

2 mil. 2951.7

Université de Montréal

Étude des déterminants structuraux de la fonction de NifF (flavodoxine) chez
Klebsiella pneumoniae

Par

Ilham Belhadj-kacem

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
maître ès (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Décembre, 2001

© Ilham Belhadj-kacem, 2001



w
4
U58
2002
v.052

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des déterminants structuraux de la fonction de NifF
(flavodoxine) chez *Klebsiella pneumoniae*

Présenté par :

Ilham Belhadj-kacem

À été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Directeur de recherche :	Dr Patrick c. Hallenbeck	_____
Président rapporteur :	Dr Marc Drolet	_____
Membre du jury :	Dr Pierre Belhumeur	_____
Mémoire accepté le :		_____

SOMMAIRE

La fixation biologique de l'azote est un processus métabolique important chez les organismes détenteurs d'une nitrogénase «les diazotrophes». La nitrogénase est l'enzyme clé pour la fixation de l'azote atmosphérique. Elle catalyse la conversion de N_2 en NH_3 .

Une des grandes questions de la fixation de l'azote concerne spécifiquement le transport des électrons vers la nitrogénase. Chez *Klebsiella pneumoniae*, la flavodoxine sert d'intermédiaire entre le pyruvate (source d'électrons) et la nitrogénase. *Klebsiella pneumoniae* est le principal modèle pour l'initiation des études détaillées sur les mécanismes moléculaires du transport d'électrons chez la nitrogénase. La flavodoxine est une protéine à bas potentiel rédox qui contient une flavine mononucléotide (FMN) comme cofacteur.

Ces travaux de recherche se concentrent sur l'étude de la flavodoxine (NifF) chez *Klebsiella pneumoniae*. Des études antérieures ont démontré la formation d'un complexe entre NifF et la FeP de la nitrogénase. Cependant, la spécificité d'interaction entre ces deux protéines reste inconnue.

Notre but de travail vise à créer des mutants au niveau du gène *nifF* en utilisant différentes techniques et méthodes d'analyse pour les caractériser. Le PCR est la première technique de base utilisée pour la création de ces mutants. Deux mutagénèses distinctes seront effectuées dans notre projet de recherche. Une mutagénèse au hasard au niveau du gène *nifF* nous permettra d'élucider les déterminants de la flavodoxine qui gouvernent la spécificité de la réduction de la nitrogénase.

D'autres études sur la flavodoxine chez *Azotobacter chroococcum* ont révélé la présence d'une boucle *nif*-spécifique, ainsi que son importance pour le transport des électrons vers la nitrogénase. Par conséquent, une deuxième mutagenèse sera utilisée dans ce projet de recherche. Il s'agit d'une mutagenèse dirigée qui permet l'élimination de la boucle *nif*-spécifique au niveau du gène *nifF* chez *Klebsiella pneumoniae*.

Dans la mutagenèse au hasard, on a utilisé deux types de PCR : le protocole standard de PCR avec la Taq polymérase et le PCR avec l'utilisation du MnCl₂. Cette partie se propose de comparer ces deux types de PCR, ainsi que la création et la caractérisation des mutants. La comparaison entre ces différents PCR nous a permis de retenir la meilleure méthode. Dans notre cas, le PCR avec la Taq polymérase seulement était la méthode privilégiée pour la création des souches mutées. Nous avons ensuite procédé à la sélection et à la caractérisation des mutants. Après le criblage, 24 souches possédant l'insert *nifF* ont été sélectionnées. La surexpression de la flavodoxine chez les souches sélectionnées nous a permis de vérifier la présence de cette protéine ainsi que l'état de son FMN. Alors, la protéine a été caractérisée par le gel de polyacrylamide et son FMN, par le spectrophotomètre. La technique du séquençage nous a permis de sélectionner trois souches mutantes, celles qui ont un minimum de mutation dans le gène *nifF* pour les études subséquentes.

Dans la mutagenèse dirigée, on a utilisé trois PCRs afin d'éliminer, chez *Klebsiella pneumoniae*, une boucle des acides aminés spécifiques aux flavodoxines NifF. Nous avons ensuite procédé au criblage et à la caractérisation des souches intéressantes. Le séquençage nous a permis de confirmer nos résultats pour la souche sélectionnée S2, c'est à dire l'élimination de la boucle *nif*-spécifique dans le gène *nifF* de cette souche. L'élimination de la boucle *nif*-spécifique réalisée dans ce

projet de recherche, ainsi que la combinaison d'approches biochimiques futures nous permettra de comprendre le rôle de cette boucle dans les interactions protéine-protéine.

Tous les mutants obtenus seront analysés subséquemment par des études biochimiques de la flavodoxine défective dans le but de connaître les déterminants responsables de l'interaction de NifF.

Mots-clés : flavodoxine, *Klebsiella pneumoniae*, nitrogénase, fixation de l'azote.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
DÉDICACE	xiv
REMERCIEMENTS.....	xv
REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. Métabolisme général de l'azote	2
1.1. Azote ammoniacal.....	2
1.2. GSI, GOGAT et GDH	3
2. Fixation de l'azote atmosphérique	3
2.1. Conditions de la fixation de l'azote	4
2.2. La nitrogénase	4
2.2.1. Cofacteurs de la nitrogénase	5
2.2.2. Transfert d'électrons chez la nitrogénase	6
2.2.3. Les autres substrats de la nitrogénase	8
3. Génétique et régulation de la fixation de l'azote	8
3.1. Organisation des gènes	8
3.2. L'expression des gènes <i>nif</i>	10
3.2.1 Mécanismes du contrôle.	10
3.2.1.1. Le système Ntr	10
3.2.1.2. NifA	11
3.2.2. L'expression du gène <i>nifF</i>	13
4. Le transport des électrons vers la dinitrogénase réductase	15
4.1. La pyruvate : flavodoxine oxydoréductase (POR).....	15
4.2. Les protéines réductrices de la nitrogénase	16

4.3. Structures et fonctions de la flavodoxine.....	19
5. L'importance de la fixation de l'azote	25
MATÉRIEL ET MÉTHODES	28
1. Souches bactériennes	29
2. Milieux de cultures et antibiotiques utilisés	30
2.1. Milieux de cultures	30
2.2. Les antibiotiques	31
3. PCR.....	31
3.1. Principe	31
3.2. Réactifs utilisés	32
3.3. PCR mutagénique aléatoire.....	32
3.3.1. Les conditions d'amplifications.....	32
3.3.1.1. Détermination de la concentration de $MgCl_2$ nécessaire ...	33
3.3.1.2. Détermination de la concentration d'ADN plasmidique optimale.....	33
3.3.2. Protocole utilisé.	34
3.3.2.1. Protocole mutagénique utilisant le $MnCl_2$	35
3.3.2.2. Protocole standard utilisant la Taq polymérase	36
3.4. PCR dirigée.....	37
3.4.1. Les conditions d'amplifications.....	37
3.4.1.1. ADN.....	38
3.4.1.2. $MgSO_4$	38
3.4.2. Protocole utilisé	38
3.4.2.1. PCR pour mutagénèse dirigée	41
3.4.2.1.1. PCR1 et PCR2	41
3.4.2.1.2. PCR3	43
4. Purification et ligation.....	44
4.1. Enzymes de restriction utilisées.....	44
4.2. Méthodes de purification	44
4.2.1. Purification après le PCR.....	44
4.2.2. Purification à partir du gel d'électrophorèse.....	44

4.2.3. Purification par l'extraction au phénol-chloroforme	45
4.3. Ligation	45
5. Transformation.....	45
6. Criblage des souches et les conditions de croissance	46
6.1. Selection des transformants	46
6.2. Conditions de croissance utilisées pour le criblage des souches mutantes	46
7. Isolement d'ADN plasmidique	47
7.1. Croissance bactérienne.....	47
7.2. Techniques d'extraction des plasmides	47
7.2.1. Extraction plasmidique selon la méthode de lyse alcaline	47
7.2.2. Extraction avec Qiagen	48
7.2.3. Extraction plasmidique spécifique à <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..	48
7.2.4. Extraction plasmidique par la méthode de lyse alcaline/traitement au PEG	49
7.2.5. Détermination de la concentration d'ADN plasmidique	49
8. Electrophorèse sur gel pour l'analyse de l'ADN plasmidique.....	50
8.1. Gel d'agarose	50
8.2. Témoins utilisés	50
9. Extraction des protéines.....	51
9.1. Conditions de croissance bactérienne et surexpression de NifF à petite échelle	51
9.2. L'extraction de la protéine	52
9.3. Dosage du contenu du FMN par la spectrophotométrie	52
9.4. Préparation du gel de polyacrylamide.....	52
9.5. Préparation de l'échantillon	53
9.6. Témoin utilisé	54
10. Séquençage	54
RÉSULTATS	56
A. MUTAGÉNÈSE ALÉATOIRE	57
1. Criblage des souches mutées issues du PCR avec MnCl ₂	57

2. Criblage des souches mutées issues du PCR standard.....	64
B. MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE.....	78
DISCUSSION	85
BIBLIOGRAPHIE	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : description des plasmides utilisées	29
Tableau II : description des souches bactériennes utilisées	30
Tableau III : oligonucléotides nécessaires à l'amplification des fragments d'ADN (<i>nifF</i>) pour le PCR mutagénique aléatoire	33
Tableau IV : réactions de PCR contenant différentes concentrations de MgCl ₂	34
Tableau V : réactions de PCR contenant différentes concentrations d'ADN	34
Tableau VI : PCR mutagénique avec l'utilisation du MnCl ₂	35
Tableau VII : PCR mutagénique avec le protocole standard	36
Tableau VIII : réactions de PCR contenant différentes concentrations de MgSO ₄	38
Tableau IX : oligonucléotides 4B et 4C nécessaires à l'élimination de la boucle <i>nif</i> -spécifique pour le PCR dirigé	39
Tableau X : produits utilisés pour PCR1 et PCR2	41
Tableau XI : produits utilisés pour PCR3	43
Tableau XII : oligonucléotides nécessaires au séquençage des fragments d'ADN d'intérêt	54
Tableau XIII : les souches sélectionnées du PCR avec la Taq	63
Tableau XIV : les souches sélectionnées par le spectrophotomètre	69

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les composantes de la nitrogénase.....	6
Figure 2. Organisation des gènes <i>nif</i> impliqués dans la fixation de l'azote chez <i>K. pneumoniae</i>	9
Figure 3. Le système d'activation des gènes <i>nif</i> chez <i>K. pneumoniae</i>	12
Figure 4. Carte génétique et physique de la région entourant le gène <i>nifF</i> chez <i>K. pneumoniae</i>	13
Figure 5. Séquence nucléotidique du gène <i>nifF</i> chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
Figure 6. Transport d'électrons du pyruvate à la nitrogénase	18
Figure 7. Présentation de quelques structures de flavodoxines	23
Figure 8. Alignement des acides aminés de la protéine NifF chez différentes espèces	24
Figure 9. Comparaison de la flavodoxine chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>anabeana sp</i>	25
Figure 10. Schéma illustrant le modèle moléculaire de l'interaction entre FeP et la flavodoxine	27
Figure 11. Profil du PCR (utilisation du $MnCl_2$).....	36
Figure 12. Profil du PCR (Taq polymérase seulement).....	37
Figure 13. PCRs utilisés pour l'élimination de la boucle <i>nif</i> -spécifique dans le gène <i>nifF</i>	40
Figure 14. Profil de l'amplification des sous-produits PCR1 (N-terminal) et PCR2 (C-terminal).....	42
Figure 15. Profil du PCR3	43
Figure 16. ADN plasmidique digéré (<i>HindIII</i> et <i>PstI</i>) chez les souches 21, 22, 23, 76, 77, 78, 87, 93, 94, 95 et 102.....	58
Figure 17. Quantification de la flavodoxine du témoin pGGK ₂ sans l'induction.....	60

Figure 18. Quantification de la flavodoxine du témoin pGGK ₃ sans l'induction.....	61
Figure 19. Quantification de la flavodoxine du témoin pGGK ₃ avec l'induction.....	62
Figure 20. Quantification de la flavodoxine de la souche S102 avec l'induction.....	63
Figure 21A. ADN plasmidique digéré (<i>Hind</i> III et <i>Pst</i> I) chez les souches 113, 118, 119, 125, 128, 131, 134 et 135	65
Figure 21B. ADN plasmidique digéré (<i>Hind</i> III et <i>Pst</i> I) chez les souches 130, 126 et 137.....	65
Figure 21C. ADN plasmidique digéré (<i>Hind</i> III et <i>Pst</i> I) chez les souches 120, 121, 122, 124, 129 et 136.....	66
Figure 21D. ADN plasmidique digéré (<i>Hind</i> III et <i>Pst</i> I) chez les souches 139 et 185.....	66
Figure 21E. ADN plasmidique digéré (<i>Hind</i> III et <i>Pst</i> I) chez les souches 145, 146, 147 et 148	67
Figure 22. Quantification de la flavodoxine de la souche S185 avec l'induction.....	68
Figure 23. Quantification de la flavodoxine de la souche S125 avec l'induction.....	69
Figure 24. Électrophorèse de la flavodoxine sur le gel de polyacrylamide chez le témoin K2 et chez les souches mutantes S125 et S185	71
Figure 25. Électrophorèse sur le gel de polyacrylamide des extraits bruts des souches mutantes S148, S137, S136, S134, S128, S125, S122, S121 et S120	72
Figure 26. Électrophorèse sur le gel de polyacrylamide des extraits bruts des souches mutantes S185, S102, S113, S118, S129 et S119.....	72
Figure 27. Comparaison des Séquences nucléotidiques du gène <i>nifF</i> chez <i>K. pneumoniae</i> et l'insert <i>nifF</i> chez pNifF185 (<i>nifF</i> pNifF185).....	73

Figure 28. Comparaison des Séquences nucléotidiques du gène <i>nifF</i> chez <i>K. pneumoniae</i> et l'insert <i>nifF</i> chez pNifF148 (<i>nifF</i> pNifF148)	74
Figure 29. Comparaison des Séquences nucléotidiques du gène <i>nifF</i> chez <i>K. pneumoniae</i> et l'insert <i>nifF</i> chez pNifF136 (<i>nifF</i> pNifF136)	75
Figure 30. Comparaison des Séquences nucléotidiques d'une partie du gène <i>nifF</i> chez <i>K. pneumoniae</i> et l'insert <i>nifF</i> chez pNifF113 (<i>nifF</i> pNifF113).....	76
Figure 31. Alignement de la séquence en acides aminés de la protéine NifF chez la souche sauvage et chez les mutants étudiés	77
Figure 32. Patron d'ADN chez le plasmide pNifF2 et les témoins (pGGK ₂ et pGGK ₃) digérés avec <i>Hind</i> III et <i>Pst</i> I	78
Figure 33. Cette séquence représente la portion du gène <i>nifF</i> (entre 261 et 318 paires de bases)	79
Figure 34. Profil de digestion du gène <i>nifF</i> avec <i>Hinf</i> I chez le plasmide pNifF2	80
Figure 35. Quantification de la flavodoxine chez la souche S2 avec l'induction.....	81
Figure 36. Électrophorèse de la flavodoxine sur gel-SDS chez les témoins K2, K3 et chez la souche mutante S2	82
Figure 37. Comparaison des Séquences nucléotidiques du gène <i>nifF</i> chez <i>K. pneumoniae</i> et l'insert <i>nifF</i> chez pNifF2	83
Figure 38. Comparaison des Séquences des acides aminés de la protéine NifF chez <i>K. pneumoniae</i> (Kpneu «sauvage») et de la protéine NifF chez pNifF2	84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
Ap	Ampicilline
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cytosine
°C	Degré centigrade
Cm	Chloramphénicol
Dnase	Désoxyribonucléase I
dNTP	Nucléosides triphosphates
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
FeP	Dinitrogénase réductase (protéine fer)
FMN	Flavine mononucléotide
G	Guanine
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (dioxane free)
kb	Kilopaires de bases
kDa	Kilodalton
LB	bouillon Luria-Bertani
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mn	Minutes
MoFeP	Dinitrogénase (protéine fer-molybdène)
mV	Millivolte
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
pb	Paire de base

p/v	Poids par volume
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEG	Glycol-polyéthylène
Rnases	Ribonucléase A
rpm	Tours par minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide
T	Thymine
TAE	Tris acétate
Taq	Polymérase ADN isolée de <i>Thermus aquaticus</i> YT1
TEMED	N, N, N'-tétra-méthyl éthylène-diamine
TNE	Tris, NaCl, Ethanol (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 50%Ethanol)
TRIS	Hydroxyl méthyl aminométhane
U	Unité
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire

DÉDICACE

À **Sami**, Nassim, Hiba et Sidi Mohammed.

REMERCIEMENTS

Mes plus grands remerciements, au docteur Patrick C. Hallenbeck qui m'a donné l'opportunité de travailler sur ce projet. Ma sincère reconnaissance pour sa disponibilité, son soutien, ainsi que ses encouragements durant cette recherche.

Je remercie sincèrement mes collègues au laboratoire, Sandra Akouamba, Jean-François Viger et le Dr Alexandre F. Yakunin pour leur aide qui a été très précieuse au cours de ce travail.

Je veux remercier spécialement, mon cher mari Sidi M. Krid, pour son support, sa compréhension et ses encouragements durant mes études.

À mes enfants, qui étaient toujours patients et compréhensifs durant mon absence du foyer familial, ma plus grande gratitude à mes petits amours.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Métabolisme général de l'azote

Tous les êtres vivants ont besoin des éléments de base permettant leur maintien. Parmi ces éléments essentiels, on trouve l'oxygène (O), l'hydrogène (H), le carbone, l'azote, le phosphore et le soufre. L'azote est nécessaire à la synthèse des acides aminés, des purines, des pyrimidines, de certains glucides et lipides, de quelques facteurs enzymatiques et d'autres substances. Les sources d'azote disponibles pour les micro-organismes peuvent être de simples composantes inorganiques telles que le N_2 et le nitrate ou des composés complexes comme les acides aminés ou les nucléosides. Les études approfondies sur les différentes entérobactéries, plus particulièrement *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes* ainsi que *Klebsiella pneumoniae*, nous ont permis d'acquérir des informations et des connaissances importantes sur le mécanisme de contrôle de l'assimilation de l'azote chez les bactéries (1, 2).

1.1. Azote ammoniacal

Les êtres vivants assimilent directement l'azote ammoniacal. L'ammoniaque peut être présent dans le milieu externe ou peut être produit par les réactions cataboliques. Par exemple, la dégradation des matières organiques ou la réduction du nitrate peuvent donner l'ammoniaque (3).

Deux systèmes enzymatiques sont utilisés par les entérobactéries pour assimiler l'azote ammoniacal : la glutamine synthétase (GSI) et la glutamate synthase (GOGAT) ou la glutamate déshydrogénase (GDH) (4).

1.2. GSI, GOGAT et GDH

Les produits dérivés de l'assimilation du NH_3 sont la glutamate et la glutamine. Les enzymes GSI, GOGAT et GDH sont nécessaires pour cette assimilation. Ainsi, le fonctionnement de ces enzymes dépend principalement de l'environnement où se trouve le micro-organisme. Donc, en milieu ammoniacal riche, l'entrée de l'azote se fait à 85% par la glutamate déshydrogénase (GDH), tandis que la glutamine synthétase (GSI) n'y contribue qu'à 15%. Par conséquent, la production de la glutamate est obtenue grâce à la GDH et la production de la glutamine est obtenue par GSI. Deux facteurs vont freiner l'activité de GSI en pléthore de NH_3 , soit la répression de sa synthèse et l'inhibition de son activité. Cette inhibition est exercée à deux niveaux qui sont la régulation allostérique en présence de divers métabolites et la modification covalente (adénylation) des différentes sous-unités. Tout cela est réversible. En milieu pauvre en azote ammoniacal, la synthèse de GSI est accélérée et l'enlèvement des groupes adényl accroît son efficacité. Cependant la GSI et la GOGAT sont les seules enzymes responsables de la synthèse de la glutamate et de la glutamine dans cet environnement (4).

2. Fixation de l'azote atmosphérique

En absence d'ammoniaque ou d'autres sources d'azotes, certains organismes, selon des conditions de croissance, sont capables de fixer l'azote atmosphérique (N_2). L'azote diatomique (N_2) est un gaz extrêmement stable et peu réactif sous les conditions physiologiques. Les procaryotes sont les seuls à pouvoir effectuer la réduction de l'azote en ammoniaque. Cette propriété est réservée aux détenteurs d'une nitrogénase : les diazotrophes. Les diazotrophes peuvent être des organismes photosynthétiques (bactéries pourpres, cyanobactéries), des organismes non photosynthétiques (*Klebsiella pneumoniae*,

Azotobacter vinelandii, *Azotobacter chroococcum*) et des bactéries vivant en symbiose avec des plantes (*Rhizobium*) (4).

2.1. Conditions de la fixation de l'azote

Chez les diazotrophes, le fonctionnement de la nitrogénase nécessite la présence de certaines conditions (4). La nitrogénase est une enzyme qui demande beaucoup d'énergie ($2\text{ATP}/e^-$). Elle effectue, dans les conditions ordinaires, une réaction que l'industrie ne peut réaliser qu'à température élevée et sous pression. La réaction catalysée par la nitrogénase consomme 8 électrons : $\text{N}_2 + 8e^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2$. Elle a donc besoin d'une source d'électrons à bas potentiel. Voici une troisième condition très importante. La fixation de l'azote est un processus essentiellement en anaérobiose. Certains micro-organismes sont néanmoins capables de fixer l'azote en aérobiose (*Azotobacter*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*) grâce à des systèmes protecteurs contre l'oxygène (O_2). La nitrogénase doit être protégée de l'oxygène dans le milieu intracellulaire. La plupart des fixateurs d'azote règlent ce problème en consommant rapidement de l' O_2 par des réactions d'oxydation très puissantes.

Donc, la fixation de l'azote nécessite en théorie 16 molécules d'ATP et 8 électrons (à un potentiel rédox équivalent à -450 mV) par molécule N_2 réduite dans un environnement en anaérobiose.

2.2. La nitrogénase

La fixation de l'azote est élaborée par le transfert des électrons entre plusieurs centres rédox contenus par des métalloprotéines. Ces métalloprotéines ont été les sujets de plusieurs recherches intensives durant ces dernières années (5). Toutes les nitrogénases connues ont le

même modèle et des caractères communs malgré la diversité des organismes fixateurs d'azote. La nitrogénase est une enzyme formée de l'association de deux protéines : une protéine appelée dinitrogénase et une réductase appelée dinitrogénase réductase (6). La dinitrogénase est un tétramère de structure $\alpha_2\beta_2$. Avec des chaînes α (59kDa) et β (54kDa), ce tétramère renferme généralement deux cofacteurs spéciaux FeMo (dont chacun contient du fer, du soufre et du molybdène) ainsi que deux centres fer-soufre (centres P). La réductase est un dimère de deux chaînes γ identiques (30-32kDa), contenant un unique centre [4Fe-4S] (figure 1).

2.2.1. Cofacteurs de la nitrogénase

Le cofacteur à fer et molybdène (Fe-Mo) de la nitrogénase est le site de réduction du substrat lors de la fixation de l'azote.

En général, le monde bactérien possède une nitrogénase avec un seul cofacteur, comme c'est le cas chez *Klebsiella pneumoniae* qui possède une nitrogénase avec le même cofacteur FeMo quelques soient les conditions (4). Il existe cependant des exceptions. Certaines bactéries possèdent plusieurs types de cofacteurs. La multiplicité des cofacteurs chez certaines espèces est une adaptation aux différents milieux.

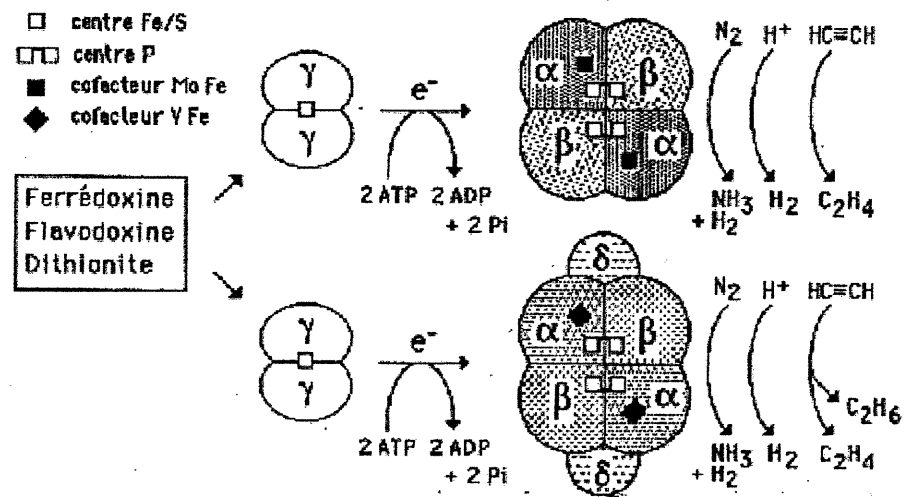


Figure 1. Les composantes de la nitrogénase : ce schéma représente la nitrogénase à molybdène chez *K. pneumoniae* (première ligne), et à Vanadium chez *A. vinelandii* (deuxième ligne), ainsi que le transfert des électrons (4).

