellulose.....	15,0	11,9	855	83,38	9,49
Sephadex G 100.....	17,0	2,9	618,5	214,0	23,3

avaient une activité nitrogénasique de 56,0 nmoles  $C_2H_4$ /mg prot./mn, après addition de Kp 2; elles contenaient donc Ab 1. Celles qui étaient recueillies avec 450 mM de NaCl contenaient Ab 2, avec une partie de Ab 1; leur activité nitrogénasique était de 7,2 nmoles  $C_2H_4$ /mg prot./mn sans complémentation.

#### Purification de Ab 1

Les résultats sont consignés dans le tableau IV. La technique utilisée pour purifier cette protéine donne un produit très actif. Les différentes fractions obtenues jusqu'au stade Sephadex G 100 sont de plus en plus actives, lors de la complémentation avec Kp 2, tandis que seules elles n'ont aucune activité.

#### Électrophorèse

La fraction obtenue à partir du Sephadex G 100 n'est pas entièrement pure, mais elle présente deux bandes majeures de mobilités électrophorétiques voisines de celles des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la nitrogénase de *Klebsiella pneumoniae* (Kp 1). Voir fig. 6.

Dans les canaux 2 et 11 on trouve une bande de forte intensité correspondant à une protéine X beaucoup plus abondante que les autres protéines dans l'extrait brut et en particulier que les protéines du complexe nitrogénasique qui sont difficiles à identifier sur gel dans un extrait brut.

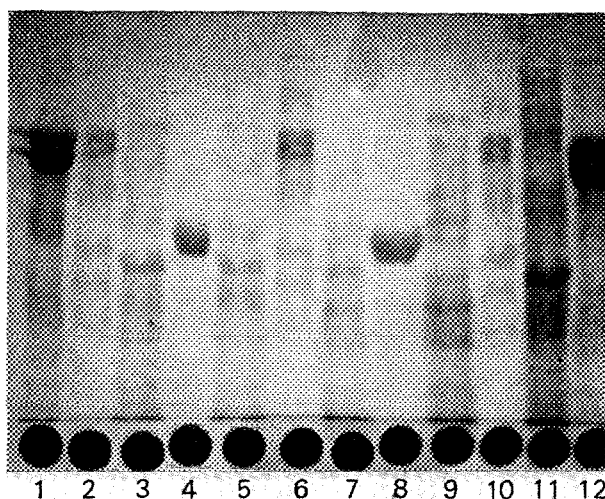


Fig. 6. — Mobilités électrophorétiques obtenues sur gel SDS à 10 % de polyacrylamide.

1 et 12.....	Kp 1 (20 µg)
2, 6 et 10.....	Ab 2 (5 µg)
4 et 8.....	Kp 2 (5 µg)
3 et 11.....	Extrait brut Sp 7 000 (5 et 40 µg respectivement)
5.....	Extrait brut Sp 7 201 (5 µg)
7.....	Extrait brut Sp 7 202 (5 µg)
9.....	Extrait brut Sp 7 203 (12 µg)

### 3. Discussion

L'activité nitrogénasique a été mesurée à 37 °C, et dans un mélange de 99 %  $N_2$  et 1 %  $O_2$ , en dérépression ou en croissance. Le résultat obtenu en croissance était de 106 nmoles  $C_2H_4$ /mg prot./mn, après 48 heures, alors que la valeur enregistrée après 5 heures de dérépression était de 160 nmoles  $C_2H_4$ /mg prot./mn. Des valeurs du même ordre avaient été obtenues par GAUTHIER (1978) en phase de croissance.

En étudiant l'activité nitrogénasique *in vitro*, nous avons observé qu'elle pouvait être augmentée par addition de Kp 2. On peut donc penser que la nitrogénase réductase des extraits bruts d'*Azospirillum brasilense* était en partie inactivée ou que la nitrogénase n'était pas saturée. L'addition de Kp 2 active permettait alors une complémentation avec Ab 1 et l'activité augmentait.

OKON *et al.* (1978), puis LUDDEN *et al.* (1978) avaient obtenu une augmentation appréciable de l'activité nitrogénasique des extraits bruts d'*Azo-*



*spirillum brasilense* en y ajoutant le facteur activant de *Rhodospirillum rubrum*, montrant ainsi qu'on avait chez le spirille un même type de régulation que chez *R. rubrum*. Pour CARITHERS *et al.* (1978), seule la forme R était sous la dépendance du facteur activant chez *R. rubrum*.

Nous avons observé que la nitrogénase d'*A. brasilense* n'était pas stable dans les cellules entières lors de la congélation dans l'azote liquide, mais qu'en revanche les extraits bruts de nitrogénase conservaient leur activité assez longtemps, quand on les congelait dans l'azote liquide. Il était donc préférable de ne congeler dans l'azote liquide que les extraits bruts et non les cellules entières. Après congélation des cellules entières, l'extrait redevenait actif quand on y ajoutait Kp 2. La nitrogénase réductase semblait donc inactivée par la congélation, tandis que la nitrogénase restait fonctionnelle dans ces conditions. OKON *et al.* (1978) avaient observé que les extraits bruts d'*A. brasilense* inactivés par congélation à  $-18^{\circ}\text{C}$ , redevenaient actifs après complémentation avec la nitrogénase réductase d'autres bactéries fixatrices, telles que *Bacillus polymyxa*, *Azotobacter vinelandii* ou *Rhodospirillum rubrum*.

