La nitrogénase des Cyanobactéries : Comparaison de l'activité in vivo et in vitro des formes hétérocystées, homocystées et unicellulaires

> Pierre Adrien REYNAUD Laboratoire de Microbiologie du Sol, ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal.

RÉSUMÉ

Trois souches de Cyanobactéries: Anabaena 7120, Gloeocapsa 6909 et Plectonema 73110 sont utilisés pour comparer les trois modes possible de fixation d'azote: aérobiose avec hétérocystes, aérobiose avec des formes unicellulaires et en conditions microaérophile.

La comparaison a porté sur l'activité réductrice d'acétylène (A.R.A.) in vivo et in vitro et sur la solubilité de la pitrogénese

Les souches sont cultivées sur le milieu BG 11 sans azote minéral, gazé avec Ar-CO<sub>2</sub> (99-1) pendant 48 h. Après centrifugation, les extraits bruts sont préparés par suspension des cellules dans un tampon glycyl-glycine 0,1 m pH 7.4 (v/v) contenant 1 mM d'ATP et 0,9 mg/ml de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> cassage à la French Press (20000 p.s.i.) sous une stricte anaérobiose, puis conservation dans l'azote liquide.

Chacun des facteurs de la réaction in vitro de l'A.R.A. a été testé, puis utilisé à sa concentration optimale. On a noté une différence significative pour la concentration en dithionite (optimum à 5 mM pour A. 7120 et G. 6909, 10 mM pour P. 73110). Deux centrifugations préparatives successives ont montré une étroite relation entre la solubilité de l'enzyme chez A. 7120 et P. 73110.

Mots-clés: Cyanobactérie — Nitrogénase — Activité réductrice d'acétylène — Extraits bruts.

#### 1. INTRODUCTION

L'enzyme nitrogénase, responsable de l'activité fixatrice des procaryotes (Kleiner, 1975) est constituée de 2 ferroprotéines sulfurées sensibles à l'oxygène (Zumft et Mortenson, 1975). Il réduit N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub> mais aussi d'autres substrats possédant une triple liaison. En ABSTRACT

CYANOBACTERIA NITROGENASE: IN VIVO AND IN VITRO ACTIVITY FOR HETEROCYSTOUS, HOMOCYSTOUS AND UNICELLULAR FORMS.

Three strains of Cyanobacteria: Anabaena 7120, Gloeocapsa 6909 and Plectonema 73110, were used to compare the three possible patterns of N<sub>r</sub>fixation: aerobiose with heterocysts, aerobiose with unicellular forms and microarophylic conditions. Comparison was based on in vivo and in vitro acetylene reducing activity (A.R.A.) and solubility of nitrogenase.

Algae were grown in BC 11 medium free of combined nitrogen, bubbled with  $Ar\text{-CO}_2$  (99-1) for 48 h. After harvesting, extracts were prepared by suspending the cell concentrate in 0,1 M glyc-glyc buffer pH 7,4 (v/v) with ATP 1 mM,  $Na_2S_2O_4$  0,9 mg/ml; disrupted in a French Press (20 000 p.s.i.) under strict anaerobic conditions, then stored in liquid nitrogen.

Each factor of A.R.A. reaction in vitro was tested, then optimum concentrations were used: a significant difference was noted for dithionite (optimum 5 mM for A. 7120 and G. 6909, 10 mM for P. 73110). Two preparative centrifugations showed a close relation between A. 7120 and P. 73110 nitrogenase solubility.

KEY WORDS: Cyanobacteria — Nitrogenase — Acetylene reducing activity — Crude extracts.

particulier, la réduction de l'acétylène en éthylène, facilement dosable par chromatographie en phase gazeuse, sert à mesurer l'activité de l'enzyme (Dilworth, 1966).

Chez les Cyanobactéries, il est maintenant certain que les trois grands groupes morphologiques (formes unicellulaires, formes filamenteuses sans hétérocystes, formes filamenteuses avec hétérocystes) possèdent des espèces fixatrices d'azote (Stewart, 1977). Les seules différences portent sur leur comportement vis-à-vis de l'oxygène dégagé par la photosynthèse (Stanier, 1974). On peut distinguer une activité fixatrice aérobie soit par les formes hétérocystées (Fogg, 1949) soit par des formes unicellulaires (Wyatt et Silvey, 1969) et une activité en microaérophilie chez des formes homocystées (Stewart et Lex, 1970).

Dans ce travail sont comparées les conditions optimales de fixation d'azote in vivo et in vitro déterminées pour trois souches représentant chacun de ces groupes : Anabaena sp. (hétérocystée), Gloeocapsa sp. (unicellulaire), Plectonema boryanum (homocystée).

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE

Les trois souches de Cyanobactéries étudiées proviennent de la collection du Professeur R.Y. Stanier (Institut Pasteur, Paris). Ce sont : Anabaena sp. 7120, Plectonema boryanum 73110, Gloeocapsa sp. 6909 (LB. 795).

Ces souches ont été cultivées en flacon de 10 1 et en conditions axéniques suivant la technique décrite par Reynaud (1977). Des mesures régulières de la densité optique et de l'activité nitrogénasique ont été effectuées pendant toute la durée de la phase exponentielle de croissance sur milieu BG 11 de Allen et Stanier (1968) où l'on supprime le nitrate, seule source d'azote (BG 110). Les cellules sont gazées par un mélange air-CO<sub>2</sub> (99-1; v/v) et agitées continuellement. En fin de phase exponentielle le gazage est effectué par un mélange Argon-CO<sub>2</sub> (99-1; v/v) afin de déréprimer l'activité nitrogénasique. Après 48 heures d'anaérobiose les cellules sont centrifugées en continu avec un dispositif KSB-SORVAL RC2-B à 10 800 × g.