2.2.2. Transfert d'électrons chez la nitrogénase

Chez la plupart des diazotrophes, les détails du modèle catalytique de la nitrogénase sont encore un sujet de débat. Cependant, la concordance est générale en ce qui concerne les transferts d'électrons de la

nitrogénase chez *K. pneumoniae* et *A. vinelandii*. La réduction de N_2 en NH_3 nécessite huit électrons. Par conséquent, le transfert d'électrons est une étape primordiale pour accomplir le processus de la fixation de l'azote. Ce transfert se fait par l'association de plusieurs protéines. La réductase reçoit ses électrons un à un d'une ferrédoxine ou d'une flavodoxine et lie deux ATP reliés à des ions magnésium (2Mg-ATP). Elle se lie à sa partenaire, la dinitrogénase $\alpha_2\beta_2$ à molybdène et lui cède un seul électron en hydrolysant tout son ATP en ADP et en phosphate. La réductase ne peut transmettre qu'un seul électron à la fois puisqu'elle n'a qu'un seul centre fer-soufre passant alternativement de l'état oxydé à l'état réduit (7). Après l'association et le transfert de l'électron, les deux protéines se dissocient, la réductase recharge un autre électron et 2ATP et le cycle recommence. L'assimilation de l'azote consomme donc une énergie considérable dont l'origine peut être fermentative, respiratoire ou photosynthétique (4).

La réductase (FeP) lie MgATP à un site distant de 20 nm du centre Fe-S. La liaison de MgATP induit un changement de conformation qui est nécessaire pour baisser le potentiel rédox du centre Fe-S de -300 mV à -450 mV, favorisant ainsi la formation du complexe FeP et MoFeP. L'association entre FeP et MoFeP induit un autre changement de conformation structurelle qui fait baisser le potentiel rédox de FeP de -200 mV de plus, permettant ainsi le bon cheminement de l'électron d'un centre à l'autre (8, 9). Le centre P est l'accepteur direct et immédiat du transfert d'électrons de la dinitrogénase réductase (MoFeP) et permet la transmission intramoléculaire des électrons vers le cofacteur Mo-Fe. La réduction complète des cofacteurs FeMo et des centres P nécessite un potentiel rédox très bas de l'ordre de -450 mV. Il semble aussi que la dissociation des deux protéines est l'étape limite du mécanisme global. La nitrogénase a un fonctionnement relativement lent par rapport à la majorité des enzymes (7).

En résumé, la réduction se fait en trois étapes : 1-la réception de l'électron induit un changement de conformation chez FeP ; 2-la formation d'un complexe entre FeP et MoFeP ; 3-la réduction de MoFeP nécessite plusieurs transferts intermoléculaires et intramoléculaires (5).

2.2.3. Les autres substrats de la nitrogénase

Les diazotrophes sont capables de réduire des substrats autres que l'azote diatomique. Par exemple, la nitrogénase est capable de réduire l'acétylène en éthylène. C'est une propriété fondamentale puisqu'elle permet le dosage de l'activité de cette enzyme lors des études biochimiques de la fixation de l'azote (9).

3. Génétique et régulation de la fixation de l'azote

Pendant les trentes dernières années, plusieurs études ont porté sur la génétique et sur la régulation des gènes *nif* chez *Klebsiella pneumoniae* qui est une souche bactérienne utilisée dans les présents travaux de recherche. *K. pneumoniae* fixe l'azote sous des conditions en anaérobies à 30°C.

Les gènes *nif* sont les gènes impliqués dans la synthèse de la nitrogénase à molybdène chez *Klebsiella pneumoniae*. Ces gènes se retrouvent sur un seul segment du génome d' environ 23 kb où ils sont distribués en 7 opérons (figure 2) (10, 11).

3.1. Organisation des gènes

Chez la majorité des diazotrophes qui possèdent une nitrogénase à molybdène, on trouve quatre groupes de gènes (12) :

* *nifHDK* : ce sont les gènes structuraux de la nitrogénase. *nifH* code pour la réductase, la composante FeP de la nitrogénase ; *nifD* et *nifK* code pour la dinitrogénase, la composante MoFeP de la nitrogénase ; *nifD* code pour la sous-unité α et *nifK* code pour la sous-unité β (13).

* *nifM, U, S, N, E, Z, B, V, W* et *Q* sont impliqués dans la synthèse, dans la stabilisation et dans l'insertion des centres métalliques de la nitrogénase (14, 15, 16, 17, 18, 19).

* *nifA, L* sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *nif* (20).

* *nifF* et *nifJ* sont impliqués dans le transport des électrons vers la nitrogénase.

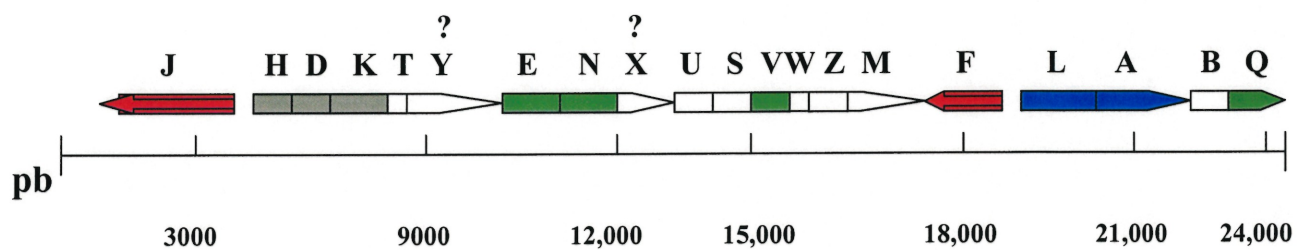


Figure 2. Organisation des gènes *nif* impliqués dans la fixation de l'azote chez *K. pneumoniae*. Les gènes responsables de la synthèse de la nitrogénase sont colorés en gris, ceux qui sont en vert commandent la synthèse du cofacteur, ceux qui sont en rouge le transport et ceux qui sont en bleu représentent les gènes de la régulation de l'expression des gènes *nif*. Les flèches indiquent l'orientation des gènes. Les nombres représentent les positions sur le segment des gènes *nif* (12).

3.2. L'expression des gènes *nif*

Le contrôle de l'expression des gènes *nif* a été analysé la première fois chez *K. pneumoniae* (10). Si l'azote ammoniacal se raréfie, les bactéries augmentent le taux d'expression de nombreux opérons pour l'utilisation de l'ammonium en petite quantité ou pour la mobilisation de nouvelles sources d'azote (4). Parmi les gènes ainsi exprimés, on retrouve les gènes *nif*.

3.2.1. Mécanismes du contrôle

L'expression des gènes *nif* chez *K. pneumoniae* est soumise à un double contrôle. La disponibilité de l'azote contrôle l'activité des régulateurs du système Ntr. L'activité de NifA dépend du système Ntr et de l'absence de l'oxygène.

3.2.1.1. Le système Ntr

Le contrôle met en jeu le gène *glnD*, le gène *glnB* et les gènes *ntr*. Le manque de l'azote est décelé par le rapport G/OXO (glutamine/ α -cétoglutarate). Ce rapport est plus élevé dans une cellule disposant d'une source azotée abondante que dans une cellule carencée en azote. C'est la protéine GlnD qui détecte le ratio G/OXO. Si le ratio G/OXO est faible, cette protéine fixe le nucléotide UMP sur la protéine GlnB. Si le ratio G/OXO est fort, elle lui retire cet UMP. À son tour, la protéine GlnB-UMP active NtrB (une protéine kinase). La kinase NtrB phosphoryle NtrC en NtrC-P, renforce à son tour l'action de NtrA (facteur sigma σ^{54}) (figure 3) (4). NtrA et NtrC activent la transcription en s'associant à l'ADN. L'analyse moléculaire de ces deux protéines montre qu'elles ont un site d'attachement leur permettant de se fixer sur l'ADN en double hélice : NtrA sur un promoteur et NtrC-P à une distance en amont (21).

3.2.1.2. NifA

La fixation de l'azote nécessite certaines conditions physiologiques à cause du besoin d'un apport énergétique fort, ainsi qu'une inhibition expéditive de la nitrogénase en présence de l'O₂. Un contrôle sévère au niveau de l'expression des gènes de la fixation de l'azote est donc nécessaire, d'où la présence d'un deuxième niveau de contrôle NifA, qui sert à accomplir l'initiation de la transcription des gènes *nif* par l'ARN-polymérase σ^{54} dépendante (20).

Des études ultérieures ont montré que le gène *nifA* est présent chez tous les diazotrophes étudiés (22). Le premier gène *nifA* a été identifié chez *K. pneumoniae*. Il fait partie de l'opéron *nifLA*. L'expression de *nifA* est régulé au niveau transcriptionnel par NtrA et NtrC. Aussi, l'activité de NifA est contrôlée par rapport à la présence de l'oxygène par la protéine NifL (23, 24).

Le fonctionnement de NifA a été étudié par le groupe Kustu en utilisant un système de traduction *in vitro* (23). En absence de l'O₂, NifA est fonctionnelle, ce qui permet l'expression des gènes *nif*. La protéine NifL chez *K. pneumoniae* détecte la présence de l'oxygène et bloque le fonctionnement de NifA en empêchant son interaction avec σ^{54} (25). Cette régulation permet de prévenir la synthèse des composantes nécessaire à la fixation de l'azote en présence de l'O₂. NifA fonctionne comme un activateur de transcription en harmonie avec NtrA (σ^{54}) (26). NifA a une structure modulaire composée de trois domaines : N-terminal, central et C-terminal (27, 28). Tous les opérons *nif* à l'exception de *nifLA* sont régulés par l'activateur de transcription NifA.

Plusieurs études ont démontré que la protéine IHF («integration host factor») est nécessaire pour faciliter le contact entre NifA liée à son

site d'attachement et σ^{54} lié à son promoteur (24). NifA s'attache sur l'ADN en amont du promoteur *nifH*, tandis que IHF favorise la création d'une boucle d'ADN, permettant ainsi l'isomérisation du complexe fermé entre σ^{54} et le promoteur vers un complexe ouvert.

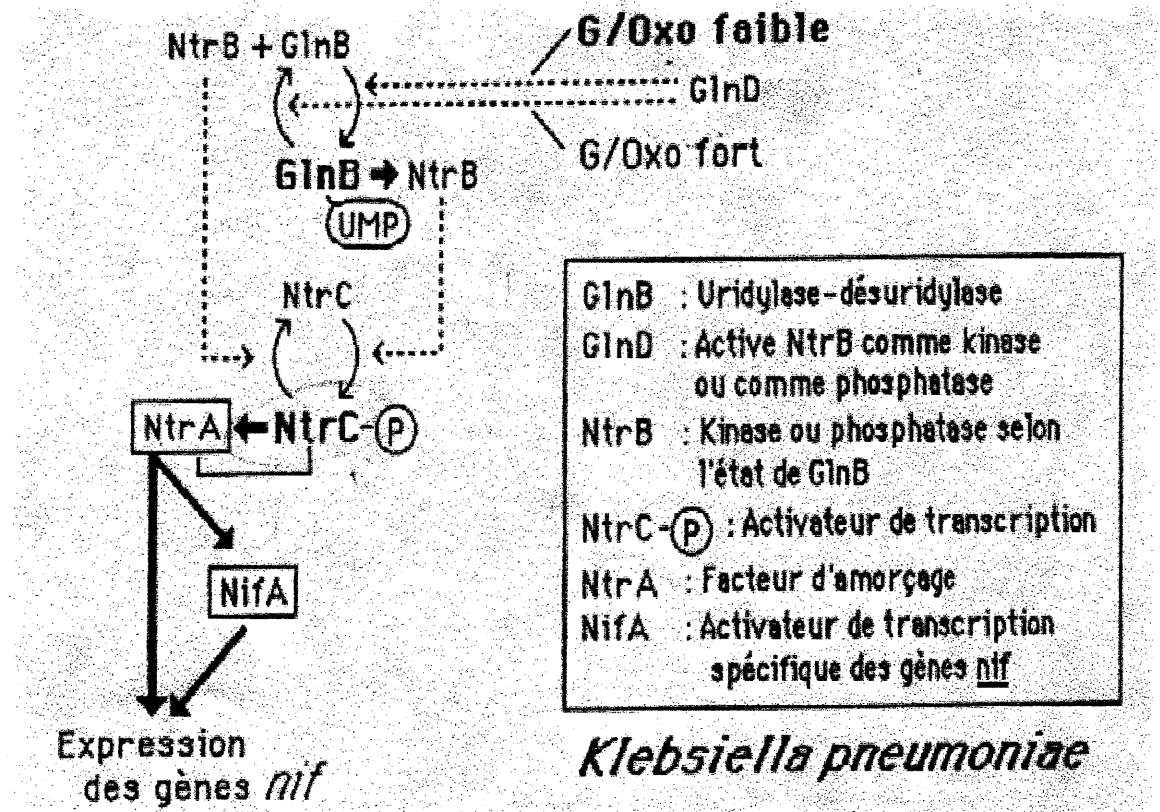


Figure 3. Le système d'activation des gènes *nif* chez *K. pneumoniae* (4).

3.2.2. L'expression du gène *nifF*

Le gène *nifF* réside dans un opéron transcriptionnel monocistronique entre les gènes *nifL* et *nifM* (figure 4). Le gène *nifF* est transcrit dans une direction opposée aux autres opérons *nif*. La flavodoxine (NifF \approx 20kDa) est codée par le gène *nifF* (29).

Le gène *nifF* est exprimé lors de l'expression des gènes *nif* sous les conditions de fixation de l'azote (figure 5). Par conséquent, l'expression de *nifF* est inhibée par une source d'azote ammoniacal ou par la présence d'oxygène (29, 30).

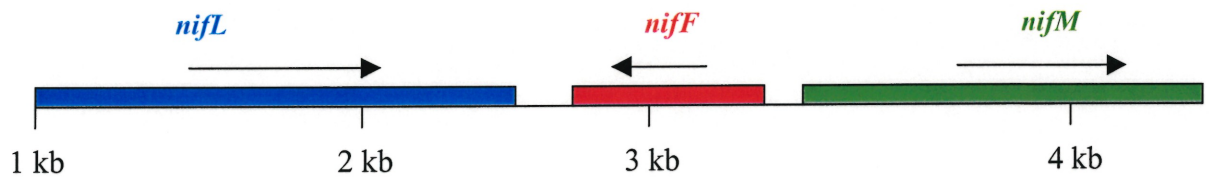


Figure 4. Carte génétique et physique de la région entourant le gène *nifF* chez *K. pneumoniae*. Les flèches indiquent l'orientation des gènes (29).

1 CCGCGGTAGTGCAAAGCAACCTGGCACAGCCTTCGCAATACCCCTGCGAG
 51 AACGCGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGA GCGCAACATGGCGAACA
 101 TTGGTATTTTCTTTGGCACCGATACCGGTAAAACCCGCAAATCGCGAAA
 151 ATGATCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAA
 201 CCGCACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCA
 251 CGCCGACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGGCCGGATGCGAA
 301 AGCGAGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGGCCTCGACGACGCCAGCCTGAA
 351 AGGGAAAACCGTGGCGCTGTTCCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGG
 401 ACAACTTCGTCAGCGGGATGCGCCCGCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGC
 451 GGC GCGCAGATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCGC
 501 GTCCTCGGCGCTGGAAGGCGACCGCTTTGTTGGGCTGGTGCTGGATCAGG
 551 ATAACCAGTTCGACCAGACCGAAGCGCGTCTGGCGAGCTGGCTTGAGGAG
 601 ATTAACGCACCGTGCTGTAGGCGTTCGA

Figure 5. Séquence nucléotidique du gène *nifF* chez *Klebsiella pneumoniae* (629 pb) : Les nucléotides sont énumérés à partir de l'extrémité 5'. La séquence consensus pour la polymérase ARN avec σ^{54} est soulignée (se situe entre 21-24 et 33-37). La séquence Shine-Dalgarno (RBS) et le codon initiateur sont en caractères gras.

4. Le transport des électrons vers la dinitrogénase réductase

4.1. La pyruvate : flavodoxine oxydoréductase (POR)

POR est la protéine nécessaire à la réduction de la flavodoxine et de la ferrédoxine. Chez *K. pneumoniae*, la source métabolique des électrons pour la réduction de l'azote est le pyruvate. Les électrons sont extraits de ce substrat par la pyruvate : flavodoxine oxydoréductase (POR). En présence du pyruvate et du CoA, POR (NifJ) réduit la flavodoxine (ou ferrédoxine) avec la production de CO₂ et d'acétyl-CoA. La flavodoxine réduit à son tour la dinitrogénase réductase (figure 6) (31, 32, 33).

POR se trouve chez les eucaryotes et chez les procaryotes. Elle a même une importance sur le plan médical puisqu'elle est essentielle dans le métabolisme de plusieurs organismes pathogènes anaérobies incluant *Hélicobacter pylori*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia* et *Entamoeba* (34).

POR (200 à 300kDa) se compose de plusieurs centre FeS et un cofacteur (la thiamine pyrophosphate «TPP»). Le cofacteur TPP décarboxyle le pyruvate (un oxoacide) par une attaque nucléophile du carbonyle et utilise comme accepteur d'électrons une ferrédoxine ou une flavodoxine (34). Les différentes études sur POR montrent qu'il existe trois types de protéines POR. La différence entre celles-ci, réside au niveau de la composition des sous-unités de l'enzyme (POR). Chez *K. pneumoniae*, *Rs. rubrum* et *Rb. capsulatus* POR ont une structure d'homodimère (120-130kDa) avec une composition de 1 mole de TPP et 4 ou 8 moles de FeS/sous-unités (35, 36). Chez *Hélicobacter pylori*, POR est composée de quatre sous-unités différentes (13, 25, 32, et 47kDa) ayant 1 mole de TPP et 8 moles de Fe-S/hétérotétramère (37). Chez *Anabaena* sp 7120, POR est nécessaire seulement sous les conditions de

fixation de l'azote en absence du fer (38). En fait, *K. pneumoniae* est le seul organisme diazotrophe pour lequel le transfert des électrons vers la nitrogénase est bien établi. *K. pneumoniae* possède une POR *nif*-spécifique (NifJ). La NifJ semble être nécessaire à la fixation de l'azote, les mutants *nifJ*⁻ s'avèrent *nif*⁻ (32, 33). Chez d'autres diazotrophes, NifJ est soit absente ou joue un rôle marginal dans la fixation de l'azote. Par exemple, chez *Rhodospirillum rubrum*, POR est exprimée de façon constitutive et s'avère non essentielle à la fixation de l'azote (36).

4.2. Les protéines réductrices de la nitrogénase

Le transport d'électrons vers la dinitrogénase réductase nécessite des protéines capables de fournir des électrons à bas potentiel rédox. Ces intermédiaires sont une flavodoxine (codé par *nifF*) ou une ferrédoxine (codé par *fdxN*) selon les espèces. Chez *K. pneumoniae* et *A. vinelandii*, l'intermédiaire est une flavodoxine. Chez *Clostridium pasteurianum* et *Rhodospirillum rubrum*, l'intermédiaire est une ferrédoxine (36).

Certains micro-organismes possèdent une ferrédoxine et une flavodoxine. Chez d'autres espèces, on trouve plusieurs ferrédoxines comme *Rb. capsulatus* qui possède au moins six ferrédoxines et une flavodoxine (39). Chez les micro-organismes qui possèdent les deux protéines, lorsqu'il y a une carence en fer, il y a absence de ferrédoxine. Alors, la flavodoxine la remplace pour effectuer le transport dans le métabolisme de la fixation de l'azote. Cela est possible puisque la synthèse de la flavodoxine chez *Rb. capsulatus* est soumise à un double contrôle, soit l'azote fixé et la carence en fer (40). La flavodoxine et la ferrédoxine se retrouvent aussi bien chez les diazotrophes de types anaérobie stricte, anaérobie facultative et aérobie stricte.

Chez *K. pneumoniae*, la flavodoxine joue le rôle d'un transporteur d'électrons entre NifJ et FeP. *K. pneumoniae* est le seul micro-organisme où le transport d'électrons *in vivo* vers la nitrogénase est bien compris. Des études génétiques et biochimiques chez *K. pneumoniae* ont démontré que NifJ et NifF sont nécessaires pour le transfert des électrons du pyruvate vers la FeP de la nitrogénase. Par conséquent, toute mutation faite au niveau des gènes *nifJ* et *nifF* aboutit à une perte de l'activité de la nitrogénase *in vivo* (31, 32, 33, 35).

Il est important de noter aussi les études du groupe de Shah qui ont trouvé les éléments nécessaires à la fixation de l'azote chez *K. pneumoniae*. À partir d'un système *in vitro* composé de NifJ, du pyruvate, de FeP, de MoFeP et d'une source génératrice d'ATP, ils ont établi que NifJ cause une décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA+CO₂ et que cette réaction est couplée à la réduction de NifF. Dans cette réaction, la flavodoxine se retrouve dans un mécanisme cyclique qui oscille de son état semiquinone vers l'état hydroquinone pour combler le bas potentiel rédox nécessaire au transport d'électrons vers la nitrogénase (33).

Chez d'autres diazotrophes, le transport d'électrons vers la nitrogénase s'avère plus complexe, comme c'est le cas chez *Rb. capsulatus*. Des études *in vitro* montrent que *Rb. capsulatus* possède plusieurs transporteurs d'électrons potentiellement en mesure de transférer des électrons à la nitrogénase *in vivo*. Cependant, on ne connaît pas leurs fonctions physiologiques. Par exemple, on ne sait pas comment ces transporteurs sont réduits et on ne connaît pas l'identité de leurs accepteurs d'électrons *in vivo* (34, 40, 42, 43, 44).

L'analyse par spectrophotométrie de la réaction cinétique du transfert d'électrons chez *R. capsulatus* a montré la formation d'un complexe très étroit (0.44μM) entre NifF et FeP, d'où une plus haute

réactivité entre ces deux protéines que celle observée entre la ferrédoxine et FeP, et ceci malgré le faible contenu cellulaire en NifF. La formation de ce complexe montre que NifF contribue significativement au taux de la fixation de l'azote (41).

TRANSPORT D'ÉLECTRONS DU PYRUVATE À LA NITROGÉNASE:

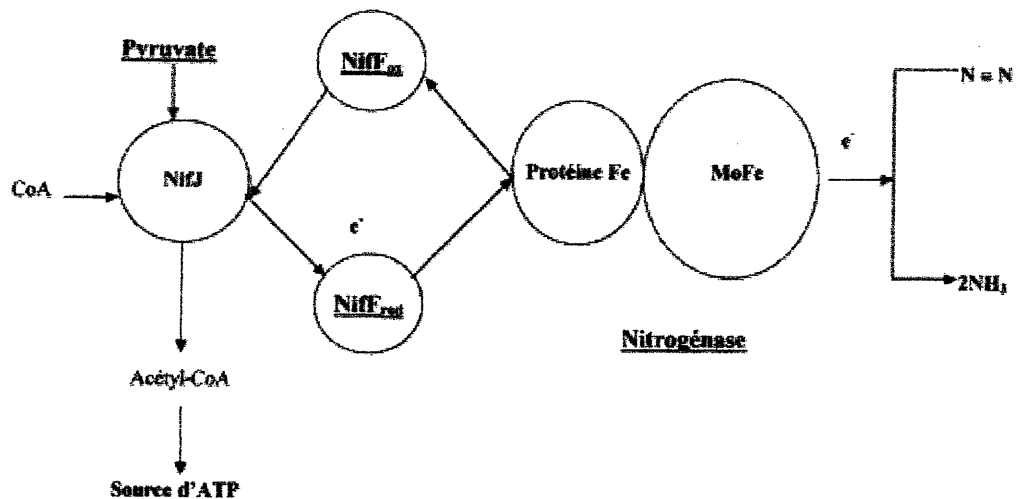


Figure 6. Ce schéma représente le transfert d'électrons chez *K. pneumoniae* pour la formation de l'ammonium (NH₃) : NifF_{ox} représente la forme oxydée, NifF_{red} la forme réduite.

4.3. Structures et fonctions de la flavodoxine

La flavodoxine est une protéine à bas potentiel rédox nécessaire à la génération de FeP réduite lors de la fixation de l'azote. D'après les études sur le potentiel rédox, NifF chez *K. pneumoniae* a un potentiel rédox de -412mV (pour la transition semiquinone en hydroquinone). Cette protéine est chargée négativement (-10 à -20) et elle est donc, comme la ferrédoxine, acide et elle comporte un faible point isoélectrique ($\text{pI}=4$) (45, 46).