*In vitro*, l'activité nitrogénasique d'*A. brasilense* est proportionnelle à la concentration de protéine dans l'essai jusqu'à une activité maximum

pour une concentration de 1 mg de protéine. Cette vitesse dépend, d'autre part, des concentrations de différents constituants du milieu réactionnel. Les valeurs trouvées pour ces concentrations ne sont pas différentes de celles données par OKON *et al.* (1978).

Nous avons purifié la nitrogénase (Ab 1). Le profil protéique observé sur gel SDS à 10 % de polyacrylamide indique qu'elle est composée de deux bandes, correspondant à des sous-unités, de masse moléculaire voisine de celle des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la nitrogénase de *Klebsiella pneumoniae*.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Département de Biochimie et de Génétique microbienne (Unité de Physiologie cellulaire) de l'Institut Pasteur, à Paris, de novembre 1977 à février 1980.

Je tiens à remercier M. le Professeur J.-P. AUBERT qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. J'exprime ma profonde gratitude au Dr J. HOUMARD, qui m'a guidé et initié à la biochimie de la fixation de l'azote. Mes sincères remerciements vont également à MM. H. GIRARD et D. BOGUSZ, ainsi qu'à tout le personnel du laboratoire, pour leur aide précieuse.

*Manuscrit reçu au Service des Éditions le 15 juin 1982*

## BIBLIOGRAPHIE

- CARITHERS (R. P.), YOCHE (D. C.), ARNON (D. I.), 1979. — Two forms of nitrogenase from the photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.*, 137 : 779-789.
- DAY (J. M.), DÖBEREINER (J.), 1976. — Physiological aspects of N<sub>2</sub> fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil. Biol. Biochem.*, 8 : 45-50.
- DE POLLI (H.), BOHLOOL (B. B.), DÖBEREINER (J.), 1980. — Serological differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host-plant specificity groups. *Arch. Microbiol.*, 126 : 217-222.
- EMERICH (D. W.), BURRIS (R. H.), 1978. — Complementary functioning component proteins of nitrogenase from several bacteria. *J. Bacteriol.* 134 : 936-943.
- GAUTHIER (D.), 1978. — Étude de la fixation de l'azote chez *Azospirillum brasilense*. Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Univ. Paris VII, 81 p.
- GAUTHIER (D.), ELMERICH (C.), 1977. — Relationship between glutamin synthetase and nitrogenase in *Spirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Letters*, 1 : 101-104.
- LAEMMLI (U. K.), 1970. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T 4. *Nature*, 227 : 680-685.
- LAKSHMI (K. M.), KAVIMANDAN (S. K.), SUBBA RAO (S. K.), 1976. — Occurrence of nitrogen-fixing *Spirillum* of rice, sorghum, maize and other plants. *Indian J. Exp. Biol.*, 14 : 638-639.
- LUDDEN (P. W.), BURRIS (R. H.), 1976. — Activating factor for the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, 194 : 424-426.
- LUDDEN (P. W.), BURRIS (R. H.), 1978. — Purification and properties of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and evidence for phosphate, ribose and adenine-like unit covalently bound to the iron protein. *Biochem. J.*, 175 : 251-259.
- LUDDEN (P. W.), BURRIS (R. H.), 1979. — Removal of an adenine-like molecule during activation of dinitrogen reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *PNAS*, 76 : 6 201-6 205.
- LUDDEN (P. W.), OKON (Y.), BURRIS (R. H.), 1978. — The nitrogenase system from *Spirillum lipoferum*. *Biochem. J.*, 173 : 1 001-1 003.
- NORDLUND (S.), ERIKSON (S.), BALTSCHIEFFSKY (H.), 1977. — Necessity of a membrane component for nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 462 : 187-195.
- NORDLUND (S.), ERIKSON (S.), BALTSCHIEFFSKY (H.), 1978. — Properties of the nitrogenase system from a photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 504 : 248-254.
- OKON (Y.), ALBRECHT (S. L.), BURRIS (R. H.), 1976. — Factors affecting growth and nitrogen-fixation of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, 127 : 1 248-1 254.
- OKON (Y.), HOUGHINS (J. P.), ALBRECHT (S. L.), BURRIS (R. H.), 1977. — Growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen and properties of its nitrogenase in cell-free extracts. *J. Gen. Microbiol.*, 98 : 87-93.
- PAPEN (H.), WERNER (D.), 1980. — Biphasic nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in long-lasting batch cultures. *Arch. Microbiol.*, 128 : 209-214.
- SCOTT (D. B.), SCOTT (C. A.), DÖBEREINER (J.), 1979. — Nitrogenase activity and nitrate respiration in *Azospirillum* spp. *Arch. Microbiol.*, 121 : 141-145.
- SEDMAN (J. J.), GROSSBERG (S. E.), 1977. — A sensitive titration method of protein by Coomassie blue G. 250. *Anal. Biochem.*, 79 : 544-549.
- TARRAND (J. J.), KRIEG (N.), DÖBEREINER (J.), 1978. — A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) Comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24 : 967-980.
- VON BULOW (J. W. F.), DÖBEREINER (J.), 1975. — Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 72 : 2 389-2 393.