Dans le cas particulier de *Plectonema boryanum* incapable d'utiliser l'azote moléculaire en aérobiose, 1 l de culture sur milieu BC 11 sert à inoculer un flacon de 10 l de milieu BC 11 limité en nitrate (10 % de la concentration normale). A la fin de la phase exponentielle de croissance, la culture est centrifugée stérilement et le culot resuspendu dans 1 l de milieu BC 110, puis, gazée 4 jours avec le mélange Argon/CO<sub>2</sub> (99-1 v/v).

#### 2.2. Préparation et conservation des extraits bruts

Les culots provenant de la centrifugation des cultures sont préparés suivant une technique précédemment décrite (Reynaud, 1977). Les extraits bruts sont déposés goutte à goutte dans l'azote liquide (—180°C) où ils

se congèlent en formant de petites billes facilement manipulables par la suite. Les billes sont stockées dans des tubes à vis en polypropylène dans un réservoir d'azote liquide (Cryenco) ou sous atmosphère d'azote à — 25 °C.

Dans ces conditions l'activité nitrogénasique des extraits bruts reste constante pendant au moins 6 mois. Les mesures d'activité nitrogénasique s'effectuent sur les extraits décongelés et placés sous argon à la température du laboratoire. On n'observe pas alors de perte d'activité pendant les 3 heures suivantes.

#### 2.3. Mesure de l'activité nitrogénasique

L'activité nitrogénasique in vivo et in vitro est déterminée par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène.

Mesures in vivo. Un échantillon (7 ml) provenant de la culture en flacon de 10 l, prélevé stérilement est déposé dans une fiole pour culture de tissus de 40 ml (Flacon Plastics, Division of Bio Quest, BD, Los Angeles, USA). La turbidité est comprise entre 80 et 160 unités Klett à 650 nm (Colorimètre Klett-Summerson: Arthur Thomas Company, Philadelphia, USA). Les fioles sont gazées pendant 1 mn avec de l'Argon N50 puis fermées dans le courant d'argon avec des bouchons à vis à opercule en caoutchouc. L'expérience commence par l'injection de 3,3 ml d'acétylène N25, soit 1/10 du volume gazeux. Les fioles sont placées sur un agitateur à mouvement rectiligne alternatif (75 myts par mn; model G2, New Brunswick Scientific Co. Inc) sous un éclairage de 2 000 lux dispensé par lampes circulaires froides (OSRAM. L. 22 w/25 C white). Toutes les 10 mn un échantillon gazeux (0,5 ml) est prélevé.

Mesures in vitro. Pour obtenir une activité nitrogénasique avec les extraits bruts, il faut fournir : MgCl<sub>2</sub>, un réducteur puissant, un système régénérateur d'ATP. Les concentrations des constituants nécessaires à la réaction sont celles utilisées par Eady et coll. (1972) en début d'expérience et ont ensuite été progressivement optimisées. Les conditions de la réaction et le dosage de l'activité nitrogénasique par chromatographie en phase gazeuse ont été décrites par ailleurs (Reynaud, 1977).

L'activité spécifique est exprimée en nanomoles d'éthylène formé par minute et par milligramme de protéine. Les protéines sont mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteau (Lowry et coll., 1951).

### 2.4. Produits utilisés

Les différents sels utilisés pour l'élaboration des milieux, MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, sont des produits

Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Biol., vol. XIII, nº 2, 1978: 143-155.

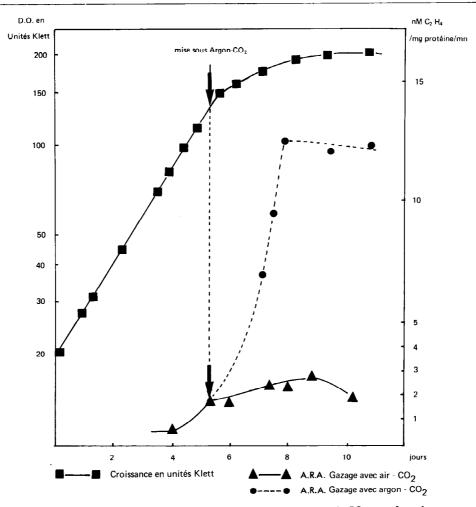


Fig. 1. — Croissance et activité nitrogénasique (A.R.A.) pendant le gazage avec air-CO<sub>2</sub>, pendant le gazage avec argon-CO<sub>2</sub>, chez *Anabaena* 7120 sur le milieu BG 110.

Merck. La créatine phosphate et la créatine phosphokinase (EC 2.7.3.2.) sont des produits Boehringer. L'adénosine triphosphate (ATP) est un produit Fould-Springer, l'acide 3-(N-2-hydroxyéthyl pipérazine-N'-yl) éthane sulfonique (HEPES), un produit SIGMA.

## 3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

## 3.1. ACTIVITÉ NITROGÉNASIQUE in vivo

## 3.1.1. Aspect microscopique des souches étudiées

L'absence d'azote minéral dans le milieu se traduit par certaines modifications morphologiques des souches (planche I):

Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Biol., vol. XIII, nº 2, 1978: 143-155.

On notera chez Anabaena 7120 la formation d'hetérocystes (1 b) qui constituent alors 5 % de la population cellulaire. De Vasconcelos et Fay (1974) signalent dans les cellules végétatives une accumulation de lipides et glycogène. Chez Plectonema 73110 (photo 2 a, 2 b) il n'existe pas de différentiation cellulaire, par contre les cellules sont de plus grande taille sur milieu sans nitrate. On observera chez Gloecapsa 6909 (3 a, 3 b) l'importance prise dans ce cas par la gaine à feuillets multiples.