Les flavodoxines appartiennent à la famille des flavoprotéines, c'est-à-dire qu'elles contiennent une molécule de FMN (Flavin mononucleotide), liée d'une façon non covalente. La liaison du cofacteur FMN à la flavodoxine stabilise considérablement la structure de cette dernière. FMN existe sous trois états rédox : la forme oxydée, flavoquinone ; la forme réduite par un électron, flavosemiquinone (sq) et la forme réduite par deux électrons, flavohydroquinone (hq). Les flavodoxines montrent un potentiel rédox très négatif pour le couple sq/hq, ce qui permet à la flavodoxine d'avoir le potentiel rédox nécessaire pour remplacer la ferrédoxine *in vitro* ou *in vivo* (47, 48).

Les sites de liaison du cofacteur FMN chez la flavodoxine d'*Azotobacter chroococcum*, semblables chez les autres flavodoxines, sont localisés dans trois régions, soit au niveau d'une région composée des résidus Pro-55 à Glu-61, au niveau d'une région composée des résidus Ala-88 à Gln-99 et au niveau de la boucle contenant les résidus Ser-10 à Thr-16 situés dans la région N-terminale (49).

La stabilisation de la flavodoxine par la liaison du FMN augmente le potentiel rédox du couple ox/sq, mais réduit au contraire énormément celui du couple sq/hq. Des études sur la structure et la

fonction des flavodoxines ont montré que les interactions électrostatiques jouent un rôle important sur l'état sq/hq. Par exemple, chez la flavodoxine de *Desulfovibrio. vulgaris* on trouve six résidus acides près du cofacteur FMN. Ces résidus introduisent une charge négative autour du cofacteur FMN. Ceci traduit une diminution du potentiel du couple sq/hq lors de l'attachement du FMN (50). Aussi, d'autres études ont révélé la présence d'une boucle à côté du site d'attachement du FMN qui est affectée par l'état semiquinone du cofacteur. Cette boucle, nommée boucle *nif*-spécifique, est donc affectée par les interactions électrostatiques (51).

Il existe deux types distincts de flavodoxines et cette classification est basée sur leurs poids moléculaires : les flavodoxines à courtes chaînes et les flavodoxines à longues chaînes. Les flavodoxines à courtes chaînes ont un poids moléculaire qui varie entre 14,5 et 16 kDa et se retrouvent chez plusieurs micro-organismes tels que *Clostridium sp.* Les flavodoxines à longues chaînes ont un poids qui varie entre 18,3 kDa et 23 kDa et se retrouvent chez les algues vertes, chez les algues rouges, chez les cyanobactéries, chez les entérobactéries, chez les bactéries photosynthétiques et chez les bactéries fixatrices d'azote. C'est parmi les flavodoxines à longues chaînes qu'on retrouve les flavodoxines *nif*-spécifiques (45). Au point de vue moléculaire, les flavodoxines se présentent sous la forme de monomères à faible poids moléculaire et ont toutes une région conservée au niveau de la séquence N-terminale. Cette région se compose des acides aminés suivants : [L/I/V]-[L/I/V/F/Y]-X-[S/T]-2X-[A/G/C]-X-T-3X-A2X[L/V] (77).

Les structures tridimensionnelles des flavodoxines ont été déterminées chez *Clostridium beijerinckii* et *Chondrus crispus* par cristallographie (52, 53), chez *Mégasphaera elsdenii* par NMR (54) et chez *Desulfovibrio vulgaris* par les deux méthodes (55, 56). Ses méthodes d'analyse montrent que les flavodoxines ont une structure tertiaire qui

consiste en un feuillet β , composé de 5 rubans liés par 4 ou 5 segments de type hélice α . Ils sont organisés en paires parallèles à l'extérieur de la molécule (figure 7). L'étude de la flavodoxine chez *A. chroococcum* a montré en détail la composition des rubans (51).

L'analyse de la structure primaire de plusieurs flavodoxines à longues chaînes démontre l'existence d'une séquence hautement identique. Par conséquent, l'alignement des séquences en acides aminés des flavodoxines à longues chaînes met en évidence la présence d'une séquence unique seulement chez les flavodoxines *nif*-spécifiques. Elle est composée de 8 acides aminés qui forment une boucle au niveau du cinquième ruban du feuillet β et qu'on nomme boucle *nif*-spécifique. Chez *K. pneumoniae* la boucle *nif*-spécifique est composée des résidus Phe-65 à Ser-75 et se situe près du site FMN. Cette boucle *nif*-spécifique est absente chez les flavodoxines à courtes chaînes et chez les autres flavodoxines à longues chaînes (figure 8 et 9). Elle est donc caractéristique aux flavodoxines *nif*-spécifiques et peut jouer un rôle important dans la formation spécifique du complexe entre la flavodoxine et la FeP de la nitrogénase (40), d'où son importance potentielle dans la fixation de l'azote. Aussi, la comparaison des séquences des acides aminés de NifF chez différentes espèces montre une grande similitude entre *R. capsulatus*, *A. vinelandii* et *K. pneumoniae* (40). Ainsi, NifF chez *R. capsulatus* est hautement similaire à NifF chez *A. vinelandii* (57). *K. pneumoniae* (58, 29) a une similarité de 76.7% avec *R. capsulatus* et de 67.4% avec *A. vinelandii*.

Parmi les diazotrophes, nous avons des espèces qui contiennent une flavodoxine *nif*-spécifique, d'autres qui n'en contiennent pas, d'autres qui ont une régulation transcriptionnelle dépendante de l'état intracellulaire du fer et d'autres qui ont seulement une expression constitutive. Il est donc important de noter que seulement quelques

diazotrophes contiennent *nifF* comme c'est le cas chez *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodobacter capsulatus* (40), *Azotobacter vinelandii* (57) et *Enterobacter agglomerans*.

Les flavodoxines ne jouent pas un rôle seulement dans la fixation de l'azote, car elles participent aussi dans d'autres activités. Par exemple, chez *E. coli*, une bactérie non diazotrophe, la flavodoxine joue un rôle dans l'activation d'une ribonucléotide réductase et dans l'activation de la pyruvate formiate lyase (59, 60).

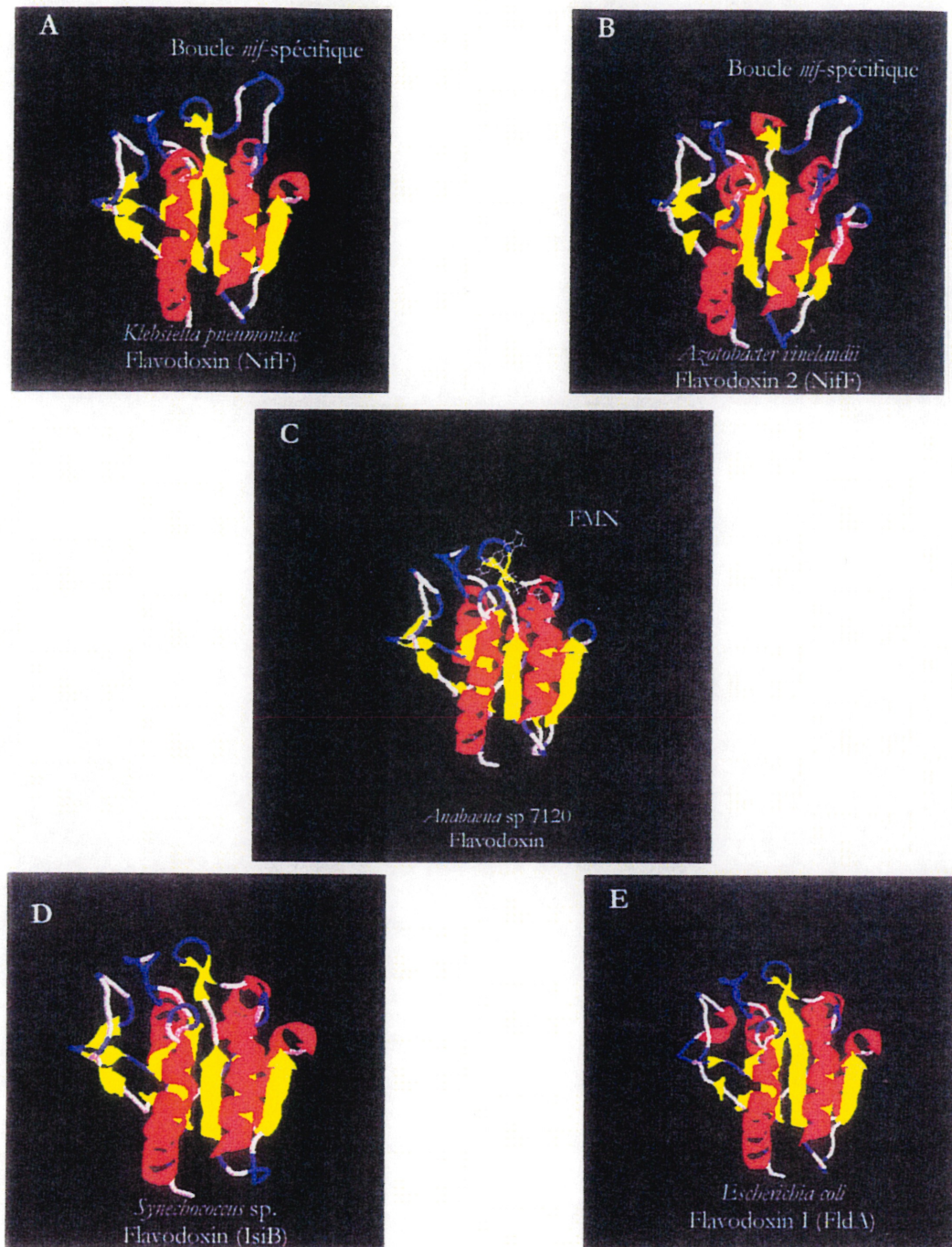
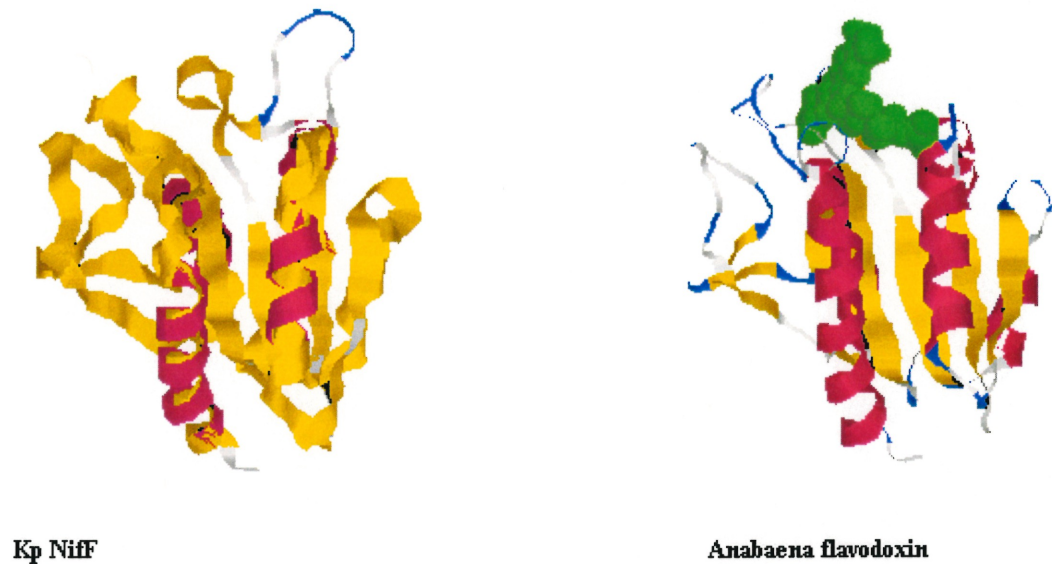


Figure 7. Présentation de quelques structures de flavodoxines : A, flavodoxine chez *K. pneumoniae* ; B, flavodoxine chez *A. vinelandii* ; C, flavodoxine chez *Anabaena* sp 7120 ; D, flavodoxine chez *Synechococcus* sp et E, flavodoxine chez *E. coli* (49).

	1	49
Kpneu	MANIGI FFGTD TGKTRKIAKMI HKQLGELADAPVNI NR TTLDDFMA.YP	
Eaggl	MATIGI FFGSD TGQTRKVAKLI HQKLDGIADAPLDVRRATREQFL.SYP	
Avine	MAKIGL FFGSNTGKTRKVAKSI KKRFDD ETMSDALNVNRVSAEDFAQYQ	
Azoch	GLFFGSNTGKTRKVAKSI KKRFDD ETMSDAVNVNRVSAEDFAQYQ	
Anidu	MAKIGL FFYGTQ TGVTQ TIAESIQ QEFGGESIVDLNDIANADASDLNAYD	
Avari	MSKIGL FFYGTQ TGKTESVAEII RDEFGNDVVTLHDV SQA EVTDLNDYQ	
Synec	MSKIGL FFGTQ TGNT EELAQA IQA AF GGSDIVELFDVAEVDIEALRDFD	
Ecoli	MAITGI FFGSD TGNTENIAKMI QKQLGKDVADVHDI AKSS KED.LEAYD	
	50	100
Kpneu	VLLLGT PTLGDGQ L P GLEAG CESE SWSEFISGLDDASLKGKTVALFGLGD	
Eaggl	VLLLGT PTLGDG EL P GVEAG SQYD SWQEFNTLSEADLTGKTVALFGLGD	
Avine	FLILGT PTLGE GEL P GLSS DCENES WEEFLPKIEGLDFSGKTVALFGLGD	
Azoch	FLILGT PTLGE GEL P GLSS DCENES WEEFLPKIEGLDFSGKTVALFGLGD	
Anidu	YLIIG CPTW NVGEL. . . .QSDWEGIYDDLDSVNFQGGK VAY FGAGD	
Avari	YLIIG CPTW NIGEL. . . .QSDWEGLYSELDDVD FNG KL VAY FGTGD	
Synec	QLIIG CPTW NVGEL. . . .QSDWEALYDDLDDVD F SGKT IAY FGAGD	
Ecoli	ILLLGI PTW YYGEL. . . .QCDWDDFFPTLEEID FNG KL V ALF GCGD	
	101	150
Kpneu	QR GYPDNFVSGMRPLFDALSARGAQ MIG SWPN EGY EF SASSA .LEGDRFV	
Eaggl	QL NYSKNFVSAMRILYDLVIARGACVVG NW PREGYK FS F SAA LENNEFV	
Avine	QV GYPENYLDALGELY SFF KDRGAKIVGS W STDGYEFESSEAVVDGK.FV	
Azoch	QV GYPENFLDAMGELHS FF TERGAKVVGAW ST DGYEFEGS.TAVVDGKFV	
Anidu	QV GYSDNFQDAMGILEEKISSLGSQ TV GYWPIEGYDF NES KAV.RNNQFV	
Avari	QI GYADNFQDAIGILEEKISQRGGKT VG YW ST DGYDF NDS .KALRNGKFV	
Synec	QV GYADNFQDAMGVLEEKITSLGGKT VG QWPTAGYDHSES KA ERDG.RFV	
Ecoli	Q EDYAEYFCDALGTIRDII E PRGAT IV GHWPTAGYHFEASKGLADDDHFV	
	151	187
Kpneu	GLVLDQDNQFDQTEARLASWLEEI KRT VL*	
Eaggl	GLPLDQENQYDLTEERIDSWLEK LK PAVL*	
Avine	GLALDLDNQSGKTD ER VAAWLAQ IA PEFGLSL*	
Azoch	GLALDLDNQSGKTD ER VAAWLAQ IA PEFGL*	
Anidu	GLAIDEDNQPD L TKNRIKT W VS Q LKSEFGL*	
Avari	GLALDEDNQSD L TDDRIK S VVA Q LKSEFGL*	
Synec	GLAIDEDNQPE L TAERIQAWVA Q LKPAFGL*	
Ecoli	GLAIDEDRQPE L TAERVEK W VKQISEELHL DE ILNA*	

Figure 8. Alignement de la séquence en acides aminés de la protéine NifF chez différentes espèces : *Kpneu*= *K. pneumoniae*; *Eaggl*= *Enterobacter agglomerans*; *Avine*= *A. vinelandii* ; *Azoch*= *A. chroococcum* ; *Anidu*= *Anacystis nidulans* ; *Avari*= *Anabeana variabili* ; *Synec*= *Synechococcus sp* ; *Ecoli*= *E. coli*. La signature flavodoxine est en vert. En rouge se situe la région de la boucle *nif*-spécifique. En gras, se trouvent les acides aminés conservés parmi les flavodoxines alors que les sites d'attachement du FMN sont soulignés. Les astérisques indiquent le codon stop et les points créent des trous dans la séquence pour maximiser l'alignement (49).



Modeling of the three-dimensional structure of Kp NifH

Figure 9. Comparaison de la flavodoxine chez *Klebsiella pneumoniae* et *anabeana sp* 7120. Cette comparaison montre la présence d'une boucle *nif*-spécifique (un anneau blanc et bleu) dans le premier schéma (*K. pneumoniae*) et qui est absent chez *anabeana sp*. La modélisation a été réalisée grâce aux programmes SWISS-MODEL et RasMol version 2.7.

5. L'importance de la fixation de l'azote

La fixation de l'azote est un processus biologique très important pour la survie des diazotrophes. Les études sur ce processus biologique nous permettent non seulement d'améliorer nos problèmes en ressources alimentaires mondiales, mais aussi de diminuer la dépendance envers des

procédés chimiques coûteux et désastreux pour l'environnement de notre planète. La compréhension du mécanisme de la réduction de la nitrogénase est d'une importance primordiale.

La régulation des réactions de transfert d'électrons protéine-protéine est d'une importance biologique fondamentale. Ces réactions sont impliquées dans plusieurs processus métaboliques très répandus chez les eucaryotes et les procaryotes incluant les métabolismes suivants : la photosynthèse, la phosphorylation oxydative, la fixation de l'azote, la détoxification microsomale, le métabolisme de la prostaglandine, la biosynthèse des stéroïdes, etc. Bien que les réactions biochimiques des divers processus sont bien déterminées, les déterminants biologiques spécifiques sont rarement connus.

Plusieurs études ont porté sur la fixation de l'azote, d'où la compréhension de plusieurs mécanismes. Par exemple, les études chez *K. pneumoniae* nous ont permis de saisir le transport des électrons vers la nitrogénase (29, 31, 32, 33, 35 et 61). Ainsi, les études biochimiques ont montré la formation du complexe entre NifF et FeP de la nitrogénase (61) (figure 10). Cependant, la spécificité d'interaction entre les protéines NifF et FeP reste incomprise. Aussi, d'autres études ont suggéré que la boucle *nif*-spécifique est affectée par l'état semiquinone du FMN et qu'elle peut jouer un rôle important entre NifF et FeP (51). Par conséquent, ce projet de recherche est basé sur la détermination de la spécificité d'interaction entre le donneur d'électrons NifF et la réductase FeP. En se basant ainsi sur les études précédentes citées ci-haut, ces travaux de recherche seront orientés vers la création de deux types de mutation dans le gène *nifF* chez *Klebsiella pneumoniae*.

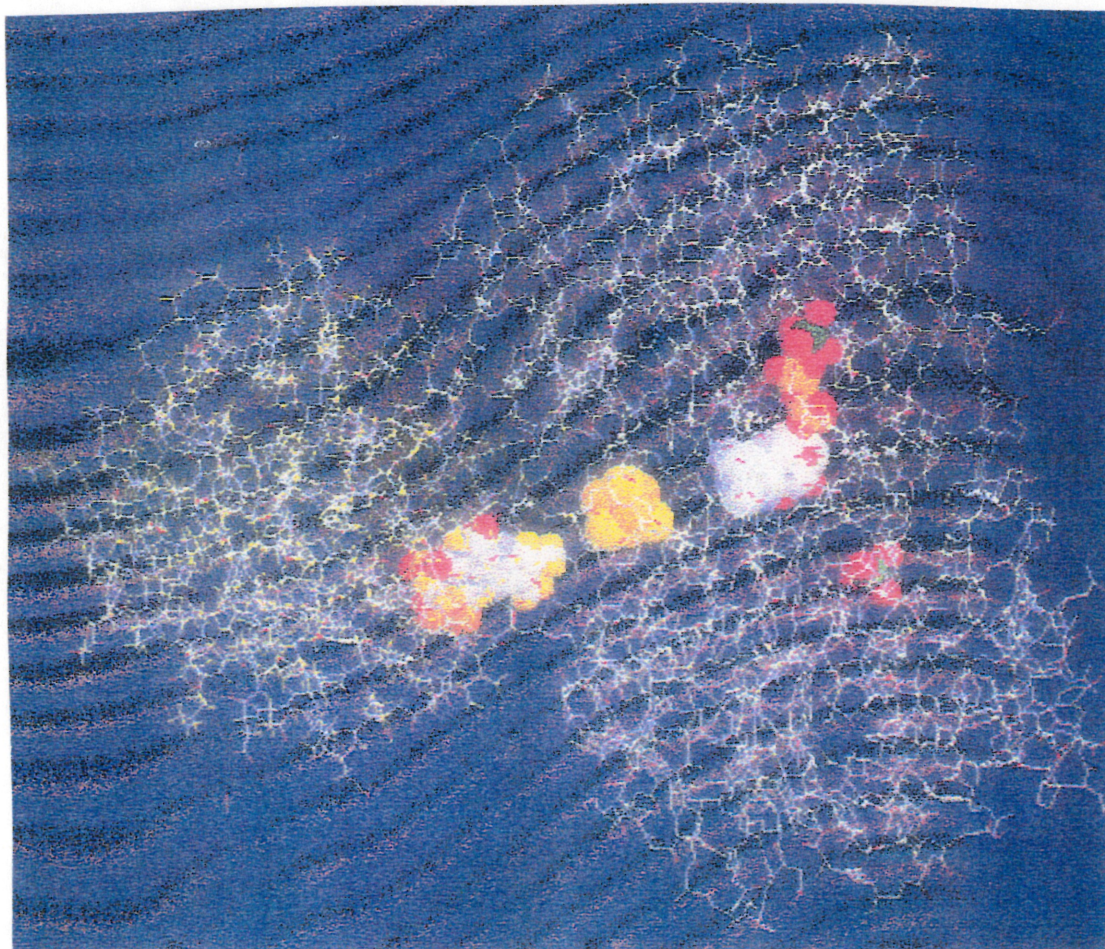


Figure 10. Schéma illustrant le modèle moléculaire de l'interaction entre la FeP et la flavodoxine. La modélisation a été réalisée grâce aux programmes SWISS-MODEL et RasMol version 2.7.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes

Les plasmides et les bactéries utilisés sont décrits dans le tableau I et II. La souche UN1789 (*nif*⁻) de *K. pneumoniae* (13) a été utilisée pour le criblage des plasmides mutés (au niveau du gène *nifF*). *K. pneumoniae* a une résistance naturelle à l'ampicilline, pour cette raison on travaille avec la résistance au chloramphénicol au niveau des vecteurs d'expression. Le plasmide pGGK₁ sert de matrice pour faire les PCR mutagéniques de *nifF* (au hasard ou dirigé). Le plasmide pGGK₂ sert de vecteur de clonage pour l'insert de *nifF*. Le plasmide pGGK₃ sert de témoin.

Tableau I : description des plasmides utilisées (62).

Nom de la souche	Génotype	Source
pGGK ₁	pBSKS ⁻ avec AmpR contenant l'insert <i>nifF</i> de <i>K. pneumoniae</i> entre les sites <i>Hind</i> III et <i>Pst</i> I	Laboratoire
pGGK ₂	pTrc99A (inactivation de l'Ap) contenant une cassette de Cm au site <i>Pvu</i> I	Laboratoire
pGGK ₃	pGGK ₂ contenant l'insert <i>nifF</i> de <i>K. pneumoniae</i> entre les sites <i>Hind</i> III et <i>Pst</i> I	Laboratoire
pNifF2	pGGK ₂ - <i>nifFB</i> ⁻	Ce travail
pNifF113	pGGK ₂ - <i>nifF</i> ⁻	Ce travail
pNifF136	pGGK ₂ - <i>nifF</i> ⁻	Ce travail
pNifF146	pGGK ₂ - <i>nifF</i> ⁻	Ce travail
pNifF185	pGGK ₂ - <i>nifF</i> ⁻	Ce travail

NB : L'insert *nifF* de *K. pneumoniae* est orienté N-terminal (*Hind*III) C-terminal (*Pst*I). *nifFB*⁻ représente le gène *nifF* sans la boucle *nif*-spécifique et *nifF*⁻ représente le gène *nifF* avec des mutations aléatoires.

Tableau II : description des souches bactériennes utilisées (62).

Nom de la souche	Génotype	Source
<i># Escherichia coli</i>		
DH10B	F ⁻ (mrr ⁻ hsdRMS ⁻ mcrBC) Φ 80dlacZM15 lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 (ara, leu)7697 galU galK lambda- rpsL nupG F ⁻	GIBCO-BRL
DH5 α	K12 Φ 80dlacZM15 endA1 recA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁻) supE44 thi ⁻¹ gyrA96 relA1 (lacZYA ⁻ argF)U169 F ⁻	GIBCO-BRL
S2	DH5 α transformée avec pNifF2	Ce travail
<i># Klebsiella pneumoniae</i>		
UN	souche sauvage	(13)
UN1789	<i>nif⁻</i> = <i>nifF</i> 4758	(13)
S113	UN1789 transformé avec pNifF113	Ce travail
S136	UN1789 transformé avec pNifF136	Ce travail
S148	UN1789 transformé avec pNifF148	Ce travail
S185	UN1789 transformé avec pNifF185	Ce travail

2. Milieux de cultures et antibiotiques utilisés

2.1. Milieux de cultures

Les milieux de cultures (63) utilisés lors de l'expérimentation sont les suivants :

* Milieu LB à 37 °C pour la croissance des souches *E. coli* et *K. pneumoniae* afin d'effectuer les extractions plasmidiques et les extractions protéiques. Milieu LB : 1% (p/v) tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure, 170 mM NaCl, pH 7.

* Milieu riche 2YT à 37 °C pour la croissance des souches mutées ; *E. coli* (mutations dirigées) et *K. pneumoniae* (mutations au hasard) afin d'effectuer les extractions plasmidiques utilisées pour les séquençages. 2YT medium : 1,6% (p/v) tryptone, 1% (p/v) extrait de levure, 85 mM NaCl, pH 7.

* Milieu minimal (MM) : la croissance de *K. pneumoniae* sous les conditions de fixation de l'azote doit se faire sur le milieu minimal à 30 °C. Ce milieu est nécessaire afin d'effectuer les selections et les criblages des plasmides mutés. MM pour *K. pneumoniae* : 1,5% (p/v) agar, 1% (p/v) sucrose, 0,01% (p/v) MgSO₄, 0,025% (p/v) MoO₄, 1 mM EDTA, 0,5 mM FeSO₄, 0,34% (p/v) KH₂PO₄, 1,2% (p/v) K₂HPO₄.

2.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques utilisés sont :

- * L'ampicilline (Ap), 1 ml de 125 mg/ml stock par litre (125 µg/ml final).
- * Le chloramphénicol (Cm), 10 ml de 2,5 mg/ml stock par litre (25 µg/ml final).

3. PCR

3.1. Principe

La technique de PCR permet d'amplifier en quelques heures un segment d'ADN qui peut être un gène, on parle alors d'amplification génique. Pour ce faire, la polymérase chain réaction (PCR) nécessite deux outils de base, les amorces spécifiques, l'ADN polymérase et un protocole expérimental approprié (64). Dans notre cas l'utilisation du PCR consiste à créer des mutations dans le gène étudié (65).

3.2. Réactifs utilisés

Le coffret de réactifs pour l'extraction et la purification de l'ADN pour PCR a été fournis par Qiagen. Les amorces utilisées ont été fournis par Alpha DNA. Le $MgCl_2$, $MgSO_4$, les nucléotides (dNTP), la Taq polymérase et le tampon de réaction ont été fournis par GIBCO-BRL life technologies. La Vent polymérase et le tampon de réaction ont été fournis par NEB. Les réactifs ont été dilués ou resuspendus dans de l'eau déionisée stérile au besoin.

3.3. PCR mutagénique aléatoire (67)

Pour ce PCR on a utilisé la Taq de deux façons différentes :

- * La première utilise la Taq polymérase seulement (puisque cette enzyme est sujette à l'erreur avec un taux de 10^{-5} à 10^{-4} par nucléotide synthétisé) afin d'éviter les mutations multiples (66).
- * La deuxième façon consiste à ajouter du Mn^{2+} (agent mutagénique)(68).

3.3.1. Les conditions d'amplifications

Avant de procéder à la réaction de mutagenèse par PCR, nous avons fait une mise au point des concentrations optimales des réactifs. En effet la concentration de $MgCl_2$ et de l'ADN affecte le nombre et l'intensité des fragments d'ADN générés par le PCR. Une seule variante sera utilisée à la fois pour la détermination de ces concentrations dans le but d'optimiser nos résultats de PCR. Les amorces utilisées pour l'amplification pour ce PCR sont représentées dans le tableau III.

Tableau III : oligonucléotides nécessaires à l'amplification des fragments d'ADN (*nif^F*) pour le PCR mutagénique aléatoire.

Nom	Séquence
7KS	5' CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATA 3'
3SK	5' AAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCG 3'

3.3.1.1. Détermination de la concentration de MgCl₂ nécessaire à l'amplification

Une série de quatre dilutions contenant de 0,5 mM à 3 mM de MgCl₂ ont été testées avec les deux amorces 7KS et 3SK (tableau IV). La concentration des autres réactifs demeure inchangée, l'ADN est à 20 ng/100µl. Une meilleure amplification est observée avec les concentrations de 1,5 et 3 mM du MgCl₂.

3.3.1.2. Détermination de la concentration d'ADN plasmidique optimale

Pour déterminer la concentration optimale d'ADN pour le PCR, une série de réactions contenant différentes dilutions (5 ng à 40 ng/100µl du volume final de chaque tube de PCR) de l'ADN plasmidique de pGGK₁ (extrait avec le coffret de Qiagen), ont été effectuées avec les deux amorces 7KS et 3SK et analysées sur un gel d'agarose à 1,5%. Tous les tubes contiennent 2,5 unités de la Taq polymérase, 0,2 mM de chacun des dNTPs et du tampon de PCR 10X (200 mM tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) à une concentration finale de 1X, les amorces à 0,5 µM chacune et le MgCl₂ avec les concentrations optimales trouvées aux sections «3.5.1.» (tableau V).

Tableau IV : réactions de PCR contenant différentes concentrations de MgCl₂.

N°tube	Réactifs et ADN	MgCl ₂ (mM)	Amplifications
1	constant	0,5	–
2	constant	1	–
3	constant	1,5	++
4	constant	3	++

Tableau V : réactions de PCR contenant différentes concentrations d'ADN.

N°tube	Réactifs	ADN (ng)	Amplifications
1	constant	5	+
2	constant	10	++++
3	constant	20	+
4	constant	40	+

3.3.2. Protocole utilisé

Pour la réaction de PCR, chacun des tubes (volume total 100 µl), contient: 20 mM tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 unités de Taq polymérase et 200 µM de chacun des dNTPs, MgCl₂ (1,5 mM et 3 mM), l'ADN (10 ng/100µl). Nous avons utilisés deux amorces : 7KS et 3SK à une concentration de 0,5 µM chacune (69).

L'ADN est d'abord dénaturé par un cycle de 1 minute 30 secondes à 94 °C, puis amplifié par 35 cycles de 2 minutes à 66 °C et une extension de 2 minutes 30 secondes à 72 °C. L'utilisation du PCR dans ces travaux de recherches permet l'amplification du gène *nifH*, qui a la taille de 600 paires de bases.

3.3.2.1. Protocole mutagénique utilisant le $MnCl_2$ (0,5 mM)

Dans ce PCR on a ajouté le $MnCl_2$ ([c]finale=0,5 mM) avec la Taq polymérase pour créer des mutations.

Tableau VI : PCR mutagénique avec l'utilisation du $MnCl_2$.

Les chiffres représentent les volumes en μl ajoutés.

N ^o tubes	ADN (1 $\mu g/\mu l$)	Buffer (10X)	MgCl ₂ (50mM)	dNTPs (2mM)	Amorces (10 μM)	Taq (5U// μl)	MnCl ₂ (5mM)
1	0	10	6	20	5 _(7KS) +5 _(3SK)	0,5	10
2	1	10	6	20	5 _(7KS) +5 _(3SK)	0,5	10

On jauge tous les tubes avec de l'eau déionisée stérile pour avoir un volume final de 100 μl . Après le PCR, on fait une précipitation à l'éthanol «4.2.1.» et on met sur gel. Les profils sur gel permettent de vérifier les résultats de la réaction de ce PCR (figure 11).

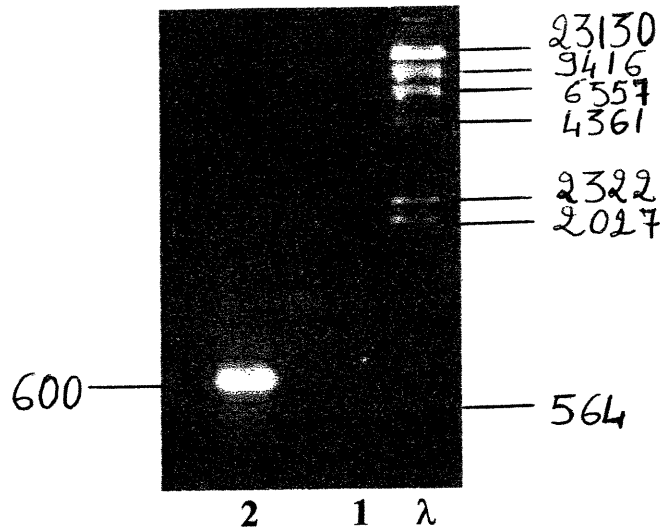


Figure 11. Profil du PCR (utilisation du $MnCl_2$). λ ; $\lambda/HindIII$ (le marqueur du poids moléculaire utilisé qui est digéré par $HindIII$) (voir « 8.2. »). **1 et **2** représentent les tubes déjà mentionnés dans le tableau VI. Le tube **1** représente le témoin négatif, l'amplification a bien fonctionné dans le tube **2**. Les chiffres représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).**

3.3.2.2. Protocole standard utilisant la Taq polymérase

Dans ce PCR on a utilisé le protocole standard, dans lequel on utilise la Taq polymérase seulement.

Tableau VII : PCR mutagénique avec le protocole standard. Les chiffres représentent les volumes en μl ajoutés.

N ^o tubes	ADN ($1\mu g/\mu l$)	Buffer (10X)	MgCl ₂ (50mM)	dNTPs (2mM)	Amorces ($10\mu M$)	Taq (5U// μl)
1	1	10	3	20	5(7KS)+5(3SK)	0,5
2	1	10	3	20	5(7KS)+5(3SK)	0,5
3	1	10	6	20	5(7KS)+5(3SK)	0,5
4	1	10	6	20	5(7KS)+5(3SK)	0,5

On jauge tous les tubes avec de l'eau déionisée stérile pour avoir un volume final de 100 μ l. Après le PCR, on fait une précipitation à l'éthanol «4.2.1.» et on met sur gel. Les profils sur gel permettent de vérifier les résultats de la réaction de ce PCR (figure 12).

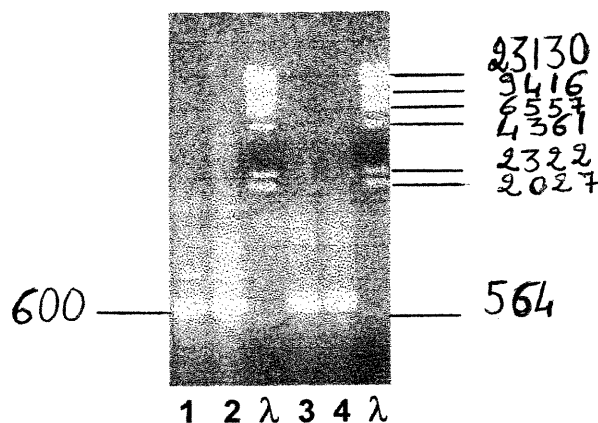


Figure 12. Profil du PCR (Taq polymérase seulement). λ ; λ /HindIII (le marqueur du poids moléculaire utilisé qui est digéré par HindIII) (voir « 8.2.»). **1, 2, 3** et **4** représentent les tubes déjà mentionnés dans le tableau VII. Les chiffres représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).

3.4. PCR dirigé

Pour ce PCR on a utilisé la Vent polymérase et trois PCR (figure 13), pour l'élimination de la boucle *nif*-spécifique.

3.4.1. Les conditions d'amplifications

On a procédé de la même façon que le PCR aléatoire, pour la mise au point des différentes concentrations (d'ADN et du MgSO₄), afin d'optimiser les conditions d'amplifications. Les amorces utilisées pour ce

PCR sont représentées dans le tableau III (3SK et 7KS) et le tableau IX (4B et 4C).

3.4.1.1. ADN

La concentration optimale est la même que celle obtenue dans la réaction de PCR mutagénique aléatoire qui est de 10 ng/100µl.

3.4.1.2. MgSO₄

Tableau VIII : réactions de PCR contenant différentes concentrations de MgSO₄.

N°tube	Réactifs et ADN (ng)	MgSO ₄ (mM)	Amplifications
1	constant	1	–
2	constant	2	++
3	constant	4	++
4	constant	6	+

3.4.2. Protocole utilisé

Pour la réaction chacun des tubes (volume total de 100 µl) contient : 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO₄ 0,1% triton X-100, 2 unités de la Vent polymérase et 200 µM de chacun des dNTPs, MgSO₄ (2 mM ou 4 mM), ADN (10 ng/100µl).

Les amorces sont : 3SK, 7KS (tableau III) et 4B, 4C (tableau IX), utilisées de la façon suivante : PCR1 : 7KS et 4C pour la partie C-terminal (350 pb) ; PCR2 : 3SK et 4B pour la partie N-terminal (200 pb) ; PCR3 : 3SK et 7KS pour donner le fragment de *nifF* sans la boucle. Toutes les amorces étaient à une concentration de 0,4 µM.

Tableau IX : oligonucléotides 4B et 4C nécessaires à l'élimination de la boucle *nif*-spécifique pour le PCR dirigé.

Nom	Séquence
4C	5' CAGCTGCCGGGGTGGAGCGAATTTATCAGCGG 3'
4B	5' AAATTCGCTCCACCCCGGCAGCTGGCCGTCGC 3'

L'amplification dans le thermocycleur se fait dans les mêmes conditions que le PCR précédent c.a.d : T⁰ dénaturation= 1 minute 30 secondes à 94 °C, T⁰ hybridation= 2 minutes à 66 °C, T⁰ extension= 2 minutes 30 secondes à 72 °C.

ÉLIMINATION DE LA BOUCLE PAR PCR

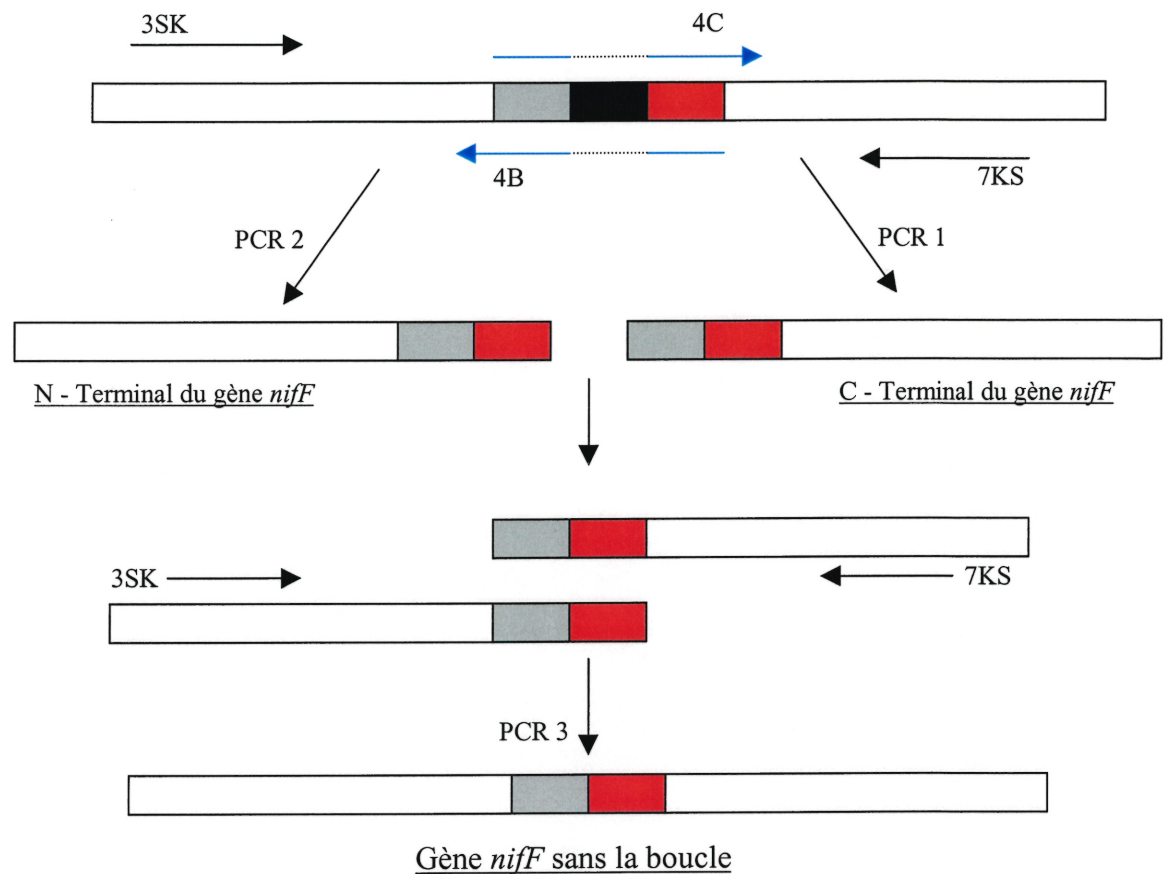


Figure 13. PCRs utilisés pour l'élimination de la boucle *nif*-spécifique dans le gène *nifF* : les amorces utilisés dans le PCR1 sont 7KS et 4C ; les amorces utilisés dans le PCR2 sont 3SK et 4B ; les amorces utilisés dans le PCR3 sont 3SK et 7KS pour donner le fragment de *nifF* sans la boucle. Les flèches en bleu indiquent la direction de l'amplification. Les parties du gène *nifF* qui seront amplifiées sont colorées en gris et en rouge. La partie colorée en noire représente la boucle *nif*-spécifique du gène *nifF* qui ne sera pas amplifiée par les deux premiers PCRs.

3.4.2.1. PCR pour mutagenèse dirigée (élimination de la boucle *nif*-spécifique)

3.4.2.1.1. PCR1 et PCR2 (formation des sous-produits C-terminal et N-terminal)

Tableau X : produits utilisés pour PCR1 et PCR2 (les chiffres représentent les volumes en μl ajoutés).

N° tubes	ADN ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Buffer (10X)	MgSO ₄ (100mM)	dNTPs (10mM)	Amorces ($10\mu\text{M}$)	Vent ($2\text{U}/\mu\text{l}$)
1	1	10	4	2	4(7KS) + 4(C)	1
2	1	10	2	2	4(7KS) + 4(C)	1
3	1	10	2	2	4(7KS) + 4(C)	1
4	1	10	4	2	4(3SK) + 4(B)	1
5	1	10	2	2	4(3SK) + 4(B)	1
6	1	10	2	2	4(3SK) + 4(B)	1
7	0	10	2	2	4(7KS) + 4(C)	1

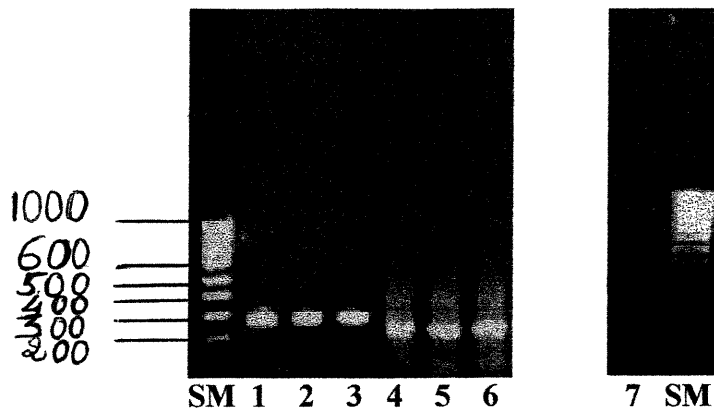


Figure 14. Profil de l'amplification des sous-produits PCR1 (C-terminal) et PCR2 (N-terminal). SM ; le marqueur du poids moléculaire utilisé (Fermentas N^o SM0242) (voir « 8.2.»). Le tube 7 représente le témoin négatif. L'amplification dans les puits **1, 2 et 3** (tubes 1, 2 et 3) donne la partie C-terminale du gène *nifF*. L'amplification dans les puits **4, 5 et 6** (tubes 4, 5 et 6) donne la partie N-terminale du gène *nifF* (tableau X). Les chiffres représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).

On procède à la purification des produits du PCR1 et PCR2 par le protocole du GeneClean (avec la méthode QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol) déjà mentionné dans matériel et méthode «4.2.2.». On a sélectionné l'amplification du tube 2(P2) pour C-terminale (PCR1) et l'amplification du tube 5(P5) pour N-terminale (PCR2), afin d'effectuer un troisième PCR pour la formation du gène *nifF* sans la boucle.

3.4.2.1.2. PCR3 (formation du gène *nifF* sans la boucle)

Tableau XI : produits utilisés pour PCR3 : P2 est le produit du PCR1 (tube 2) et P5 est le produit du PCR2 (tube 5). Les chiffres représentent les volumes en μl ajoutés.

N° tubes	ADN	Buffer (10X)	MgSO ₄ (100mM)	dNTPs (10mM)	Amorces (10 μM)	Vent 2U/ μl
1	0	10	4	2	4(3SK) + 4(7KS)	1
2	10+10 (P2+P5)	10	2	2	4(3SK) + 4(7KS)	1
3	10+10 (P2+P5)	10	4	2	4(3SK) + 4(7KS)	1

Après le PCR, on fait une précipitation à l'éthanol «4.2.1.» et on met sur gel (voir figure 15).

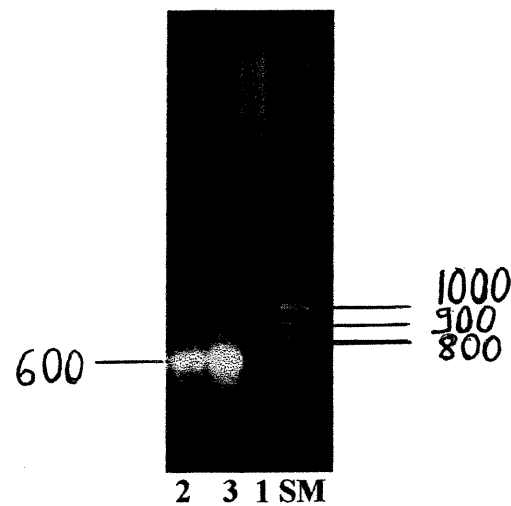


Figure 15. Profil du PCR3. SM est le marqueur du poids moléculaires (SM : Fermentas N° SM0242). Le tube 1 représente le témoin négatif. L'amplification dans les puits **2 et 3** (tubes 2 et 3) permet la formation du gène *nifF* sans la boucle (tableau XI).

4. Purification et ligation (63)

4.1. Enzymes de restriction utilisées

Les enzymes de restriction *Pst*I, *Hind*III et *Hin*fI ont été fournies par GIBCO-BRL. Le gène étudié *nif*F (548 pb) est cloné entre *Pst*I et *Hind*III dans les deux plasmides : pGGK₁ et pGGK₃. *Hin*fI a été utilisé pour l'analyse de la mutation dirigée.

4.2. Méthodes de purification

Les méthodes de purification affectent grandement les résultats obtenus lors de la ligation de l'ADN ainsi que la transformation des souches. On a utilisé les méthodes suivantes :

4.2.1. Purification après le PCR

Précipitation à l'éthanol : on ajoute à la solution contenant de l'ADN, 1/100 de NaCl (5M), 3v d'éthanol 100%, incubé à -20°C pendant 15-20 minutes. Centrifuger 10 minutes, laver le culot avec l'éthanol 70% (-20°C), sécher à l'air libre 10 minutes et resuspendre dans 30 μl d'eau déionisée stérile, mettre sur gel d'électrophorèse ou conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

4.2.2. Purification à partir du gel d'électrophorèse

On a utilisé deux méthodes pour la purification de l'ADN :

(1) GeneClean : mettre le morceau du gel coupé contenant de l'ADN, 250 μl de NaI (le morceau d'agarose doit être submergé) dans un tube eppendorf et laisser 1- 2 mn à 55°C (jusqu'à ce que le gel soit dissous). Ajouter 10 μl de "glass milk", mettre sur glace pendant 15 mn, centrifuger

30 secondes. Laver le culot 3 fois avec TNE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Resuspendre dans 30 µl d'eau déionisée stérile. Laisser incubé 5 mn à 55⁰C, centrifuger 2 mn, récupérer l'ADN, conserver à 4⁰C jusqu'à utilisation.