## 3.1.2. Dérépression de l'activité nitrogénasique sous Argon chez A. 7120 et G. 6909.

Les figures 1 et 2 représentent l'activité fixatrice et la croissance d'Anabaena 7120 et de Gloeocupsa 6909 cultivées sur milieu BG 110 à 25 °C avec un éclaire-

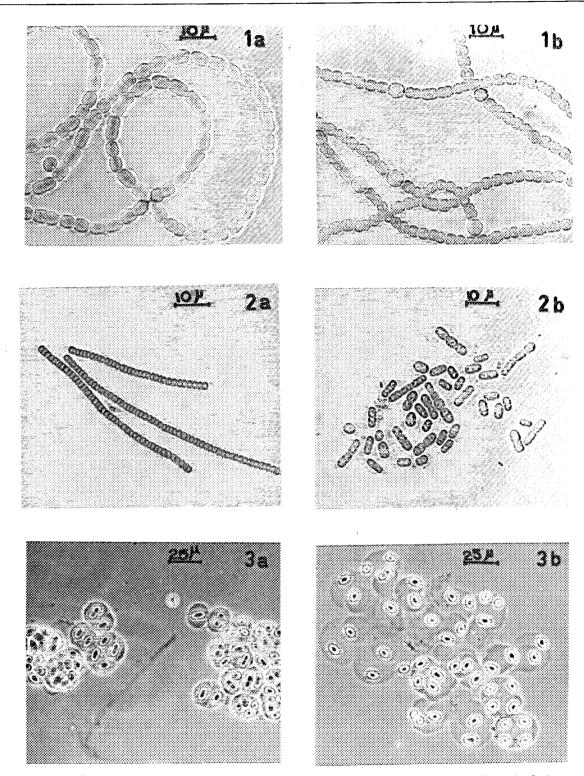


PLANCHE I. — Les photos de gauche représentent les 3 souches poussant sur milieu BG 11; les photos de droite représentent les 3 souches poussant sur milieu BG 11 sans nitrate en fin de phase exponentielle de croissance. 1 a, 1 b : A. 7120; 2 a, 2 b : P. 73 110; 3 a, 3 b : G. 6909.

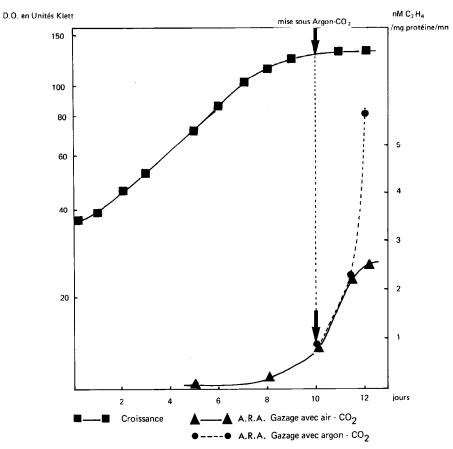


Fig. 2. — Croissance et activité nitrogénasique (A.R.A.) pendant le gazage avec air-CO<sub>2</sub>, pendant le gazage avec argon-CO<sub>2</sub>, chez Gloeocapsa 6909.

ment dont l'intensité est progressivement augmentée en fonction de la densité optique de la culture.

Le temps de doublement est de 108 h pour G. 6909 et de 48 h pour A. 7120. Sur BG 11 ces temps sont respectivement de 106 h et de 13 h. L'activité réductrice faible pendant toute la phase de croissance exponentielle augmente à la fin de celle-ci alors que le pourcentage d'hétérocystes reste constant (Bradley et Carr, 1976).

Le gazage en fin de croissance par un mélange argon-CO<sub>2</sub> (99-1, v/v) augmente considérablement l'activité nitrogénasique. Ce gazage évite la formation d'un pool intracellulaire de composés azotés ce qui permet une dérépression continue de la synthèse de la nitrogénase (Neilson et coll., 1971). Chez G. 9609, lorsque la culture vieillit, ce gazage permet également de limiter l'effet de l'accroissement du dégagement d'O<sub>2</sub> résultant d'une augmentation de la concentration en pigments photosynthétiques (Gallon et coll., 1974).

Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Biol., vol. XIII, nº 2, 1978: 143-155.

## 3.1.3. Induction de l'activité nitrogénasique chez Plectonema 73110

Sur BG 11 limité en nitrate, la culture est gazée par le mélange Ar-CO<sub>2</sub> en fin de phase exponentielle comme pour les deux autres souches. Après une latence de 40 heures une activité nitrogénasique très importante (jusqu'à 25 nm C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>) se développe en 48 h puis diminue rapidement. Cette diminution pourrait s'expliquer par un épuisement des substrats stockés ou par une alternance dans le temps des réactions de photosynthèse et de fixation d'azote comme le suggèrent Weare et Benemann (1974).