(2) GeneClean avec la méthode QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol (Handbook 09/97)

4.2.3. Purification par l'extraction au phénol-chloroforme

Pour un volume d'ADN, ajouter ½ volume de phénol tamponné, ½ volume de chloroforme. Mélanger sur vortex 10-15 secondes, centrifuger pour séparer les phases, transférer la phase aqueuse supérieure dans un autre tube eppendorf, réextraire la phase aqueuse avec 1 volume de chloroforme (CHCl₃-alcool isoamylique), retransférer la phase aqueuse, on peut l'utiliser tel quel ou conserver à 4⁰C.

4.3. Ligation

La T₄DNA ligase et le tampon de ligation sont fournis par GIBCO-BRL. Le volume réactionnel est de 20 µl, le protocole utilisé est: mettre 10 µl d'ADN contenant l'insert *nifF* digéré avec *Hind*III et *Pst*I avec 5 µl d'ADN du vecteur de clonage pGGK₂ (digéré avec *Hind*III et *Pst*I). Ajouter 2 µl de tampon de ligation (10X), 1 µl de T₄ligase à 4⁰C, 2 µl d'H₂O. Incuber à 12⁰C pendant 18 heures.

5. Transformation

Les cellules compétentes des souches *K. pneumoniae* (UN1789) et *E.coli* (DH5α) ont été préparées par la méthode standard et conservées en aliquots de 200 µl à -70⁰C (63). Le protocole utilisé est : ajouter 30 µl d'ADN plasmidique à un aliquot de 200 µl des cellules compétentes

fraîchement décongelées, incuber sur glace à 30 mn, faire un choc thermique à 37 °C pendant 2 mn, incuber sur glace 5 mn, ajouter 1 ml de LB, incuber à 37 °C 45 mn avec agitation (\approx 300 rpm). Centrifuger (2000 rpm) à 4 °C 10 mn, resuspendre le culot dans 200 μ l de LB, étaler sur une gélose de LB (avec Cm et Ap pour *K. pneumoniae* et Cm pour *E. coli*) (63).

6. Criblage des souches et les conditions de croissance

Il est important de noter que les transformants de UN1789 seront utilisés pour les analyses de la mutagenèse aléatoire et les transformants de DH5 α pour les analyses de la mutagenèse dirigée.

6.1. Sélection des transformants

Les transformants obtenus ont été incubés sur le milieu LB (avec Cm et Ap pour *K. pneumoniae* et Cm pour *E. coli*) à 37 °C en aérobie pendant 24 heures. Les transformants seront mis en culture liquide pour faire un stock pour les études subséquentes.

6.2. Conditions de croissance utilisées pour le criblage des souches mutantes

Le criblage se poursuit seulement pour les mutants qui résultent du PCR au hasard c'est à dire les transformants de *K. pneumoniae* UN1789 (13). On procède à la sélection des souches mutantes par l'utilisation du MM (milieu minimum) avec Cm qu'on incube en anaérobiose à 30 °C pendant 3 jours, en utilisant l'IPTG (concentration de 500 μ M). On anticipe les résultats suivants : (1) croissance de toutes les souches sur LB avec Cm. (2) Aucune croissance sur MM (Cm) sans l'IPTG (absence de l'inducteur). (3) La croissance sur MM (Cm) avec

l'IPTG dépend de la mutation des souches criblées, on crible celles qui ne corrigent pas le phénotype de UN1789 c'est à dire les souches Nif⁻ qui ne poussent pas sur MM sans NH₄. Donc, on procède à une sélection négative, les souches sélectionnées sont celles qui ne poussent pas sur MM avec l'IPTG.

7. Isolement d'ADN plasmidique

7.1. Croissance bactérienne

Une colonie, prélevée de la gélose sert à l'ensemencement d'un tube de bouillon LB de 5 ml avec l'antibiotique approprié pour chaque souche. Les tubes sont incubés toute la nuit à 37 °C avec agitation de 300 rpm, ensuite la culture de nuit est centrifugée (microcentrifugeuse à vitesse maximale) pendant 10 mn à T⁰ de la pièce et le culot est conservé sur glace ou à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

7.2. Techniques d'extraction des plasmides

7.2.1. Extraction plasmidique selon la méthode de lyse alcaline

Cette méthode est utilisée pour l'extraction des plasmides à partir d'*E. coli*. Ajouter au culot des cellules des cultures de nuit 200 µl de TEG (10 mM de glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8) et 10 mM EDTA (pH 8)), lysozyme (5mg/ml), mélanger au vortex, incubé sur glace 15 mn. Ajouter 400 µl de NaOH-SDS (0.2N NaOH et 1% SDS), mélanger doucement en inversant, incubé sur glace 5 mn. Ajouter 300 µl de KOAc 3 M à pH 4,8 en agitant doucement, incubé à -20 °C pendant 10 mn, centrifuger à 4 °C pendant 15 mn (14,000 rpm), récupérer le surnageant dans un tube eppendorf de 1,5 ml, remplir le plus possible avec l'isopropanol froid -20 °C, mélanger par plusieurs inversions successives,

incuber à -20°C pendant 15 mn. Centrifuger à 4°C (14,000 rpm) pendant 15 mn, rincer le culot avec 200 μl d'éthanol (70% à -20°C), sécher au vide dans un Speed-Vac 7 mn. Resuspendre le culot dans 200 μl de TE (10 mM Tris-HCl (pH 8) et 1 mM EDTA). Faire une précipitation à l'éthanol (voir «4.2.1»), resuspendre le culot dans 30 μl de TE (10 mM Tris-HCl (pH 8) et 1 mM EDTA) + RNase (40 $\mu\text{g/ml}$) (70).

7.2.2. Extraction avec Qiagen

Cette méthode est utilisée pour l'extraction plasmidique de l'ADN utilisé pour le protocole du PCR. On a utilisé la trousse de la Maxi-Plasmid/Purification protocol.

7.2.3. Extraction plasmidique spécifique à *Klebsiella pneumoniae*

Pour *K. pneumoniae*, il est important d'utiliser ce protocole afin d'obtenir l'ADN plasmidique, à cause de la présence des nucléases. Récupérer le culot à partir d'une culture de nuit de 5ml par centrifugation, ajouter 150 μl du tampon TE (25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA) +RNase A (ajouter 10 μl de 10 mg/ml RNase A (DNase-free) par ml du tampon TE), mélanger au vortex pendant 3-4 mn. Ajouter 150 μl de la solution de lyse fraîchement préparée (0,2 N 10 M NaOH, 1% SDS, 44 ml d' H_2O), mélanger délicatement en inversant le tube, laisser à la température de la pièce 5 mn, ajouter 150 μl de 2,55 M KOAc, pH 4,8 (10 ml 3 M KOAc, pH 4,8 +1,7 ml d' H_2O), mélanger par plusieurs inversions, laisser sur glace pendant 5 mn. Centrifuger 5 mn, mettre le surnageant (400 μl) dans un tube propre, ajouter à la phase aqueuse un volume égal de phenol:chloroforme (1:1), mélanger au vortex 10 secondes, centrifuger 5 mn pour séparer les phases. Transférer la phase aqueuse dans un tube propre, ajouter 1 ml d'éthanol à 100%, mélanger par

inversions, mettre sur glace pendant 10 mn, centrifuger 10 mn pour récupérer l'ADN plasmidique, laver le culot d'ADN avec 1 ml d'éthanol à 70%. Sécher au vide dans un speed-Vac 7 mn. Resuspendre l'ADN dans 80 µl d'eau déionisée stérile, analyser 1 µl sur un mini gel agarose (71).

7.2.4. Extraction plasmidique par la méthode de lyse alcaline/traitement au PEG

Ce protocole suit les mêmes étapes que la lyse alcaline, sauf qu'après le séchage au speed-vac avant la précipitation à l'éthanol, on ajoute ici un traitement au PEG. Traitement au PEG : dissoudre le culot dans 32 µl d'eau déionisée stérile, ajouter 8 µl de 4 M NaCl, puis 40 µl de 13% de PEG 8000 stérile, mélanger doucement et laisser sur glace pendant 20 mn. Récolter le culot par centrifugation dans une microcentrifugeuse à vitesse maximale pendant 15 mn à 4 °C. Laver le culot avec 500 µl d'éthanol à 70%, resuspendre le culot dans 20 µl d'eau déionisée stérile. Conserver à -20 °C (72).

7.2.5. Détermination de la concentration d'ADN plasmidique

La concentration en ADN des extractions est évaluée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à une absorbance de 260 (1 unité d'absorbance= 50 µg/ml pour l'ADN double brin). Le rapport entre la lecture de la DO à 260 nm et la DO à 280 nm fournit l'estimation de la pureté de l'ADN. L'ADN pure donne un rapport de 1,8.

8. Electrophorèse sur gel pour l'analyse de l'ADN plasmidique

8.1. Gel d'agarose

Toutes les électrophorèses sur gel (63), ont été effectués avec les réactifs suivants :

- * le tampon TAE 50X contient 242g de Tris-Base, 57,1 ml d'acide acétique glacial, 200 ml d'EDTA 0,5 M à un pH de 8 et compléter avec de l'eau déionisée stérile à un litre.
- * Le tampon d'échantillon (5X): composé de 2% p/v de xylène cyanol, 2% de bleu de bromophénol dans 50% de glycérol, 50 mM d'EDTA et du tampon TAE (5X final), tout est complété avec de l'eau déionisée stérile pour avoir le volume final désiré.
- * Une solution concentrée à 1mg/ml de bromure d'éthidium est préparée dans de l'eau déionisée stérile et ajoutée à une concentration finale de 0,5µg/ml dans le gel et le tampon TAE (1X).
- * Les gels d'agarose pour le PCR sont à une concentration de 1,5%, alors que les gels d'analyse plasmidique sont à 1%.

8.2. Témoins utilisés

*Lambda (λ) a été fournis par NEB, et digéré par *Hind*III. Ce marqueur est préparé avec le protocole suivant : 200 µl de λ (100 µg), 40 µl du tampon 2 NEB (10X), 10 µl de l'enzyme *Hind*III (100 unités) et 150 µl d'H₂O déionisée stérile, on incube à 37 °C pendant 2 heures, et on ajoute 100 µl de tampon de chargement pour avoir un volume final de 500 µl. 7 fragments d'ADN résultent de cette digestion (en pb) : 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 et 564. Ce marqueur a été utilisé pour la mutagenèse aléatoire.

* Échantillons de Fermentas (SM) : Gen Ruler KbdNA Ladder fournis par Fermentas.

(1) SM0242 : pMLX DNA complètement digérés par *Eco147I* et *PvuI*. 11 fragments d'ADN résultent de cette digestion (en pb) : 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, et 80. Ce marqueur a été utilisé pour l'analyse de *nifF* (PCR de la mutagenèse dirigée).

(2) SM0331 : plasmides complètement digérés par les endonucléases de restriction appropriées. 21 fragments d'ADN résultent de cette digestion (en pb) : 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000 (bande de référence), 2500, 2000, 1500, 1200, 1031 (bande de référence), 900, 800, 700, 600, 500 (bande de référence), 400, 300, 200 et 100. Ce marqueur a été utilisé pour l'extraction de l'ADN (mutagenèse dirigée).

9. Extraction des protéines

9.1. Conditions de croissance bactérienne et surexpression de NifF à petite échelle

Les souches contenant les plasmides mutés sont inoculées (à partir des vials conservés à -70°C) sur des géloses avec l'antibiotique approprié et incubées à 37°C pendant 24 h. Ensuite à partir des colonies récoltées, on inocule un tube contenant 5 ml de 2xYT avec Cm, qu'on incube à 37°C avec agitation pendant 24 h. Onensemence 300 μl de la culture précédente un flacon erlenmeyer de 125 ml qui contient 25 ml de 2xYT avec Cm. Quand la DO_{600} est à 1 on ajoute l'IPTG (500 μM) et on incube à 37°C avec agitation (300 rpm) pendant une nuit (61).

9.2. L'extraction de la protéine (suite)

Ensuite, les bactéries sont récoltées par une centrifugation (10,000 rpm) pendant 20 mn. Le culot obtenu est resuspendu dans 1 ml de Tris-HCl pH 7,4 ; 100 mM EDTA ; 10 mM glucose et lysozyme (5 mg/ml), mettre sur glace pendant une heure. Puis on procède à l'isolement partiel de la protéine NifF par la méthode suivante : garder les tubes dans un bain de glace et faire une sonication aux ultrasons à 4 °C pendant 2 à 3 mn. Centrifuger (12,000 rpm) pendant une heure afin d'éliminer les débris cellulaires, récupérer le surnageant qui contient la protéine (62). On procède ensuite à l'analyse de NifF par la spectrophotométrie et le gel de polyacrylamide.

9.3. Dosage du contenu du FMN par la spectrophotométrie

Le spectre d'absorption du surnageant est obtenu entre 300 et 600 nm par le spectrophotomètre «Hewlett-Packard 8452A». Cette méthode nous indique la présence ou l'absence du FMN (flavine) car la flavine liée à la flavodoxine a une absorption maximale à 450 nanomètre.

9.4. Préparation du gel de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide étaient préparés par le protocole décrit par Laemmli (69). La solution d'acrylamide (30:0,8) contient : 30 g d'acrylamide, 0,8 g N'N'-Bis-méthylène acrylamide et de l'eau jusqu'à 100 ml. La solution est filtrée et conservée à 4 °C pendant un mois à l'obscurité. Le tampon d'échantillon 2X est fait de 1 ml d'eau déionisée stérile, 2 ml de tampon de concentration (0,063 M final), 4 ml de SDS (10% final), 1 ml de 2-mercaptoéthanol (5% final), 2 ml de glycérol (100%) (10% final) et 0,02 ml de bleu de bromophénol (0,001% final). Le tampon électrode 10X est préparé avec 30,3 g Tris base, 142,7 g de

glycine, jauger à 1 litre avec de l'eau déionisée stérile. Ensuite pour l'électrophorèse, on utilise 75 ml de tampon électrode (1X final), 7,5 ml de SDS (1%) et on jauge à 750 ml avec de l'eau déionisée stérile.

Le gel de concentration à 4% est composé de :

Eau déionisée	6,2 ml
Tampon de concentration (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	2 ml
Acrylamide/ Bis (30:0,8)	1,7 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl
10% AP (persulfate d'ammonium)	50 µl
TEMED	10 µl

Le gel de séparation à 12% est composé de :

Eau déionisée	6,7 ml
Tampon de séparation (1,5M Tris-HCl, pH 6,8)	3,7 ml
Acrylamide/ Bis (30:0,8)	7,5 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl
10% AP (persulfate d'ammonium)	50 µl
TEMED	10 µl

9.5. Préparation de l'échantillon

On préleve 100 µl de la protéine extraite, on ajoute 100 µl du tampon de l'échantillon (2X). Les échantillons sont placés à 100 °C pendant 2 mn et on dépose 20 µl dans un puit du gel de polyacrylamide.

Le gel est soumis à un voltage de 160 V pendant environ 45 mn. Le gel est ensuite immédiatement coloré au bleu de comassie pendant 15 mn.

9.6. Témoin utilisé

Le standard moléculaire utilisé (P) contient les marqueurs de taille suivants :

Marqueurs de taille	poids moléculaire (Daltons)
Phosphorylase b	94 000
Bovine Serum Albumine (BSA)	67 000
Ovalbumine	43 000
Carbonic anhydrase	30 000
Soy bean trypsin inhibitor	20 000
α Lactalbumine	14 400

Le poids moléculaire de la flavodoxine (NifF) est de 19,6 kDa.

10. Séquençage

Pour le séquençage, la trousse du «BIG DYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction» ABI PRISM PERKIN ELMER/ Applied Biosystems a été utilisé selon les spécifications du fabricant avec 400 ng d'ADN et de 3,2 picomole des amorces (tableau XII).

Tableau XII : oligonucléotides nécessaires au séquençage des fragments d'ADN d'intérêt.

Nom	Séquence
HT2	5' TGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCA 3'
PT1	5' ATGGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGG 3'

L'appareil utilisé pour l'amplification de l'ADN est un modèle «Gene Amp 2400 : PCR System/Perkin Elmer». Pour l'amplification, on a utilisé le programme de 25 cycles comme suit : 10 secondes à 96 °C, 5 secondes à 50 °C et 4 minutes à 60 °C. Les produits obtenus sont purifiés avec une précipitation à l'éthanol et séquencés. Le séquençage a été fait dans le laboratoire du Docteur Eric Cohen, l'appareil utilisé pour ce séquençage est du type «ABI Prism 310 Genetic analyzer». Les résultats du séquençage seront analysés avec un microordinateur en utilisant le programme «the Genetics Computer Group Series of Programs» (GCG).

RÉSULTATS

A. MUTAGÉNÈSE ALÉATOIRE

1. Criblage des souches mutées issues du PCR avec $MnCl_2$

Les produits de ce PCR étaient ligués dans le vecteur (pGGK₂) et transformés dans *K. pneumoniae* UN1789 (*nifF*). Les transformants qui ont poussé sur LB (Cm et Ap) ont été inoculés sur des pétris contenant le milieu minimum pour *K. pneumoniae* (MM «sans NH₄» avec Cm et Ap) avec l'IPTG (l'inducteur). Ces pétris seront ensuite incubés sous les conditions de fixation de l'azote atmosphérique (en anaérobiose, à 30°C pendant 3 jours). Dans toutes les jarres anaérobies utilisées pour ce criblage, il y a le témoin négatif (UN1789) et le témoin positif (UN). Les souches sélectionnées sont ceux qui ne poussent pas sous ces conditions et qu'on nomme selon leurs numéros respectifs : 21, 22, 23, 76, 77, 78, 87, 93, 94, 95 et 102.

Afin de confirmer la présence du gène *nifF*, les plasmides des transformants sélectionnés ont été isolés et digérés avec les enzymes de restrictions *Hind*III et *Pst*I (figure 16).

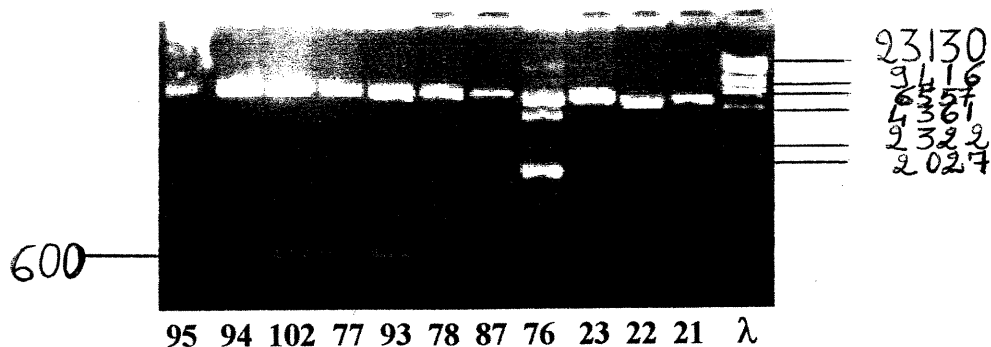


Figure 16. ADN plasmidique digéré (*Hind*III et *Pst*I) chez les souches 21, 22, 23, 76, 77, 78, 87, 93, 94, 95 et 102. λ ; λ /*Hind*III (le marqueur du poids moléculaire utilisé qui est digéré par *Hind*III) (voir matériel et méthodes «8.2.»). Seulement les plasmides 102, 77 et 93 possèdent l'insert *nifF*. 76 a été éliminé (présence de bandes supplémentaires). Les chiffres sur la figure représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).

Après la surexpression de la flavodoxine chez les souches sélectionnées, le gel de polyacrylamide a permis de vérifier sa présence (NifF) et le spectrophotomètre a permis de vérifier la présence du FMN. Les souches 77 et 93 n'expriment pas la protéine NifF (les résultats ne sont pas présentés). C'est seulement la souche 102 qui semble exprimer NifF (figure 26). La spectrophotométrie a été utilisée pour déterminer si cette protéine contient le FMN. La méthode elle même a été vérifiée en utilisant des témoins négatifs (pGGK₂) et positifs (pGGK₃). Pour pGGK₂ il n'y a pas d'absorption à 450nm en absence et en présence de l'inducteur (figure 17). Cependant pour pGGK₃ il y a l'absorption seulement en présence de l'inducteur (figure 18 et 19), ce qui confirme la présence du FMN chez la flavodoxine quand elle est surexprimée. Pour la souche 102,

il n'y a pas d'absorption à 450nm en présence de l'inducteur, donc elle ne contient pas le FMN (figure 20).

Certains type de mutants possèdent des mutations qui rendent la flavodoxine incapable de lier le FMN. Afin d'éliminer ce type de mutants, il est donc très important de s'assurer de la présence de cet FMN, qui est nécessaire pour le fonctionnement de la flavodoxine, d'où l'utilité de la technique de spectrophotométrie.

* Analyse de la flavine chez les témoins

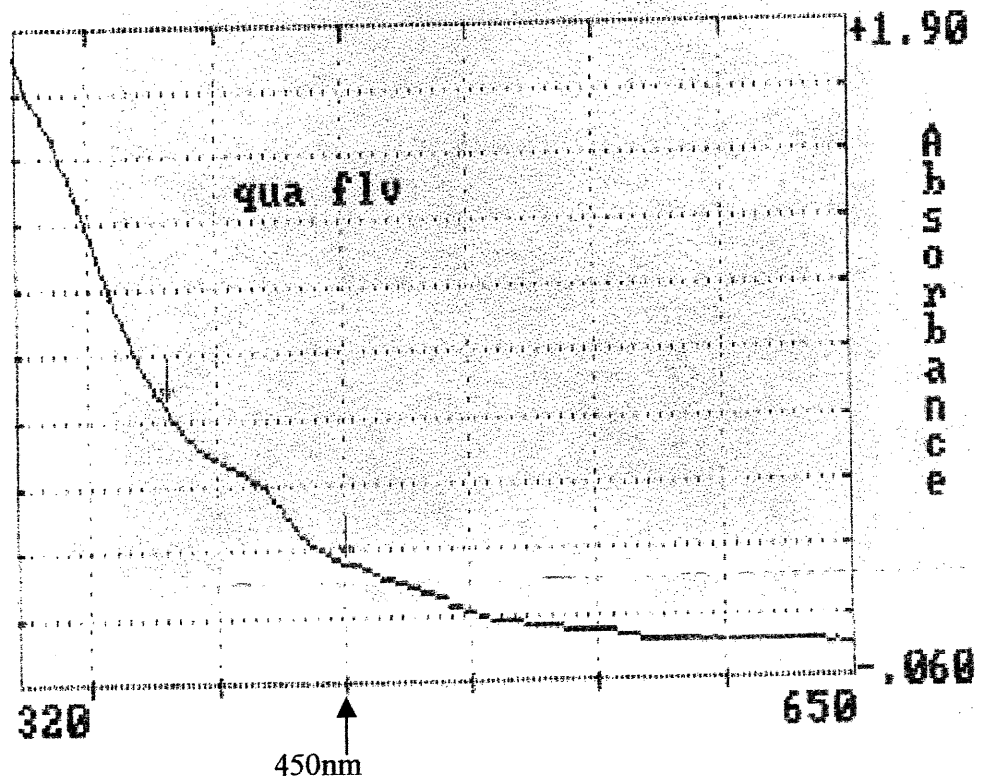


Figure 17. Quantification de la flavodoxine du témoin pGGK₂ sans l'induction. Le spectre d'absorption est mesuré entre 320 et 650nm. À 450nm, il n'y a pas d'absorption (pas de flavine).

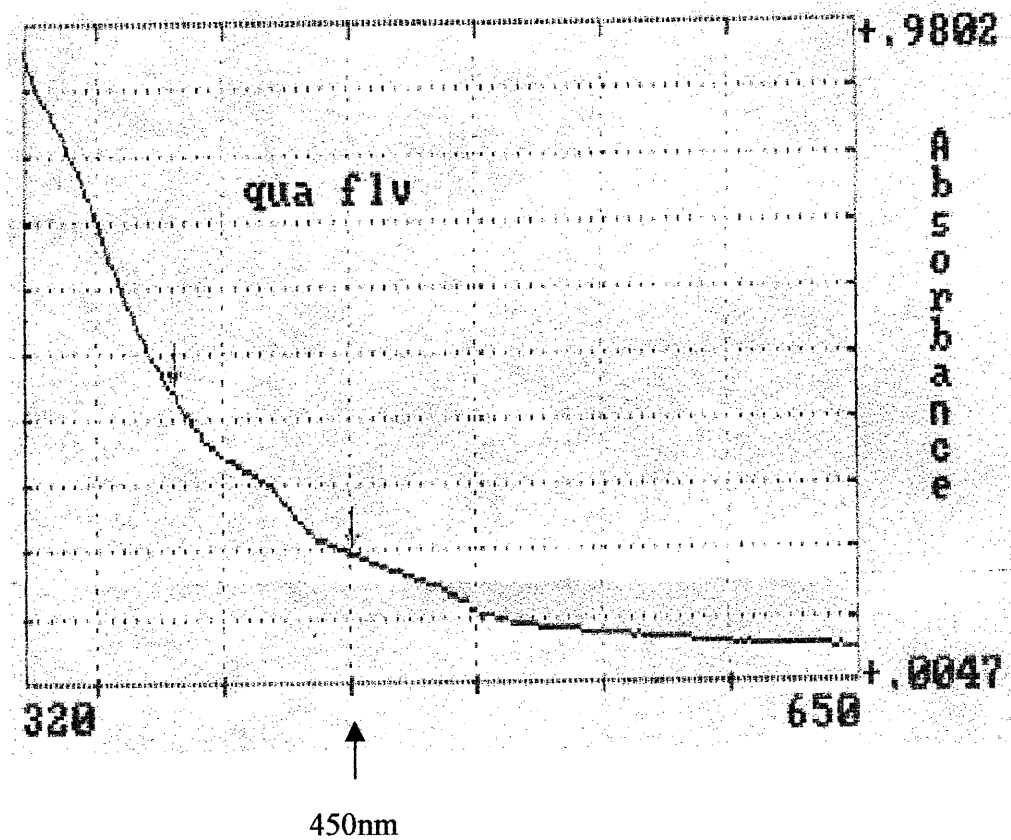


Figure 18. Quantification de la flavodoxine du témoin pGGK₃ sans l'induction. Le spectre d'absorption est mesuré entre 320 et 650nm. À 450nm, il n'y a pas d'absorption (pas de flavine).

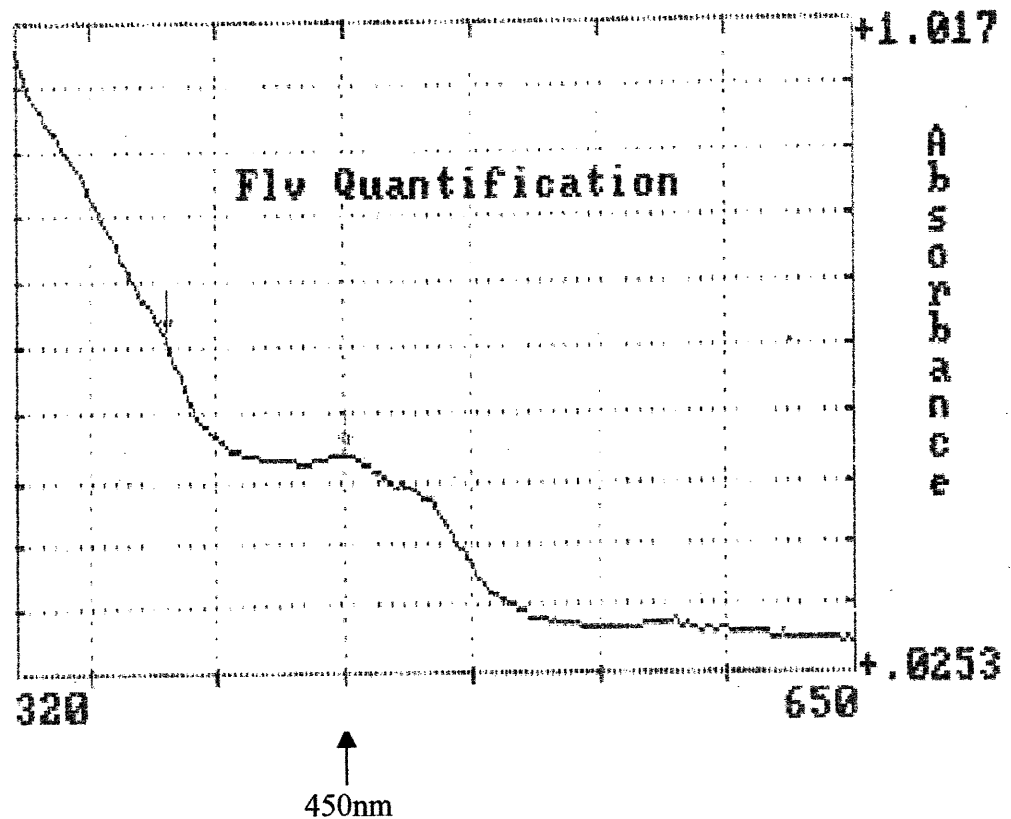


Figure 19. Quantification de la flavodoxine du témoin pGGK₃ avec l'induction. Le spectre d'absorption est mesuré entre 320 et 650nm. À 450nm il y a l'absorption (présence de flavine). On peut calculer la concentration de la flavodoxine par la formule suivante : $C=A/\epsilon$ (avec ϵ = coefficient d'absorptivité molaire, A=absorbance et C= concentration). On sait que ϵ (450nm)=10,1mM⁻¹ pour la flavine dans la flavodoxine, donc ici pour pGGK₃ A_{450} = 0,362, C=35μM.

* Analyse de la flavine chez la souche S102 (avec l'IPTG)

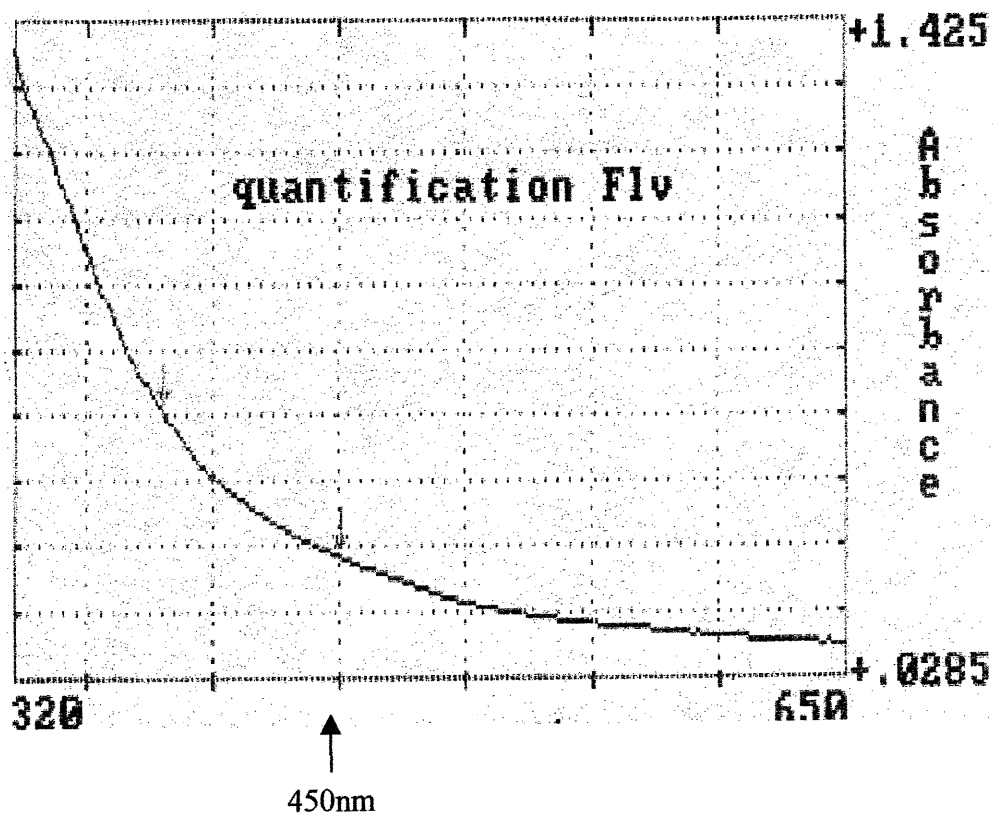


Figure 20. Quantification de la flavodoxine de la souche S102 avec l'induction. Le spectre d'absorption est mesuré entre 320 et 650nm. À 450nm il n'y a pas d'absorption (pas de flavine).

Donc, la souche 102 qu'on a sélectionné dans cette partie, celle qui semble exprimer la protéine, ne possède pas la flavine. Cette souche est sans doute mutée dans un acide aminé essentiel à la fixation de la FMN et par conséquent, on ne poursuit pas l'analyse de celle-ci.

2. Criblage des souches mutées issues du PCR standard

On a procédé à la même façon pour le criblage des souches comme celle déjà mentionnée dans la partie «1».

Tableau XIII : les souches sélectionnées du PCR mutagénique avec la Taq polymérase.

N° de souches	Croissance sur MM(sans NH ₄) Sans l'IPTG	Croissance sur MM(sans NH ₄) avec l'IPTG
118	Pas de croissance	Pas de croissance
119 à 122	Pas de croissance	Pas de croissance
124 à 126	Pas de croissance	Pas de croissance
128 à 131	Pas de croissance	Pas de croissance
134 à 137	Pas de croissance	Pas de croissance
139	Pas de croissance	Pas de croissance
145 à 148	Pas de croissance	Pas de croissance
185	Pas de croissance	Pas de croissance
113 (témoin)	Pas de croissance	Croissance

D'autres souches qui ne sont pas présentées dans ce tableau, sont celles qui n'ont pas poussé sur MM (sans NH₄ et sans l'IPTG) et qui ont poussé sur MM (sans NH₄ et avec l'IPTG), comme la souche 113 présentée comme témoin ci-haut (tableau XIII).

Les figures suivantes nous permettent de voir si les souches citées dans le tableau ci-haut, possèdent l'insert *nifF* (figure 21A, 21B, 21C, 21D et 21E).

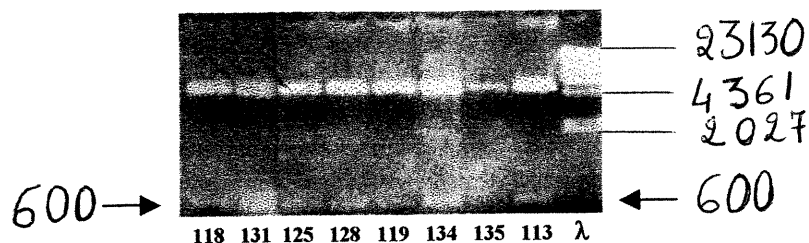


Figure 21A. ADN plasmidique digéré (*Hind*III et *Pst*I) chez les souches 113, 118, 119, 125, 128, 131, 134 et 135. λ ; λ /*Hind*III (le marqueur du poids moléculaire utilisé qui est digéré par *Hind*III) (voir matériel et méthodes «8.2.»). Les flèches indiquent la position de l'insert *nifF*. Le plasmide 135 ne possède pas l'insert *nifF*. Les chiffres sur la figure représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).

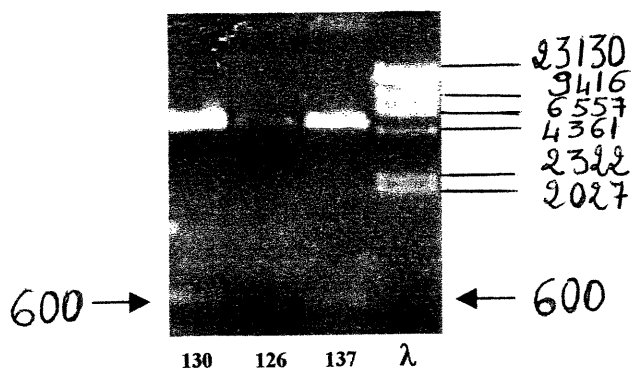


Figure 21B. ADN plasmidique digéré (*Hind*III et *Pst*I) chez les souches 130, 126 et 137. λ ; λ /*Hind*III (le marqueur du poids moléculaire utilisé qui est digéré par *Hind*III) (voir matériel et méthodes «8.2.»). Les flèches indiquent la position de l'insert *nifF*. Le plasmide 126 ne possède pas l'insert *nifF*.

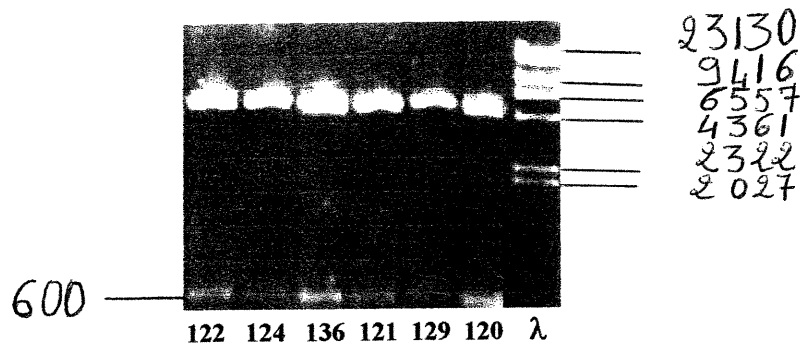


Figure 21C. ADN plasmidique digéré (*Hind*III et *Pst*I) chez les souches 120, 121, 122, 124, 129 et 136. λ ; λ /*Hind*III (le marqueur du poids moléculaire utilisé qui est digéré par *Hind*III) (voir matériel et méthodes «8.2.»). Toutes les souches possèdent l'insert *nifF*. Les chiffres sur la figure représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).

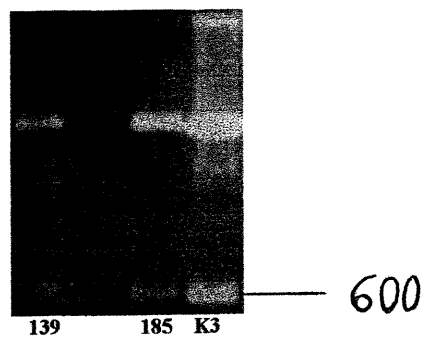


Figure 21D. ADN plasmidique digéré (*Hind*III et *Pst*I) chez les souches 139 et 185. K3 est le témoin positif pGGK₃ (digéré avec *Hind*III et *Pst*I).

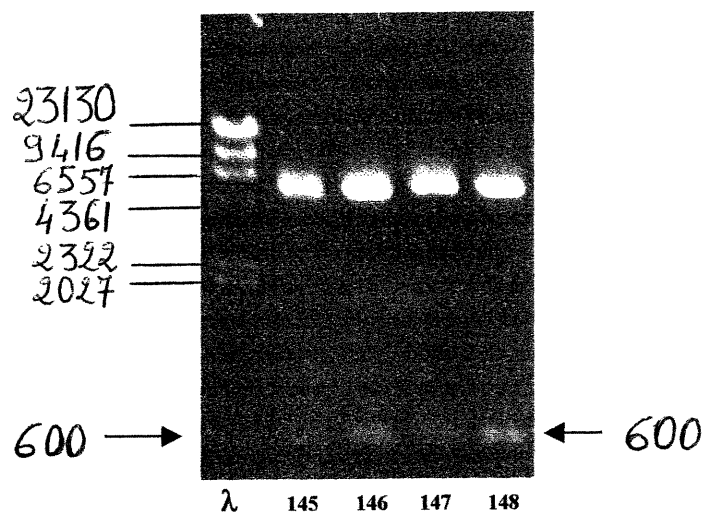


Figure 21E. ADN plasmidique digéré (*Hind*III et *Pst*I) chez les souches 145, 146, 147 et 148. λ ; λ /*Hind*III (le marqueur du poids moléculaire utilisé qui est digéré par *Hind*III) (voir matériel et méthodes «8.2.»). Les flèches indiquent la position de l'insert *nifF*. Les chiffres sur la figure représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).

Les plasmides sélectionnés sont ceux qui possèdent l'insert *nifF* et qu'on nomme selon les numéros respectifs des souches. Ces plasmides sont pNiff113, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 128, 129, 130, 131, 134, 136, 137, 139, 145, 146, 147, 148, et 185.

Lors du dernier criblage, 21 souches ont été sélectionnées pour faire suite aux analyses subséquentes. Les résultats du spectrophotomètre de deux souches seulement seront représentées ci-dessous. La souche S185 qui possède la flavine (figure 22) et la souche S125 qui n'a pas la flavine (figure 23). La présence de la flavine sans l'inducteur chez ces derniers a été aussi vérifiée : il n'y a eu aucune absorption à 450nm pour S185 et S125 (les résultats ne sont pas présentés) (tableau XIV).

* Analyse de la flavine chez la souche S185

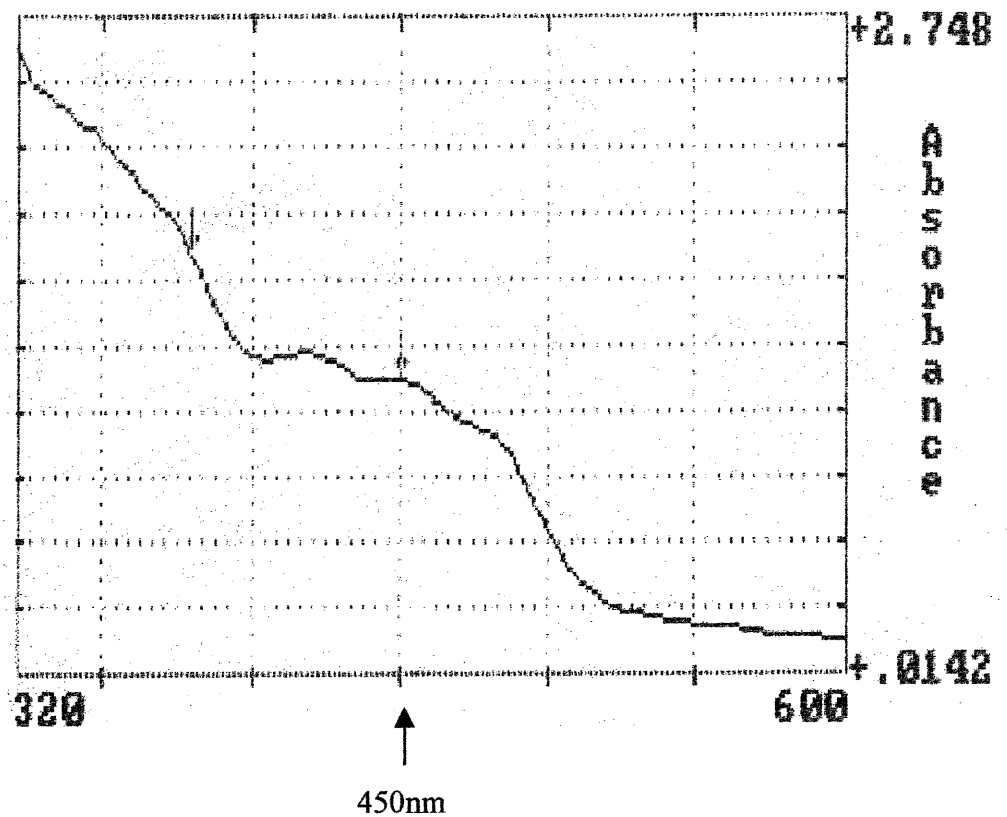


Figure 22. Quantification de la flavodoxine de la souche S185 avec l'induction. Le spectre d'absorption est mesuré entre 320 et 650nm. À 450nm il y a l'absorption (présence de FMN). La concentration de la flavodoxine est calculé par la formule suivante : $C=A/\epsilon$ (avec ϵ = coefficient d'absorptivité molaire, A=absorbance et C= concentration) ; on sait que $\epsilon(450\text{nm})=10,1\text{mM}^{-1}$ pour la flavine dans la flavodoxine, A_{450} est l'absorbance de la flavine liée à la protéine. Ici pour S185, $A_{450}= 1,236$, donc $C=122 \mu\text{M}$.

* Analyse de la flavine chez la souche S125

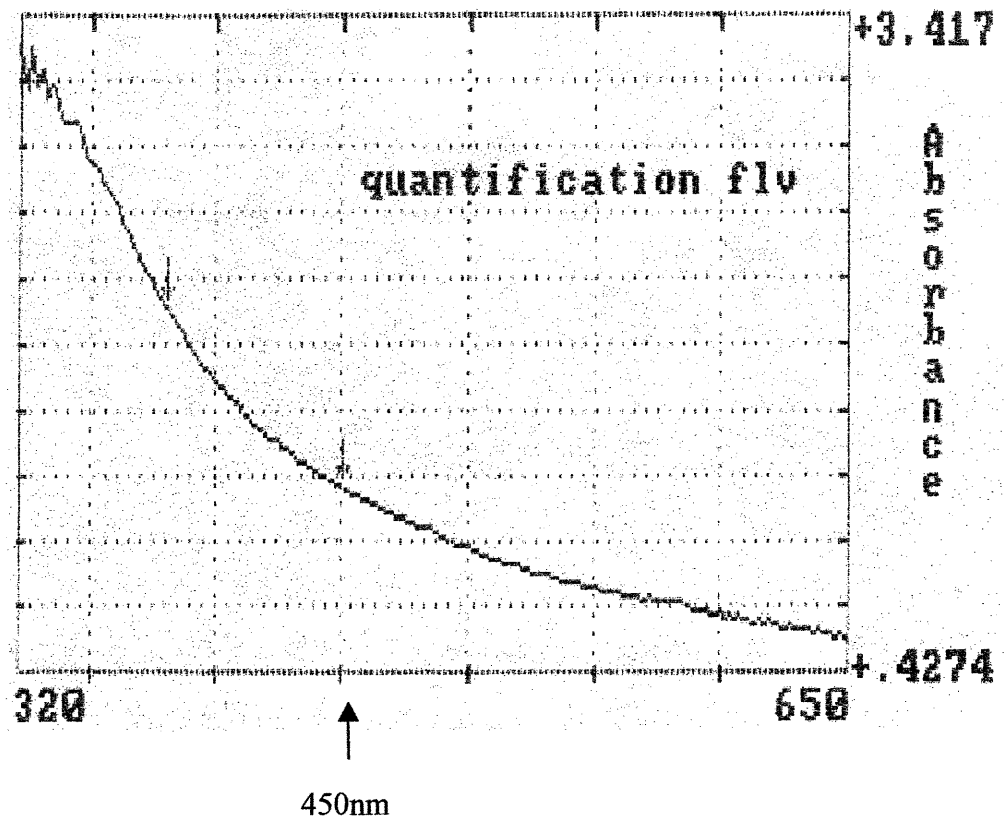


Figure 23. Quantification de la flavodoxine de la souche S125 avec l'induction. Le spectre d'absorption est mesuré entre 320 et 650nm. À 450nm il n'y a pas d'absorption (absence de FMN).

Tableau XIV : ce tableau représente l'analyse des souches sélectionnées (qui possèdent l'insert *nifH*) par le spectrophotomètre pour la mise en évidence la présence de la flavine (FMN). A_{450} est l'absorbance de la flavine à 450 nanomètre.

N° souches	Spectre d'absorption (450nm)	A_{450}	Présence ou absence de la flavine
S113	absorption	0,881	présence de FMN
S118	absorption	0,534	présence de FMN
S119	absorption	0,874	Présence de FMN
S120	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S121	absorption	1,195	présence de FMN
S122	absorption	0,851	présence de FMN
S124	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S125	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S128	absorption	0,981	présence de FMN
S129	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S130	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S131	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S134	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S136	absorption	1,137	présence de FMN
S137	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S139	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S145	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S146	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S147	Pas d' absorption	–	absence de FMN
S148	absorption	0,646	présence de FMN
S185	absorption	1,236	présence de FMN

Donc les souches qui ont la flavine (FMN) sont S113, S118, S119, S121, S122, S128, S136, S148 et S185

Le gel de polyacrylamide nous a permis de vérifier la présence de la flavodoxine chez les souches sélectionnées (figure 24, 25 et 26).

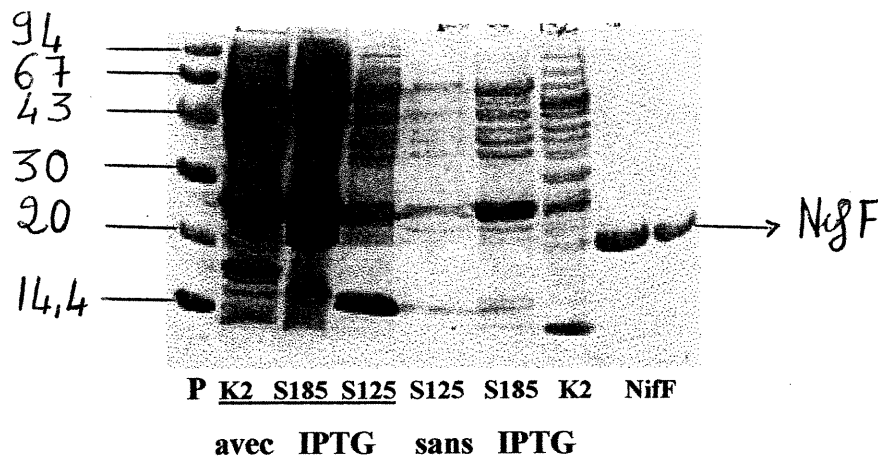


Figure 24. Électrophorèse de la flavodoxine sur le gel de polyacrylamide chez le témoin K2 et chez les souches mutantes S125 et S185. P ; marqueur de poids moléculaire de haut en bas : phosphorylase b (94 KDa), bovine serum albumine (BSA) (67 KDa), ovalbumine (43 KDa), carbonic anhydrase (30 KDa), soy bean trypsin inhibitor (20 KDa) et α Lactalbumine (14,4 KDa) (voir matériel et méthodes «9.6.»). NifF représente le poids moléculaire de notre protéine soit la Flavodoxine qui est de 19,6 kDa. NifF est absente, ou peut être tronquée chez S125 (souche 125), par contre elle est présente chez S185 (souche 185). Les souches induites par l'IPTG sont soulignées.