#### 3.2. Conditions de réduction de l'acétylène in vitro

Le tableau I confirme la nécessité d'ajouter aux extraits bruts de l'ATP, du dithionite et du MgCl<sub>2</sub>. Nous examinerons successivement les variations de cette

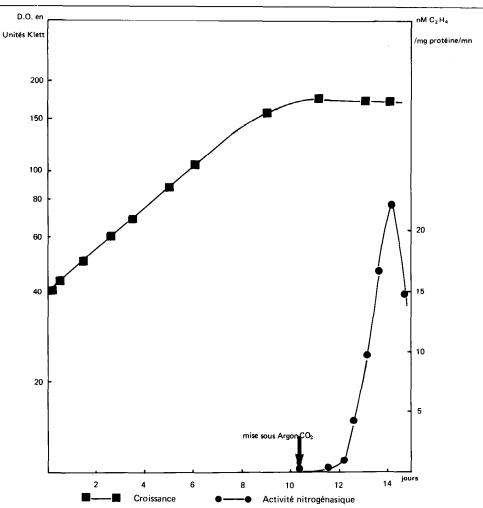


Fig. 3. — Croissance sur milieu BG<sub>11</sub> et activité nitrogénasique chez *Plectonema* 73110 lorsque cette souche est repiquée sur milieu BG 110 et gazée avec argon-CO<sub>2</sub>.

TABLEAU I

Mise en évidence des réactifs nécessaires à la réduction de l'acétylène par la nitrogénase dans les extraits bruts des 3 Cyanobactéries étudiés.

Pour un volume total 1,5 ml le mélange complet est composé de 20 μm MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 8 μm Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 8 μm ATP, 12,4 μm créatinephosphate, 0,2 mg de créatine phosphokinase, 40 μm HEPES à pH 7,4, 3 mg de protéines et de la quantité d'eau désaérée suffisante.

	Anabana 7120		Plectonema 73110		Gloeocapsa 6909	
	Act. spéc.	%	Act. spéc.	%	Act. spec.	%
Mélange réactionnel complet	0,410	100	2,71	100	3,55	100
Sans extraits bruts	0	0	0 .	0	0	0
Sans ATP	0,005	1,25	0,16	6	0	0
Sans – créatine kinase – créatine phosphate	0	0	0	0	0	0
Sans dithionite	0,011	2,75	0,56	20	0,24	6,7
Sans MgCl <sub>2</sub>	0,035	8,50	0,17	6,5	0,05	1,4

activité en fonction de la concentrations de ces éléments et du pH, facteur essentiel de la réaction.

## 3.2.1. pH optimum de l'activité nitrogénasique dans les extraits bruts.

Les résultats de la fig. 4 a complètent ceux obtenus par Bothe (1970). Ils montrent que le pH optimum est voisin de 7,2 dans le tampon HEPES 26,6 mM.

#### 3.2.2. Influence de la concentration en dithionite

La figure 4 b montre que la concentration optimale en  $Na_2S_2O_4$  pour A. 7120 et G. 6909 est de 5 mM. Ces résultats sont en accord avec ceux de Haystead et Stewart (1972) et Gallon et coll. (1972). Avec l'extrait de P. 73110 l'activité maximale est obtenue avec une concentration de 10 mM. On notera que cette concentration inhibe à 30 % l'activité nitrogénasique des deux autres souches. La concentration de 10 mM sera employée pour optimiser l'activité de P. 73110.

## 3.2.3. Influence de la concentration en MgCl<sub>2</sub>

Chez les trois souches l'activité nitrogénasique maximale est obtenue pour une concentration de 10 mM de Mg<sup>2+</sup> (fig. 4 c). Aux fortes concentrations (+ de 30 mM) nous observons, en accord avec Sorger (1969), une diminution de l'activité qui pourrait résulter d'une modification des interactions entre les polymères de la nitrogénase (Burns et Hardy, 1975).

#### 3.2.4. Influence de la concentration en ATP

Dans le mélange réactionnel les concentrations du système régénérateur d'ATP restent constantes, et seule la concentration en ATP varie. La figure 4 d indique un optimum vers 5 mM. Une inhibition de 50 % de l'activité est observée avec 8 mM d'ATP.

Il existe un rapport entre les concentrations optimales en Mg<sup>2+</sup> et en ATP. Pour Burns (1969), il est de 0,5 chez Azotobacter; chez Anabaena cylindrica il est de 0,75 à 1,25 pour Bothe (1970) et de 1 à 1,5 pour Haystead et Stewart (1972). Les rapports Mg<sup>2+</sup>/ATP que nous avons déterminés sont un peu supérieurs à ces valeurs: A. 7120: 1,66; P. 73110: 1,8; G. 6909: 1,5.

## 3.2.5. Influence de la concentration en créatine phosphate

En présence de 0,2 mg/ml de créatine phosphokinase et de la concentration optimale en ATP, la concentration optimale en créatine phosphate est de 8 mM (fig. 4 e). Une légère inhibition est observée chez les 3 Cyanobacteries au-delà de 13 mM.

### 3.2.6. Influence de la concentration en extraits bruts

L'activité réductrice exprimée en mM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> formé par mn est proportionnelle à la quantité d'extrait exprimée en mg de protéine par ml entre l et 4,5 mg (fig. 4 f). On retrouve chez les trois Cyanobactéries deux caractéristiques communes:

- Un effet de dilution: l'activité spécifique est plus faible au-dessous de 1 mg de protéines par ml. Sorger (1971) a constaté le même effet chez Azotobacter vinelandii. Il a émis l'hypothèse que les 2 protéines sont facilement dissociables à de faibles concentrations; or la protéine ferrique est très sensible à l'oxygène et une contamination même faible pendant les manipulations pourrait expliquer cette perte d'activité. Burns et Hardy (1975) suppriment cet effet en ajoutant de la protéine ferrique purifiée.
- Un effet inhibiteur aux concentrations en protéines supérieures à 5-7 mg: Eady et Postgate (1974) l'observent lorsque le rapport molaire Mo-Fe-protéine/Fe-protéine est supérieur à 2.

Au tableau II sont regroupés les concentrations optimales des cofacteurs de la réduction de l'acétylène dans les extraits bruts des trois Cyanobactéries. Chez P. 73110 fixateur seulement en microaérophilie, la concentration optimale en dithionite est double de celle qui est nécessaire pour les deux autres algues.

L'activité mesurée in vitro après optimisation représente en moyenne 30 % de l'activité spécifique in vivo juste avant le cassage pour A. 7120, 76 % pour P. 73110 et 95 % pour G. 6909. La perte d'activité importante observée chez A. 7120 semble due au fait que la nitrogénase, après le cassage des hétérocystes n'est plus protégée contre l'oxygène.

Tableau II trations optimales des co-facteurs nécessa

Concentrations optimales des co-facteurs nécessaires à la réduction de l'acétylène dans les extraits bruts des 3 Cyanobactéries et caractéristiques cinétiques.

	Anabaena 7120	Plectonema 73110	Gloeocapsa 6909
pH Tampon mM MgCl <sub>2</sub> mM ATP mM Créatine kinase mg/ml Créatine phosphate mM Dithionite mM Protéines mg/ml	7,2 Hepes 26,6 10 5 0,2 8 5 2-7	7,2 Hepes 26,6 10 5 0,2 8 10 1-5 0,0115	7,2 Hepes 26,6 10 5 0,2 8 5 1-4,5 0,102
Km (atmosphère (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ) Vm : nM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mn/mg	0,0094 2,32	5,50	3,33

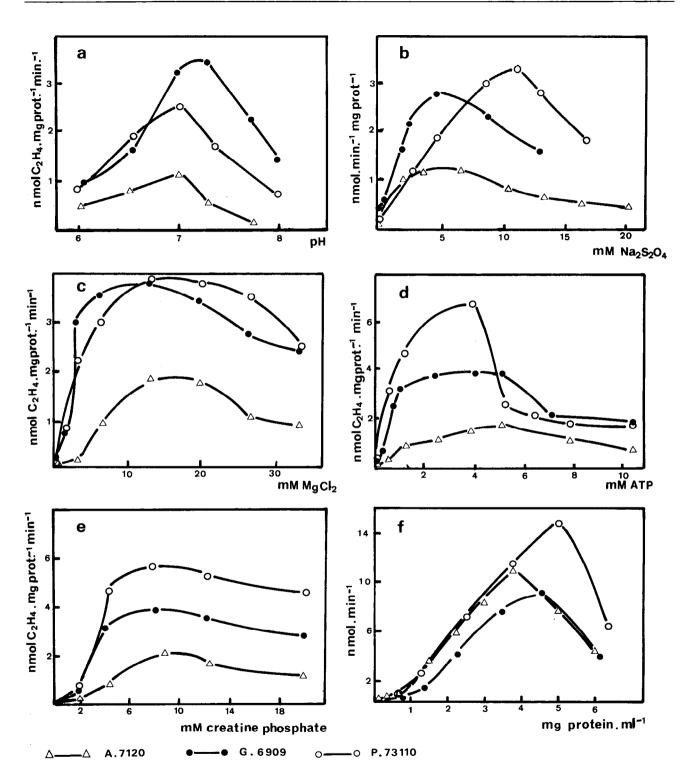


Fig. 4. — Influence des facteurs de la réaction sur l'activité nitrogénasique des extraits bruts des trois Cyanobactéries : A. 7120, G. 6909, P. 73110.

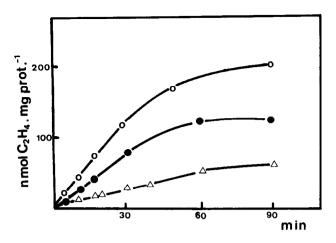


Fig. 5. — Influence du temps de réaction sur l'activité nitrogénasique (nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> formées par mg de protéine) dans les extraits bruts des 3 Cyanobactéries.

# 3.3. CARACTÉRISTIQUES CINÉTIQUES DE L'ACTIVITÉ DE LA NITROGÉNASE DANS LES EXTRAITS BRUTS

## 3.3.1. Influence de la durée de la réaction

La figure 5 montre que la vitesse de la réaction est constante pendant 30 mn. Les résultats rapportés dans cette étude ont été obtenus après 15 mn d'incubation; ils correspondent donc à une vitesse initiale (vi) constante.

#### 3.3.2. Influence de la concentration en substrat

Les activités ont été mesurées sous une même pression quelle que soit la concentration en  $C_2H_2$ . La cinétique de l'activité nitrogénasique chez ces trois souches est de type michaélien.

Les Km déterminés sur la figure 6 par les coordonnées de Linewaer et Burk sont voisins de 0,01 atmosphère d'acétylène (tabl. II). Ces valeurs sont semblables à celles de C. pasteurianum (Schollhorn et Burris, 1967) et A. vinelandii (Rivera-Ortis et Burris, 1975) mais différentes de celles de K. pneumoniae: 0,04 (Parejko et Wilson, 1971), Gloeocapsa: 0,0035 (Gallon et coll., 1972), A. cylindrica et P. boryanum 0,02 et 0,06 respectivement (Haystead et coll., 1970).

Le Km pour l'acétylène dépendant du rapport Mo-Fe-protéine/Fe-protéine (Shah et coll., 1975). un Km observé relativement élevé pourrait traduire un rapport optimum entre les deux protéines lorsque les conditions optimales de réaction sont réalisées dans les extraits bruts de ces trois Cyanobactéries.

La représentation de Hill (fig. 7) détermine un nombre de Hill voisin de 1, confirmant l'hypothèse qu'il n'y a qu'un site de fixation pour l'acétylène par molécule de nitrogénase.