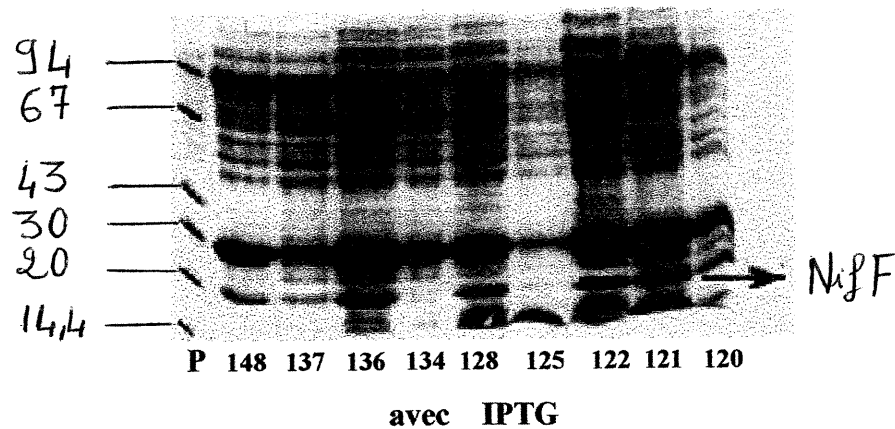


Figure 25. Électrophorèse sur le gel de polyacrylamide des extraits bruts des souches mutantes S148, S137, S136, S134, S128, S125, S122, S121 et S120 (S, souche). P ; marqueur de poids moléculaire (voir matériel et méthodes «9.6.»). Les flèches indiquent NifF (19,6 KDa). NifF est absente seulement chez les souches S125 et S134.

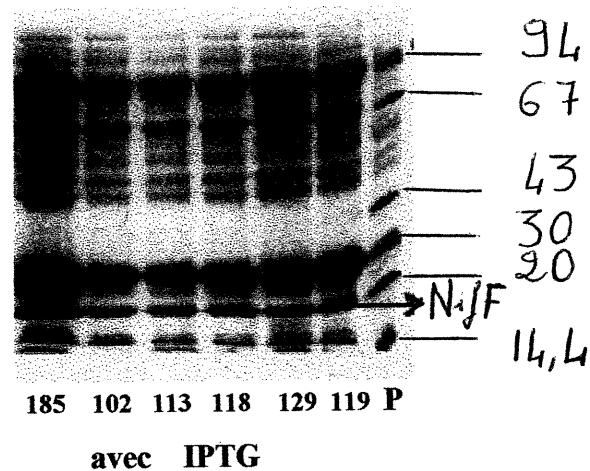


Figure 26. Électrophorèse sur le gel de polyacrylamide des extraits bruts des souches mutantes S185, S102, S113, S118, S129 et S119 (S, souche). P ; marqueur de poids moléculaire (voir matériel et méthodes «9.6.»). NifF est présente chez toutes les souches citées ci-haut. Les chiffres sur la figure sont en kilodaltons (KDa).

À la suite du séquençage et l'analyse «GCG», seulement les plasmides qui ont moins de 10 mutations au niveau de l'insert *nifF* seront représentés. Le plasmide pNifF113 sera représenté comme témoin.

55 CGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGAGCGCAACATGGCGAACATTGG *KpnifF*
 1 CGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGAGCGCAACATGGCGAACATTGG *nifF* pNifF185

105 TATTTTCTTTGGCACCAGATACCGGTAAAACCCGCAAAATCGCGAAAATGA *KpnifF*
 51 TATTTTCTTTGGCACCAGATACCGGTAAAACCCGCAAAATCGCGAAAATGA *nifF* pNifF185

151 TCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAACCGC *KpnifF*
 101 TCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAACCGC *nifF* pNifF185

205 ACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCACGCC *KpnifF*
 151 ACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCACGCC *nifF* pNifF185

255 GACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGGCCGGATGCGAAAAGCG *KpnifF*
 201 GACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGGCCGGATGCGAAAAGCG *nifF* pNifF185

305 AGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGGCCTCGACGACGCCAGCCTGAAAGGG *KpnifF*
 251 AGTCA TGGAGCGAATTTATCAGCGGCCTCGACGACGCCAGCCTGAAAGGG *nifF* pNifF185

355 AAAACCGTGGCGCTGTTTCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGGACAA *KpnifF*
 301 AAAACCGTGGCGCTGTTTCGGCCTCGATGATCAGAGAGGCTATCCGGACAA *nifF* pNifF185

405 CTTCGTCAGCGGGATGCGCCCCTGTTCGACGCCCTGAGCGCGCGCGGGC *KpnifF*
 351 CTTCCTAGCGGGATGCGCCCCTGTTCGACGCCCTGAGCGCGCGCAGGC *nifF* pNifF185

455 CGCAGATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGG 485 *KpnifF*
 401 CGCAGATGATTGGCACCTGGCCAAATGACG 431 *nifF* pNifF185

Figure 27. Comparaison des Séquences nucléotidiques du gène *nifF* chez *K. pneumoniae* (*KpnifF* «sauvage») et l'insert *nifF* chez pNifF185 (*nifF* pNifF185) : les nucléotides chez *K. pneumoniae* sont énumérés à partir de l'extrémité 5'. Les nucléotides en gras montrent le site de la mutation dans le gène *nifF* et ceux qui sont en gras et soulignés montrent la mutation chez le mutant pNifF185 (8 mutations).

51 AACCGGTATTTCAACCCCCTTTCCGACAGGAGCGCAACATGGCGAACA *KpnifF*
 24 AACCCGTATTTCAACCCCCTTTCCGACAGGAGCGCAACATGGCGAACA *nifF* pNifF148

 101 TTGGTATTTCTTTGGCACCAGATACCGGTAAAACCCGCAAAAATCGCGAAA *KpnifF*
 74 TTGGTTTTTCTTTGGCACCAGATACCGGTAAAACCCGCAAAAATCGCGAAA *nifF* pNifF148

 151 ATGATCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAA *KpnifF*
 124 ATGATCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAA *nifF* pNifF148

 201 CCGCACGACGCTGGACGACTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCA *KpnifF*
 174 CCGCACGACGCTGGACGACTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCA *nifF* pNifF148

 251 CGCCGACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGGCCGGATGCGAA *KpnifF*
 224 CGCCGACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGGCCGGATGCGAA *nifF* pNifF148

 301 AGCGAGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGCCTCGACGACGCCAGCCTGAA *KpnifF*
 274 AGCGAGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGCCTCGACGACGCCAGCCTGAA *nifF* pNifF148

 351 AGGGAAAACCGTGGCGCTGTTCCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGG *KpnifF*
 324 AGGGAAAACCGTGGCGCTGTTCCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGG *nifF* pNifF148

 401 ACAACTTCGTCAGCGGGATGCGCCCCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGC *KpnifF*
 374 ACAACTTCGTCAGCGGGATGCGCCCCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGC *nifF* pNifF148

 451 GGC GCGCAGATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCGC *KpnifF*
 424 GGC GCGCAAATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCGC *nifF* pNifF148

 501 GTCCTCGGCGCTGGAAGGCGACCGCTTTGTTGGGCTGGTGCTGGATCAGG *KpnifF*
 474 GTCCTCGGCGCTGGAAGGCGACCGCTTTGTTGGGCTGGTGCTGGATCAGG *nifF* pNifF148

 551 ATAACCAGTTCGACCAGACCGAAGCGCGTCTGGCGAGCTGGCTTGAGGAG *KpnifF*
 524 ATAACCAGTTCGACCAGACCGAAGCGCGTCTGGCGAGCTGGCTTGAGGAG *nifF* pNifF148

 601 ATTAACGCACCGTGCTGTAGGCGTTAA *KpnifF*
 574 ATTAACGCACCGTGCTGTAGGCGTTCA 600 *nifF* pNifF148

Figure 28. Comparaison des Séquences nucléotidiques du gène *nifF* chez *K. pneumoniae* (*KpnifF* «sauvage») et l'insert *nifF* chez pNifF148 (*nifF* pNifF148) : les nucléotides en gras montrent le site de la mutation dans le gène *nifF* et ceux qui sont en gras et soulignés montrent la mutation chez le mutant pNifF148 (5 mutations).

5 CGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGAGCGCAACATGGCGAACATTGG *KpnifF*
29 CGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGAGCGCAACATGGCGAACATTGG *nifF* pNifF136

55 TATTTTCTTTGGCACCGATACCGGTAAAAACCGCAAAATCGCGAAAATGA *KpnifF*
79 TTTTTCTTTGGCACCGATACCGGTAAAAACCGCAAAATCGCGAAAATGA *nifF* pNifF136

105 TCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAACCGC *KpnifF*
129 TCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAACCGC *nifF* pNifF136

155 ACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCACGCC *KpnifF*
179 ACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCACGCC *nifF* pNifF136

205 GACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGGCCGGATGCGAAAGCG *KpnifF*
229 GACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGGCCGGATGCGAAAGCA *nifF* pNifF136

255 AGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGCCTCGACGACGCCAGCCTGAAAGGG *KpnifF*
279 AGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGCCTCGACGACGCCAGCCTGAAAGGG *nifF* pNifF136

305 AAAACCGTGGCGCTGTTCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGGACAA *KpnifF*
329 AAAACCGTGGCGCTGTTCGGCCTCGGCAATCAGAGAGGCTATCCGGACAA *nifF* pNifF136

355 CTTGTCAGCGGGATGCGCCCGCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGCGGGC *KpnifF*
379 CTTGTCAGCGGGATGCGCCCGCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGCGGGC *nifF* pNifF136

405 CGCAGATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCGCGTCC *KpnifF*
429 CGCAATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCCCGTCC *nifF* pNifF136

455 TCGGCGCTGGAAGGCGACCGCTTTGTTGGGCTGGTGCTGGATCAGGATAA *KpnifF*
479 TCGGCGCTGGAAGGCGACCGTTTTGTGGGCTGGTGCTGGATCAGGATAA *nifF* pNifF136

505 CCAGTTCGACCAGACCGAAGCGCTCTGGCGAGCTGGCTTGAGGAGATTA *KpnifF*
529 CCAGTTCGACCAGACCGAAGCGCTCTGGCGAGCTGGCTTGAGGAATTA *nifF* pNifF136

555 AACGCACCGTGCTGTAGGCGTTC *KpnifF*
579 AACCCACCGTGCTGTAGGCGTTC **600** *nifF* pNifF136

Figure 29. Comparaison des Séquences nucléotidiques du gène *nifF* chez *K. pneumoniae* (*KpnifF* «sauvage») et l'insert *nifF* chez pNifF136 (*nifF* pNifF136) : les nucléotides en gras montrent le site de la mutation dans le gène *nifF* et ceux qui sont en gras et soulignés montrent la mutation chez le mutant pNifF136 (8 mutations).

51 AACGCGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGA GCGCAACATGGCGAACA *KpnifF*
 580 AACGCGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGA GCGCAACATGGCGAACA *nifF* pNifF113

 101 TTGGTATTTTCTTTGGCACCGATAACCGGTAACCCGCAAAATCGCGAAA *KpnifF*
 530 TTGGTATTTTCTTTGGCACCGATAACCGGTAACCCGCAAAATCGCGAAA *nifF* pNifF113

 151 ATGATCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAA *KpnifF*
 480 ATGATCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCCGGTCAACATTAA *nifF* pNifF113

 201 CCGCACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCCTGCTGGGCA *KpnifF*
 430 CCGCACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCCTGCTGGGCA *nifF* pNifF113

 251 CGCCGACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGGCCGGATGCGAA *KpnifF*
 380 CGCCGACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGG CTGGAGGCCGGATGCGAA *nifF* pNifF113

 301 AGCGAGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGGCCTCGACGACGCCAGCCTGAA *KpnifF*
 348 AGCGAGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGGCCTCGACGACGCCAGCCTGAA *nifF* pNifF113

 351 AGGGAAAACCGTGGCGCTGTTCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGG *KpnifF*
 307 AGGGAAAACCGTGGCGCTGTTCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGG *nifF* pNifF113

 401 ACAACTTCGTCAGCGGGATGCGCCCGCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGC *KpnifF*
 257 ACAACTTCGTCAGCGGGATGCGCCCGCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGC *nifF* pNifF113

 451 GGCGCGCAGATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCGC *KpnifF*
 207 GGCGCGCAGATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCGC *nifF* pNifF113

Figure 30. Comparaison des Séquences nucléotidiques d'une partie du gène *nifF* chez *K. pneumoniae* (*KpnifF* «sauvage») et l'insert *nifF* chez pNifF113 (*nifF* pNifF113) : les nucléotides chez ce mutant ne montrent aucune mutation, ce qui confirme les résultats de sa croissance dans les conditions de fixation d'azote.

À la suite de la traduction du gène *nifF* en acides aminés, on obtient le schéma ci-dessous. Le schéma permet la comparaison de la protéine NifF chez les souches mutantes sélectionnées et chez la souche sauvage.

	1		50
Kpneu	MANIGIFFGT	DTGKTRKIAK	MIHKQLGELA DAPVNINRTT LDDFMAYPVL
pNifF185	MANIGIFFGT	DTGKTRKIAK	MIHKQLGELA DAPVNINRTT LDDFMAYPVL
pNifF148	MANIG F FFGT	DTGKTRKIAK	MIHKQLGELA DAPVNINRTT LDDFMAYPVL
pNifF136	MANIG F FFGT	DTGKTRKIAK	MIHKQLGELA DAPVNINRTT LDDFMAYPVL
pNifF113	MANIGIFFGT	DTGKTRKIAK	MIHKQLGELA DAPVNINRTT LDDFMAYPVL
	51		100
Kpneu	LLGTPTLGDG	QLPGLEAGCE	SESWSEFISG LDDASLKGKT VALFGLGDQR
pNifF185	LLGTPTLGDG	QLPGLEAGCE	SESWSEFISG LDDASLKGKT VALFGL D DQR
pNifF148	LLGTPTLGDG	QLPGLEAGCE	SESWSEFISG LDDASLKGKT VALFGLGDQR
pNifF136	LLGTPTLGDG	QLPGLEAGCE	S KSWSEFISG LDDASLKGKT VALFGL G NQR
pNifF113	LLGTPTLGDG	QLPGLEAGCE	SESWSEFISG LDDASLKGKT VALFGLGDQR
	101		150
Kpneu	GYPDNFVSGM	RPLFDALSAR	GAQMIGSWPN EGYEFSASSA LEGDRFVGLV
pNifF185	GYPDNF L SGM	RPLFDALSAR	R PQMIG T WPN D GYEFSASSA LEGDRFVGLV
pNifF148	GYPDNFVSGM	RPLFDALSAR	GAQMIGSWPN EGYEFSASSA LEGDRFVGLV
pNifF136	GYPDNFVSGM	RPLFDALSAR	GAQMIGSWPN EGYEFS P SSA LEGDRFVGLV
pNifF113	GYPDNFVSGM	RPLFDALSAR	GAQMIGSWPN EGYEFSASSA LEGDRFVGLV
	151		177
Kpneu	LDQDNQFDQT	EARLASWLEE	IKRTVL*
pNifF185	LDQDNQFDQT	EARLASWLEE	IKRTVL*
pNifF148	LDQDNQFDQT	EARLASWLEE	IKRTVL*
pNifF136	LDQDNQFDQT	EARLASWLEE	IK P TVL*
pNifF113	LDQDNQFDQT	EARLASWLEE	IKRTVL*

Figure 31. Alignement de la séquence en acides aminés de la protéine NifF chez la souche sauvage et chez les mutants étudiés : les AA sont énumérés à partir de l'extrémité 5'. *Kpneu*= *K. pneumoniae* (souche sauvage). Les AA en rouge, en gras et soulignés montrent la mutation dans la protéine NifF chez les mutants pNifF185, pNifF148 et pNifF136. Le témoin pNifF113 ne montre aucune mutation. Les astérisques indiquent le codon stop. La traduction a été réalisée par le programme «ExPASy Translate Tool».

B. MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE

Les produits de PCR pour la mutagenèse dirigée ont été ligués dans pGGK₂ et transformés dans DH5α (*E. coli*). Afin de confirmer la présence du gène *nifF* chez la souche sélectionnée (S2), le plasmide (pNifF2) de ce transformant a été digéré avec les enzymes de restrictions *Hind*III et *Pst*I.

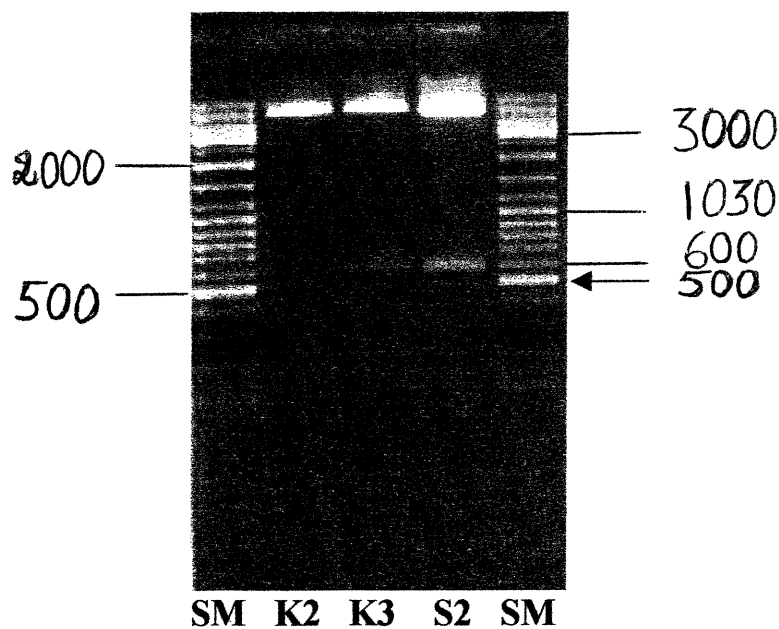


Figure 32. Patron d'ADN chez le plasmide pNifF2 et les témoins (pGGK₂ et pGGK₃) digérés avec *Hind*III et *Pst*I. SM ; le marqueur du poids moléculaires (SM : SM0331) (voir matériel et méthodes «8.2.»). S2 ; est la souche qui porte le plasmide pNifF2, K2 est le témoin négatif pGGK₂ et K3 est le témoin positif pGGK₃. Les chiffres représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).

La boucle *nif*-spécifique du gène *nifF* possède un site de restriction *HinfI*, ce qui permettra de faire des tests préliminaires sur les plasmides sélectionnés (figure 33). Afin de vérifier l'absence de la boucle, le gène *nifF* a été digéré avec l'enzyme de restriction *HinfI*.

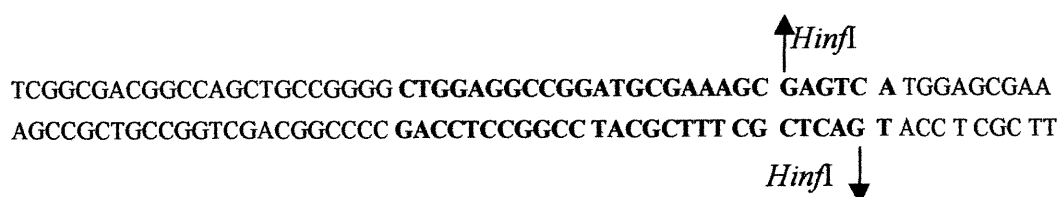


Figure 33. Cette séquence représente la portion du gène *nifF* entre les bases 261 et 318. Cette portion du gène possède la boucle *nif*-spécifique qui est représentée en gras (entre 283 et 309 pb). Les flèches indiquent le site de restriction *HinfI*.

Une autre digestion du gène *nifF* avec *HinfI* chez le plasmide pNifF2 a été effectuée mais, avec une plus grande quantité d'ADN (figure 34).

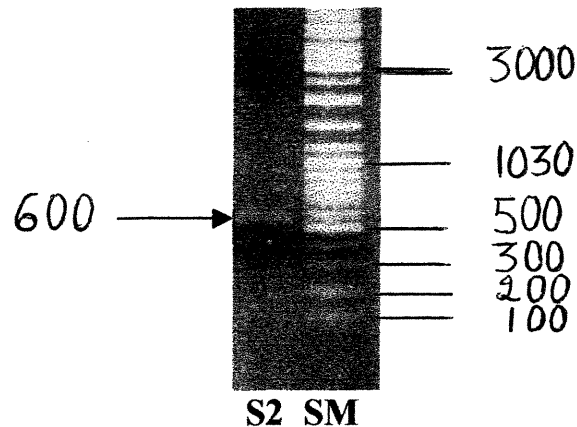


Figure 34. Profil de digestion du gène *nifF* avec *HinfI* chez le plasmide pNifF2 (S2). SM ; le marqueur du poids moléculaires utilisé (SM : SM0331) (voir matériel et méthodes «8.2.»). Ici la flèche indique l'intensité de la bande d'ADN du gène *nifF* (600 pb) qui n'a pas été digéré par *HinfI*. Les chiffres représentent le poids moléculaire des fragments d'ADN en paire de bases (pb).

Le dosage de la flavine (FMN) est possible grâce au spectrophotomètre. Les résultats seront présentés sous forme de graphe. Les résultats de spectrophotométrie de la souche sélectionnée (S2) avec l'induction (IPTG), sont présentés dans la figure 35. La présence de NifF sans l'inducteur chez ce dernier a été aussi vérifiée, il n'y a eu aucune absorption à 450nm pour S2 (sans l'IPTG) (les résultats ne sont pas présentés).

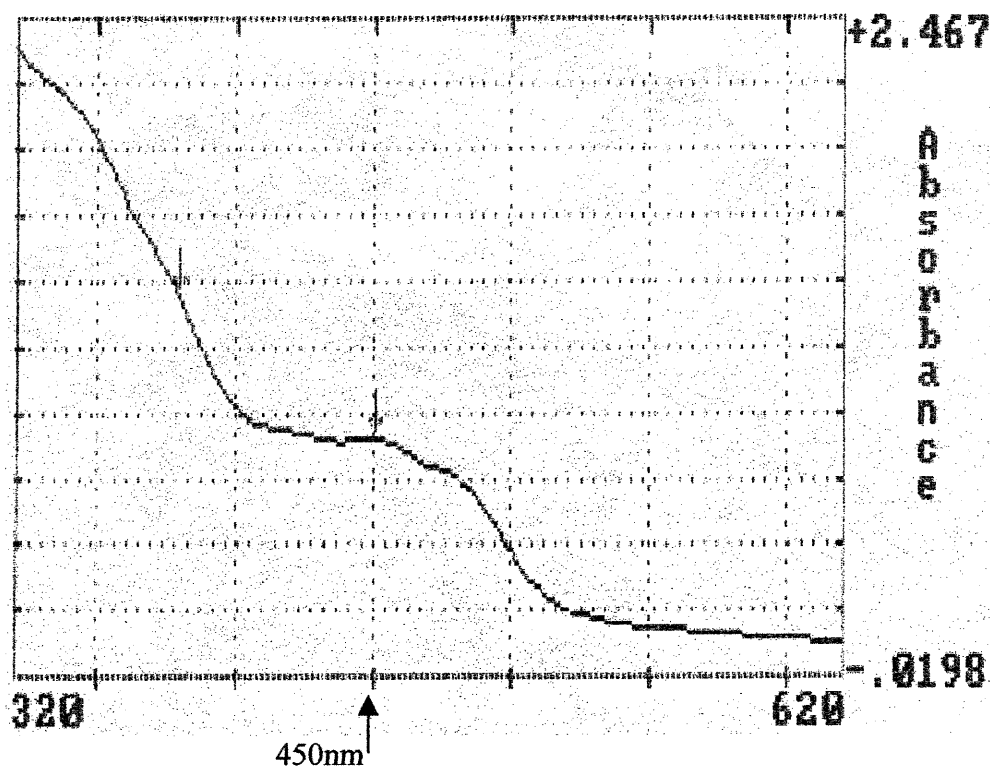


Figure 35. Quantification de la flavodoxine chez la souche S2 avec l'induction. Le spectre d'absorption est mesuré entre 320 et 650nm. À 450nm, il y a une absorption correspondant à la présence de la flavine (FMN). $A_{450}=0,905$, $C= 89,6\mu\text{M}$.