#### 3.4. ETAT DE L'ENZYME DANS LES EXTRAITS BRUTS

Nous avons cherché à déterminer l'état de l'enzyme (soluble ou particulée) après un cassage des cellules à la French Cell Press à 20 000 p.s.i. Pour cela nous avons soumis les extraits bruts à deux centrifugations successives. L'activité nitrogénasique des culots est mesurée après resuspension dans un volume de tampon glycyl-glycine 0,1 M·pH = 7,4, égal au volume du surnageant.

Après une première centrifugation à 40 000 g on constate que, quelle que soit la souche, la presque totalité de l'activité nitrogénasique est retrouvée dans le surnageant (tabl. III). Signalons que la nitrogénase de Gloeocapsa 6909 sédimente à 10 000 g après un cassage à 10 000 p.s.i. (Gallon et coll., 1972). Il est possible que la forte pression que nous utilisons ait permis de séparer totalement la nitrogénase des particules cellulaires de G. 6909.

Après centrifugation du surnageant, à 150 000 g pendant 4 h, en anaérobiose stricte, on peut séparer trois fractions:

— Une fraction supérieure jaune pâle ou incolore, dans laquelle on ne retrouve une faible activité que pour G. 6909.

TABLEAU III

Activité spécifique de la nitrogénase mesurée dans différentes fractions des extraits bruts.

(nanomoles C<sub>2</sub>H<sub>1</sub>, min<sup>-1</sup>, mg prot.<sup>-1</sup>).

	Anabaena	Plectonema	Gloeocapsa
	7120	73110	6909
Extraits bruts (cassage 20 000 p.s.i.)	2,7	2,9	3,8
Centrifugation: 40 000 x g x 20' Culot Sumageant	0,5	0,1	0
	5,1	5,01	3,8
Surnageant 40 000 x g x 20' centrifugé 150 000 x g x 4 h Fraction supérieure incolore Fraction très pigmentée Culot	0	0	0,15
	8,25	7,65	1,80
	0,40	0,35	0

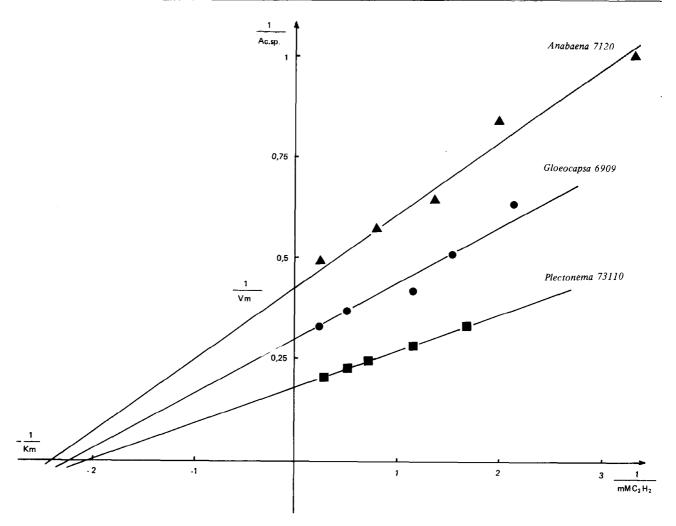


Fig. 6. — Activité nitrogénasique en coordonnées de Linewaer et Burck en fonction de la concentration en acétylène.

Ceci confirmerait que la nitrogénase de cette souche, avec ces conditions de cassage, ne soit plus liée à des particules cellulaires.

— Une fraction fortement pigmentée contenant les agrégats non dissociés de phycocyanine et de phycoérythine dont les poids moléculaire varient entre 180 000 et 360 000 (Glazer et Cohen-Bazire, 1971), possédant la plus grande partie de l'activité nitrogénasique. Comme nous l'avons signalé (Reynaud, 1977) ces poids moléculaires correspondent à ceux du complexe nitrogénase.

 Un culot dans lequel l'activité nitrogénasique est négligeable.

L'ensemble de ces résultats montre qu'avec les conditions d'extraction utilisées, aucune des trois nitrogénases étudiées n'est associées à des fractions membranaires de la cellule.

## 4. CONCLUSION

En choisissant trois Cyanobactéries correspondant chacune à une forme de fixation de l'azote, nous avons pu aborder plusieurs problèmes: l'induction de la synthèse de la nitrogénase, sa protection vis-à-vis de l'oxygène, son activité dans les extraits et son mode d'association intracellulaire. L'activité fixatrice des cultures est augmentée en privant les cultures d'azote, ce qui épuise le pool de composés azotés intracellulaire qui, in vivo, contrôle la synthèse de la nitrogénase (Ohmori et Hattori, 1974).

La conservation d'un haut niveau d'activité dans les extraits bruts est assurée par addition de 1 mM d'ATP

Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Biol., vol. XIII, nº 2, 1978: 143-155.

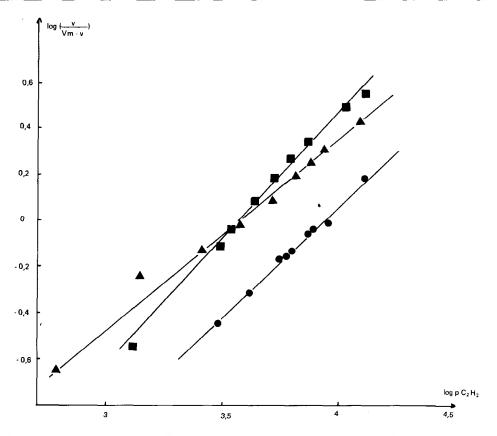


Fig. 7. — Transformation en coordonnées de Hill des coordonnées de Linewaer et Burck : A. 7120 : n=1,08; P. 73110 : n=0,95, G. 6909 : n=0,97.

et 0,9 g de dithionite par litre de suspension algale avant le cassage. Sans l'apport de ces deux constituants, le rapport entre activités in vivo et in vitro ne dépasse pas 0,1.

Le dithionite permet de conserver dans les extraits bruts un très bas potentiel rédox (Haystead et Stewart, 1972). L'adénosine triphophate, à une concentration millimolaire, forme un certain nombre de polymères de hauts poids moléculaires avec les sous-unités de la protéine ferrique de K. pneumoniae (Thorneley et Eady, 1973) ce qui diminue la sensibilité de l'enzyme à l'oxygène.

Les extraits bruts des trois souches de Cyanobactéries étudiées ont des propriétés similaires à celles observées dans les extraits bruts d'autres fixateurs d'azote (Hardy et Knight, 1967). Ils ont un besoin absolu d'ATP— co-facteur inhibiteur à de fortes concentrations (fig. 4 d)—, d'un bas potentiel d'oxydo-réduction, fourni artificiellement par le dithionite, d'ions Mg<sup>2+</sup> et de conditions anaérobies durant la préparation et les essais.

En comparant les Vm de réduction de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> dans les extraits bruts (tabl. II) on constate que celle de A. 7120 est plus faible que celle de P. 73110, Haystead et coll. (1970) notent aussi une telle différence de Vm entre A. cylindrica et P. boryanum. Ceci pourrait traduire une grande complexité du système de fixation chez les fixateurs aérobies.

Si une concentration optimale en dithionite de 10 mM est significative de P. 73110 par rapport aux deux autres Cyanobactéries on peut l'utiliser comme critère de différenciation entre fixateurs d'azote aérobies et fixateurs en conditions microaérophile.

Les centrifugations différentielles ont permis de démontrer qu'avec la technique de cassage utilisée pour les trois Cyanobactéries la nitrogénase n'était pas associée à des fractions membranaires. L'activité retrouvée dans les culots chez A. 7120 et P. 73110 et non chez G. 6909, peut faire penser à un type d'association intracellulaire légèrement différent. La nitrogénase de A. 7120 et P. 73110 pourrait être associée à un vaste complexe protéique, comme l'hydrogénase d'A. cylin-

drica est associée aux lamelles photosynthétiques (Fujita et Myers, 1965) qui, au cours de la purification, se dissocierait plus ou moins facilement. Oppenheim et coll. (1970) ont montré que la solubilité de la nitrogénase chez A. vinelandii dépendait du moyen de rupture. Gallon et coll. (1972) trouvent après un cassage à 10 000 p.s.i. que la nitrogénase de Gloeocapsa sp. est particulaire. Nos propres expériences ont montré que la nitrogénase de G. 6909 cassée à 20 000 p.s.i., était totalement soluble: chez cette Cyanobactérie la nitrogénase serait liée aux structures membranaires de façon telle qu'un processus de rupture puissant l'en dissocierait totalement.

Malgré la diversité des procaryotes fixateurs d'azote, cette étude confirme l'hypothèse suivant laquelle on se trouve sans doute en présence d'un système dont l'évolution est identique pour la plupart des espèces.

Pour corroborer cette hypothèse on doit envisager la purification de la nitrogénase chez les trois types de Cyanobactéries fixatrices, l'isolement des deux protéines constitutives et l'étude de leur composition en acides aminés qui permettra de préciser le degré de liaison par rapport au « common ancestor » (Kleiner et coll., 1976).

#### REMERCIEMENTS.

Je remercie M. le Professeur R.Y. Stanier ainsi que le personnel du laboratoire de physiologie microbienne de l'Institut Pasteur qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM le 7 juillet 1978.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- ALLEN (M.M.), STANIER (R.Y.), 1968. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. J. gén. Microbiol. 51: 203-209.
- BOTHE (H.), 1970. Photosynthetische Stiskstoffixierung mit einem zellfreien Extract aus der Blaualge Anabaena cylindrica. Ber. dt. bot. Ges. 83: 421-432.
- Bradley (S.), CARR (N.G.), 1976. Heterocyst and Nitrogenase Development in Anabaena cylindrica. J. Gen. Microbiol. 96: 175-184.
- Burns (R.C.), 1969. The nitrogenase system from *Azotobacter*. Activation energy and divalent cation requirement. *Bioch. Bioph. Acta.* 171: 253-259.
- Burns (R.C.), Hardy (R.W.F.), 1975. Azotobacter nitrogenase: ATP kinétics and inhibition by high ionic strength. in « Nitrogen fixation by free-living microorganisms » W.D.P. Stewart ed., I.B.P. 6: 437-446.

- DILWORTH (M. J.), 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim*. *Biophys*. *Acta*, 127: 285-294.
- EADY (R.R.), SMITH (B.), COOK (K.A.) and POSTGATE (J.R.), 1972. Nitrogenase of Klebsiella pneumoniae. Biochemical Journal, 128: 655-675.
- EADY (R. R.), POSTGATE (J. R.), 1974. Nitrogenase. Nature - 249, 5460: 805-810.
- Fogg (G.E.), 1949. Growth and heterocyst production in Anabaena cylindrica Lemm. II. in relation to carbon and nitrogen metabolism. Ann. Bot., N.S. 13: 241-259.
- FUJITA (Y.), MYERS (J.), 1965. Hydrogenase and NADP-reduction by a cell-free preparation of Anabaena cylindrica. Arch. Biochem. Biophys., 113: 730-737.
- GALLON (J. R.), LARUE (T.A.), KURZ (W.G.W.), 1972. Characteristics of nitrogenase activity in broken cell preparations of the blue-green alga Gloeocapsa sp. LB 795. Can. J. Microbiol., 18: 327-332.
- Gallon (J.R.), Larue (T.A.), Kurz (W.G.W.), 1974. Photosynthesis and nitrogenase activity in the bluegreen alga Gloeocapsa. Can. J. Microbiol., 20: 1633-1637.
- GLAZER (A.N.), COHEN-BAZIRE (G.), 1971. Subunit structure of the phycobiliprotéins of blue-green algae. *Proc. nat. Acad. Sci.*, USA, 68: 1398-1401.
- HARDY (R.W.F.), KNIGHT (J.R.E.), 1967. ATP-dependant reduction of azide and HCN by N<sub>2</sub>-fixing enzymes of Azotobacter vinelandii and Clostridium pasteurianum. Biochem. Biophys. Acta, 139: 69-90.
- HAYSTEAD (A.), ROBINSON (R.), STEWART (W.D.P.), 1970.
   Nitrogenase activity in extracts of heterocystous and non-heterocystous blue-green-algae. Arch. Mikrobiol., 75: 235-248.
- HAYSTEAD (A.), STEWART (W.D.P.), 1972. Characteristics of the nitrogenase system from the blue-green alga Anabaena cylindrica. Arch. Mikrobiol., 82: 325-336.
- KLEINER (D.), 1975. Fixation of Atmospheric Nitrogen by Microorganisms. Angew. Chem. Internat. Edit., 14-2: 80-86.
- KLEINER (D.), LITTKE (W.), BENDER (H.), WALLENFELS (K.), 1966. Possible Evolutionary Relationships of the Nitrogenase Proteins. J. Md. Evol., 7: 159-165.
- LOWRY (O.H.), ROSENBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), RANDALL (R.J.), 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

- Neilson (A.), Rippka (R.), Kunisawa (R.), 1971. Heterocyst-Formation and Nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp. A. Kinetic Study. *Arch. Mikrobiol.*, 76: 139-150.
- OHMORI (M.), HATTORI (A.), 1974. Effect of ammonia on nitrogen fixation by the blue-green alga Anabaena cylindrica. Plant and Cell Physiol., 15 (1): 131-142.
- OPPENHEIM (J.), FISHER (M.J.), WILSON (P.W.), MARCUS (L.), 1970. Properties of a soluble nitrogenase in Azotobacter. J. of Bact., 1: 292-296.
- PAREJKO (R.A.), WILSON (P.W.), 1971. Kinetic studies on Klebsiella pneumoniae nitrogenase. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 68, 9: 2016-2018.
- REYNAUD (P.), 1977. Purification de l'Enzyme Nitrogénase d'Anabaena sp., Cah. ORSTOM, sér. Biol., vol. XII, n° 2: 109-116.
- RIVERA-ORTIZ (J.M.), BURRIS (R.H.), 1975. Interactions among Substrates and Inhibitors of Nitrogenase. J. Bact., 123-2: 537-545.
- Schollhorn (R.), Burris (R.H.), 1967. Reduction of azide by the N<sub>2</sub>- fixing enzyme system. *Proc. Natn. Acad. Sci.*, USA, 57: 1317-1323.
- Shah (V.K.), Davis (L.C.), Brill (W.J.), 1975. Nitrogenase. VI. Acetylene reduction assay: dependence of nitrogen fixation estimates on component ratio and acetylene concentration. *Biochem. Biophys. Acta*, 384: 353-359.
- Sorger (G.J.), 1969. Regulation of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii* sp.: the role of nitrate reductase. *J. Bacteriol.*, 98: 56-61.

- Sorger (G.L.), 1971. Effect of nitrogenase components from mutants and wild-type strains of *Azotobacter* on the dilution effect of nitrogenase. *Biochem. J.*, 122: 305-309.
- STANIER (R.Y.), 1974. The relationships between nitrogen fixation and photosynthesis. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 52 (1): 3-20.
- STEWART (W.D.P.), Lex (M.), 1970. Nitrogenase activity in the blue-green alga *Plectonema boryanum* strain 594. *Arch. Mikrobiol.*, 73: 250-260.
- Stewart (W.D.P.), 1977. Blue-green Algae. in "a treatise on dinitrogen fixation" Sec. III edit. R.W.F. Hardy, W.S. Silver, a Wiley-Interscience publication, 3: 63-123.
- THORNELEY (R.N.F.), EADY (R.R.), 1973. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: evidence for an adenosine-triphosphate-induced association of the iron-sulphur protein. *Biochem. J.*, 133: 405-408.
- VASCONCELOS (L. de), FAY (P.), 1974. Nitrogen Metabolism and Ultrastructure in Anabaena cylindrica. I. The effect of nitrogen Starvation. Arch. Microbiol.. 96: 271-279.
- WEARE (N.M.), BENEMANN (J.R.), 1974. Nitrogenase Activity and Photosynthesis in *Plectonema borya-num. J. Bact.*, 119-1: 258-265.
- WYATT (J.T.), SILVEY (J.K.C.), 1969. Nitrogen fixation by Gloeocapsa. Science, N.Y., 165: 908-909.
- ZUMFT (W.G.), MORTENSON (L.E.), 1975. The nitrogenfixing complex of bacteria. *Biochim. Biophys. Act*, 416: 1-52.