Le gel de polyacrylamide a permis la vérification de la présence de NifF chez S2 (qui possède le plasmide pNifF2). Les témoins pGGK₂ et pGGK₃ seront présentés aussi (figure 36).

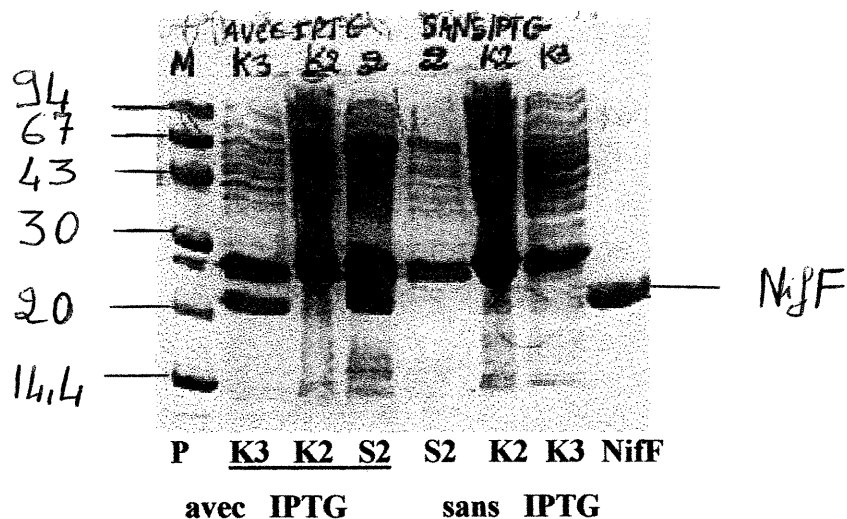


Figure 36. Électrophorèse de la flavodoxine sur le gel de polyacrylamide chez les témoins K2, K3 et chez la souche mutante S2. Les témoins sont : pGGK₂ (K2 ; témoin négatif) et pGGK₃ (K3 ; témoin positif). S2 ; le mutant NifF2. P ; marqueur de poids moléculaire de haut en bas : phosphorylase b (94 KDa), bovine serum albumine (BSA) (67 KDa), ovalbumine (43 KDa), carbonic anhydrase (30 KDa), soy bean trypsin inhibitor (20 KDa) et α Lactalbumine (14,4 KDa) (voir matériel et méthodes «9.6.»). NifF est l'échantillon de la protéine NifF pure. La flavodoxine est présente chez la souche (S2) qui possède le plasmide pNifF2. Les souches induites par l'IPTG sont soulignées.

Le séquençage du plasmide pNifF2 a été effectué comme mentionné dans la section «10» de matériel et méthodes. L'analyse des séquences a été fait par le programme «GCG». Les résultats sont présentés sous forme de comparaisons entre le gène *nifF* chez *K. pneumoniae* sauvage (*KpnifF*) et le gène *nifF* de ce mutant (figure 37).

51 AACGCGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGAGCGCAACATGGCGAACA *KpnifF*
 580 AACGCGTATTTTCAACCCCTTTTCCGACAGGAGCGCAACATGGCGAACA *nifF* pNifF2

 101 TTGGTATTTTCTTTGGCACCGATACCGGTA AAAACCCGCAAAAATCGCGAAA *KpnifF*
 530 TTGGTATTTTCTTTGGCACCGATACCGGTA AAAACCCGCAAAAATCGCGAAA *nifF* pNifF2

 151 ATGATCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCGGTCAACATTA *KpnifF*
 480 ATGATCCATAAGCAACTGGGCGAGCTGGCGGATGCCCGGTCAACATTA *nifF* pNifF2

 201 CCGCACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCA *KpnifF*
 430 CCGCACGACGCTGGACGACTTTATGGCCTATCCGGTGCTGCTGCTGGGCA *nifF* pNifF2

 251 CGCCGACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGGCTGGAGCCGGATGCGAA *KpnifF*
 380 CGCCGACGCTCGGCGACGGCCAGCTGCCGGGG..... *nifF* pNifF2

 301 AGCGAGTCATGGAGCGAATTTATCAGCGCCTCGACGACGCCAGCCTGAA *KpnifF*
 348TGGAGCGAATTTATCAGCGCCTCGACGACGCCAGCCTGAA *nifF* pNifF2

 351 AGGGAAAACCGTGGCGCTGTTCCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGG *KpnifF*
 307 AGGGAAAACCGTGGCGCTGTTCCGGCCTCGGCGATCAGAGAGGCTATCCGG *nifF* pNifF2

 401 ACAACTTCGTTCAGCGGGATGCGCCCCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGC *KpnifF*
 257 ACAACTTCGTTCAGCGGGATGCGCCCCTGTTTCGACGCCCTGAGCGCGCGC *nifF* pNifF2

 451 GCGCGCAGATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCGC *KpnifF*
 207 GCGCGCAGATGATTGGCAGCTGGCCAAATGAGGGTTATGAATTCAGCGC *nifF* pNifF2

 501 GTCCTCGGCGCTGGAAGGCGACCGCTTTGTTGGGCTGGTGCTGGATCAGG *KpnifF*
 158 GTCCTCGGCGCTGGAAGGCGACCGCTTTGTTGGGCTGGTGCTGGATCAGG *nifF* pNifF2

 551 ATAACCAGTTCGACCAGACCGAAGCGCGTCTGGCGAGCTGGCTTGAGGAG *KpnifF*
 108 ATAACCAGTTCGACCAGACCGAAGCGCGTCTGGCGAGCTGGCTTGAGGAG *nifF* pNifF2

Figure 37. Comparaison des Séquences nucléotidiques du gène *nifF* chez *K. pneumoniae* (*KpnifF* «sauvage») et l'insert *nifF* chez pNifF2 (*nifF* pNifF2) : les nucléotides chez *K. pneumoniae* sont énumérés à partir de l'extrémité 5'. Les pointillés en gras montrent l'absence de la boucle chez ce mutant.

À la suite de la traduction du gène *nifF* en acides aminés, on obtient le schéma ci-dessous. Le schéma permet la comparaison de la protéine NifF chez la souche sauvage (Kpneu) et chez la souche mutante (pNifF2).

	1						50
Kpneu	MANIGIFFGT	DTGKTRKIAK	MIHQQLGELA	DAPVNINRIT	LDDFMAYPVL		
pNi fF2	MANIGIFFGT	DTGKTRKIAK	MIHQQLGELA	DAPVNINRIT	LDDFMAYPVL		
	51						100
Kpneu	LLGITPLGDG	QLPGLEAGCE	SESWSEFISG	LDDASLKGKT	VALFGLGDQR		
pNi fF2	LLGITPLGDG	QLPG.....WSEFISG	LDDASLKGKT	VALFGLGDQR		
	101						150
Kpneu	GYPDNFVSGM	RPLFDALSAR	GAQMIGSWPN	EGYEFSASSA	LEGDRFVGLV		
pNi fF2	GYPDNFVSGM	RPLFDALSAR	GAQMIGSWPN	EGYEFSASSA	LEGDRFVGLV		
	151						177
Kpneu	LDQDNQFDQT	EARLASWLEE	IKRTVL*				
pNi fF2	LDQDNQFDQT	EARLASWLEE	IKRTVL*				

Figure 38. Comparaison des Séquences des acides aminés de la protéine NifF chez *K. pneumoniae* (Kpneu «sauvage») et de la protéine NifF chez pNifF2 : les nucléotides chez *K. pneumoniae* sont énumérés à partir de l'extrémité 5'. Les pointillés en gras montrent l'absence de la boucle chez ce mutant (pNifF2). Les astérisques indiquent le codon stop. La traduction a été réalisée par le programme «ExPASy Translate Tool».

DISCUSSION

Ce projet de recherche est composé de deux parties distinctes selon le type de mutagenèse utilisée.

La première partie de ce projet consiste à créer des mutations au hasard dans le gène *nifF* en optimisant la technique de PCR utilisé. Deux types de PCR ont été testés, afin de sélectionner la meilleure méthode possible pour créer les mutants chez *Klebsiella pneumoniae*. Dans le premier PCR, on utilise du $MnCl_2$ avec la Taq polymérase (figure 11). Le deuxième PCR est de type standard et il utilise la Taq polymérase seulement pour créer les mutants (figure 12). L'amplification dans les deux types de PCR a été une tâche généralement facile à réaliser. Cependant, en ce qui concerne la transformation, les résultats diffèrent en nombre de transformants selon les types de PCR. Il y a peu de transformants issus du PCR avec le $MnCl_2$ par rapport au PCR standard. Par la suite, 33 transformants ont été sélectionnés par un criblage négatif, c'est à dire ceux qui ne poussent pas sur le milieu minimum (sans NH_4) avec l'IPTG (section A. 1 et tableau XIII). Afin de vérifier nos résultats, un transformant témoin a été aussi sélectionné. Le criblage de la banque des mutants qui ne fixent pas l'azote donne aussi un meilleur rendement avec les plasmides issus du PCR avec la Taq polymérase (sans l'ajout d'un autre facteur de mutagenèse).

À la suite de l'extraction plasmidique et de la digestion avec les enzymes de restriction, il s'avère une grande différence en nombre des mutants qui possèdent l'insert *nifF* entre ces deux PCRs. Parmi les 24 plasmides sélectionnés, seulement trois issus du PCR avec le $MnCl_2$ ont l'insert *nifF* (figure 16). De plus, 21 plasmides issus du PCR avec la Taq seulement ont l'insert *nifF* (figure 21A, 21B, 21C, 21D et 21E).

Nos résultats pour le PCR avec $MnCl_2$ montrent la présence de trois souches possédant l'insert *nifF*. Parmi ces trois souches, seulement la

souche mutante S102 exprime la protéine (figure 26). Cependant, cette souche ne possède pas le cofacteur FMN (figure 20). Ces types de mutants ont une mutation qui rend la flavodoxine incapable de lier le FMN. Il est probable qu'il y ait eu un grand nombre de mutations dans ces inserts *nifF*, ceci est causé par le facteur de mutagenèse ($MnCl_2$) utilisé dans ce PCR. De plus, si nous nous référons aux résultats de spectrophotométrie des mutants issus du PCR standard, nous trouvons aussi un grand nombre de souches mutantes avec l'insert *nifF* qui ne possèdent pas le FMN. Aussi, certaines souches sélectionnées n'expriment pas la protéine NifF. Les résultats du séquençage montrent aussi que seulement trois parmi les huit souches ont moins de dix mutations. Le nombre de mutations est donc déjà élevé en utilisant la Taq polymérase seulement. En se basant sur ces résultats, nous pouvons conclure que le meilleur rendement est donné par le PCR utilisant la Taq polymérase seulement. L'hypothèse que nous pouvons déduire de cette comparaison entre les deux PCRs est que plus il y a de facteurs de mutagenèse, plus il y a de mutations, ce qui peut être néfaste pour le gène *nifF* et pour le fonctionnement de la protéine NifF. Dans ce projet, il est primordial de créer des mutations, mais il est important d'avoir un nombre minimum de mutations. Une mutation serait l'idéal pour connaître les acide aminés responsables de l'interaction entre FeP et NifF. Dans ce projet et pour le futur, l'utilisation d'un PCR avec la Taq polymérase seulement (sans l'ajout du $MnCl_2$) serait suffisant et plus intéressant pour la création des mutants. Des études précédentes ont déjà montré que la Taq polymérase toute seule fait des erreurs de $3,7 \times 10^{-5}$ par nucléotide synthétisé (66).

La surexpression de la flavodoxine nous a permis d'analyser les souches sélectionnées en utilisant le spectrophotomètre et le gel de polyacrylamide. Les données du spectrophotomètre nous ont renseignés sur la présence du FMN qui est le cofacteur de la flavodoxine (46, 49). On procède à l'élimination de tous les mutants qui ne possèdent pas cet FMN

puisque la flavodoxine n'est pas fonctionnelle sans sa présence. Douze souches n'ont pas le FMN parmi les 21 souches sélectionnées précédemment (les souches issus du PCR avec la Taq seulement et qui possèdent l'insert *nifF*). Ces dernières ont donc été éliminées, nous avons sélectionné neuf souches possédant le FMN parmi les mutants de la mutagenèse au hasard (figure 22, 23 et tableau XIV). Afin de ne pas surcharger la section des résultats, seulement certaines figures ont été présentées (graphiques représentant le spectre d'absorption du FMN) : deux souches témoins ; une souche possédant la flavine (FMN), qui est le mutant S185, et une autre souche ne possédant pas cet FMN, qui est le mutant S125. Les résultats préliminaires montrent que le spectre d'absorption des neuf mutants ayant le FMN est identique au sauvage pGGK3 (figure 18 et 19). Tous ont le cofacteur FMN, ce qui confirme que le phénotype observé chez ces mutants n'est pas causé par un manque de cofacteur. Les souches sélectionnées sont : S113, S118, S119, S121, S122, S128, S136, S148 et S185.

Pour s'assurer de la présence de la flavodoxine de pleine longueur, nous avons fait des gels de polyacrylamide. Ainsi, nous avons visualisé cette protéine chez les neuf souches sélectionnées précédemment (figure 24, 25 et 26), ce qui nous a permis de confirmer que la flavodoxine n'est pas tronquée. La dernière étape consiste à faire le séquençage des mutants sélectionnés ainsi que la traduction en acides aminés (figure 27, 28, 29, 30 et 31).

Seulement les mutants qui ont moins de dix mutations dans l'insert *nifF* ont été présentés. Les plasmides pNifF185 et pNifF136 ont huit mutations, le plasmide pNifF148 a cinq mutations et le plasmide témoin pNifF113, qui a permis à la souche UN1789 (*nifF*) de pousser sous les conditions de fixation de l'azote. pNifF113 n'a aucune mutation, ce qui confirme sa croissance sur le milieu minimal sans NH₄ représenté

dans le tableau XIII. La séquence nucléotidique de ces mutants permettra de suggérer des régions impliquées dans l'interaction du complexe entre NifF, FeP et possiblement NifJ.

Dans la partie sur la mutagenèse dirigée, nous avons éliminé une partie du gène *nifF*. C'est la première fois qu' on tente d'éliminer la boucle *nif*-spécifique chez *K. pneumoniae*. Des études précédentes ont déjà montré l'importance d'une boucle *nif*-spécifique chez la flavodoxine d'*Azotobacter chroococcum* où certains résidus étaient impliqués dans le transfert d'électrons en ce qui concerne la formation du complexe entre la flavodoxine et la protéine Fe (51). Il est donc important pour nos études chez *K. pneumoniae* de connaître le rôle de cette boucle en ce qui concerne le transfert d'électrons entre la flavodoxine et la nitrogénase.

L'élimination de cette boucle a été réalisée par l'utilisation de trois PCRs (figure 14 et 15). La Vent polymérase a été utilisée, afin d'éviter les mutations au hasard. Ensuite, la présence du gène *nifF* et l'absence de la boucle *nif*-spécifique ont été vérifiées par les enzymes de restrictions *HindIII*, *PstI* et *HinfI* (figure 32, 33 et 34).

Les résultats de la digestion sont des résultats préliminaires qui nous ont permis de sélectionner le bon mutant. Cependant, ces résultats ont été confirmés par le séquençage, la boucle *nif*-spécifique a été effectivement éliminée chez le mutant pNifF2 (figure 37 et 38).

Pour compléter cette étude, nous avons procédé à la surexpression de la protéine (NifF) chez le mutant S2 afin de vérifier la présence du FMN et de la flavodoxine. Les résultats de la spectrophotométrie nous ont permis de confirmer la présence du FMN (absorbé à 450nm) (46, 49) chez la souche étudiée S2 (figure 35). L'électrophorèse sur le gel de polyacrylamide a montré que NifF2

(flavodoxine chez la souche S2) a été surexprimée, ce qui confirme bien que la flavodoxine n'est pas tronquée chez la souche sélectionnée (figure 36).

Après le séquençage, une deuxième transformation du plasmide pNifF2 dans UN1789 a été faite. À la suite de la vérification de la présence de l'insert *nifF*, nous avons procédé au criblage des souches issues de cette transformation. Cependant, sous les conditions de la fixation de l'azote (milieu minimal sans NH₄ et avec l'induction de l'IPTG), il n'y a aucune croissance chez ces derniers (résultats non présentés). La présence de cette boucle s'avère donc nécessaire à la fixation de l'azote *in vivo*.

Finalement, nous savons que l'absence de la boucle *nif*-spécifique dans le gène *nifF* n'affecte pas la surexpression de la flavodoxine et qu'elle n'affecte pas non plus le cofacteur FMN. Par contre, nous savons que cette flavodoxine n'est pas fonctionnelle *in vivo*. Pour déterminer comment NifF est déficiente, les études biochimiques seront d'une grande importance.

Les études biochimiques futures nous permettront de comprendre le rôle que peut jouer cette boucle dans la fixation de l'azote chez *K. pneumoniae*. Ainsi, nous nous attendons à ce que ces résultats soient analogues aux travaux de recherches du groupe de Peelen, qui ont suggéré l'importance de cette boucle chez *Azotobacter chroococcum* (51).

Les études biochimiques futures seront déterminantes pour les mutants sélectionnés (pNifF2, pNifF185, pNifF136 et pNifF148). Elles nous permettront de voir quelles sont les interactions protéine-protéine qui permettent de former un complexe entre NifF/Fe-P et peut être entre NifF/NifJ. Ainsi, nous pourrions cibler des résidus et faire une mutagenèse

dirigé afin de confirmer quels sont vraiment les acides aminés impliqués puisqu'il semble que c'est assez difficile d'obtenir une seule mutation à la fois dans la mutagenèse au hasard. Il est certain que, pour la mutagenèse dirigée (élimination de la boucle *nif*-spécifique) que nous avons déjà réalisée dans ce projet, les études biochimiques sur le mutant pNifF2 nous permettront de confirmer l'importance cette boucle chez NifF dans l'interaction avec FeP et / ou NifJ.

Plusieurs études biochimiques pourront être effectuées dans le but de mieux comprendre les défauts dans les flavodoxines (NifF) mutantes obtenues dans la présente étude. Les réactions partielles peuvent être étudiées avec les techniques de cinétique «steady-state». La capacité de NifJ à catalyser la réduction de NifF dans la présence du pyruvate et CoA est donc déterminée par la spectrophotométrie. La capacité de divers NifFs à donner des électrons à la nitrogénase pourra être étudiée dans un système où NifF est réduite avec la lumière et des morceaux de chloroplastes et où nous mesurons la capacité de NifF réduite à donner les électrons à la nitrogénase en dosant l'activité de la nitrogénase (réduction de l'acétylène en éthylène) qui sera déterminée par le chromatographe en phase gazeuse (42). Les techniques de cinétique rapide qui utilisent la spectrophotométrie à stoppage de flux pourront donner les constantes d'affinité entre les NifFs et la protéine FeP de la nitrogénase ou les NifFs et NifJ. Ces études futures seront l'extension logique de l'étude commencée dans ce mémoire de maîtrise.

En général, la fixation biologique de l'azote est responsable de la réduction majeure de N_2 en NH_3 qui est utilisée par les plantes et, d'une façon indirecte, par les animaux. La compréhension du mécanisme de la réduction de la nitrogénase ainsi que l'identification des composantes du système de transport d'électrons à bas potentiel rédox sont donc très

importantes. Cela pourrait aider à l'amélioration de plusieurs problèmes en ressources alimentaires mondiales.

Les études génétiques précédentes sur la fixation de l'azote chez *K. pneumoniae* ont beaucoup aidé la compréhension de ce phénomène. Cependant plusieurs questions restent sans réponse. À cet effet, le chemin est encore long. Néanmoins, *K. pneumoniae* reste et continue d'être le système modèle pour les autres diazotrophes.

Cette maîtrise a débuté la création et la caractérisation de plusieurs NifFs mutantes chez *K. pneumoniae*. Il s'agissait du but ultime de l'étude. Le but spécifique de cette voie de recherche est de faire l'analyse des déterminants structuraux chez la flavodoxine de *Klebsiella pneumoniae* qui sont importants dans son interaction avec NifJ et la protéine FeP de la nitrogénase. La recherche future dans ce domaine devra clarifier non seulement les mécanismes de la régulation de la fixation de l'azote en ce qui concerne le transport des électrons, mais aussi en ce qui concerne la régulation des réactions biologiques d'oxydation/réduction et des interactions protéine-protéine qui sont d'une importance biologique fondamentale.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Magasanik, B.** (1982) Genetic control in nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **16**, 135-168;
2. **Merrick, M. J. et Edwards, R. A.** (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 604-622.
3. **Tyler, B.** (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 1127-1162.
4. **Pelmont, J.** (1993) Bactérie et environnement. Adaptations physiologiques, Presses universitaires de Grenoble.
5. **Howard, J. B. et Rees, D. C.** (1994) Nitrogenase : A nucleotide-dependent molecular switch. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 235-264.
6. **Mortenson, L. E., Morris, J. A. et Jeng, D. Y.** (1967) Purification, metal composition and properties of molybdoferredoxin and azoferredoxin, two of the components of the nitrogen-fixing system of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta.* **141**, 516-522.
7. **Thorneley, R. N. F. et Lowe, D. J.** (1985) Dans Molybdenum Enzymes, Kinetics and Mechanism of the Nitrogenase Enzyme System. Wiley-Interscience, N.Y., pp 221-284.
8. **Rees, D. C., Chan, M. K. et Kim, J.** (1993) Structure and function of nitrogen. *Adv. Inorg. Chem.* **40**, 89-119.
9. **Peters, J. W., Fisher, K. et Dean, D. R.** (1995) Nitrogenase structure and function : a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 335-366.

10. **Gussin, G. N., Ronson, C. W. et Ausubel, F. M.** (1986) Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 567-591.
11. **Dixon, R. A.** (1984) The genetic Complexity of Nitrogen Fixation. *Journal of General. Microbiology.* **130**, 2745-2755.
12. **Arnold, W., Rump, A., Klipp, W., Priefer, U. B. et Puhler, A.** (1988) Nucleotide sequence of a 24, 206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **203**, 715-738.
13. **Roberts, G. P., MacNeil, T., MacNeil, D. et Brill, W. J.** (1978) Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* genes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **136**, 267-279.
14. **Paul, W. et Merrick, M.** (1987) The nucleotide sequence of the *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae* and identification of a new *nif* gene : *nifZ*. *Eur. J. Biochem.* **170**, 259-265.
15. **Masepohl, B., Klipp, W. et Puhler, A.** (1988) Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 27-37.
16. **Paul, W. et Merrick, M.** (1989) The roles of the *nifW*, *nifZ*, and *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **178**, 675-682.
17. **Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M.C., Laird, N. F., Newton, W. E. et Dean, D. R.** (1989) Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 49-57.

18. **Meijer, W. et Tabita, F.** (1992) Organization and characterization of *nifUSVW-rpoN* gene cluster from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **174**, 3855-3866.
19. **Stricker, O., Masepohl, B., Klipp, W. et Bohme, H.** (1997) Identification and characterization of the *nifV-nifZ-nifT* gene region from the filamentous *Anabaena* sp. Strain PCC7120. *J. Bacteriol.* **179**, 2930-2937.
20. **Dixon, R.** (1998) The oxygen-responsive NifL-NifA complex a novel two component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma *Proteobacteria*. *Arch. Microbiol.* **169**, 371-380.
21. **Su, W., Porter, S., Kustu, S. et Echols, H.** (1990) DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 5504-5508.
22. **Rudnick, P., Meletzus, D., Green, A., He, L. et Kennedy, C.** (1997) Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biol. Biochem.* **29**, 831-841.
23. **Santero, E., Hoover, T. R., Keener, J. et Kustu, S.** (1989) *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 7346-7350.
24. **Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S. et Kustu, S.** (1990) The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell.* **63**, 11-22.

25. **Berger, D. K., Narberhaus, F. et Kustu, S.** (1994) The isolated catalytic domain of NifA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription *in vitro* : activation is inhibited by NifL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 103-107.
26. **Drummond, M., Clements, J., Merrick, M. et Dixon, R.** (1983) Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* (London). **301**, 302-307.
27. **Berger, D. K., Narberhaus, F., Lee, H. S. et Kustu, S.** (1995) *In vitro* studies of the domains of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. *J. Bacteriol.* **177**, 191-199.
28. **Shingler, V.** (1996) Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators : derepression as a control mechanism. *Mol. Microbiol.* **19**, 409-416.
29. **Drummond, M. H.** (1985) The sequence of the *nifF* gene of *Klebsiella pneumoniae* and homology of the predicted amino acid sequence of its product to other flavodoxins. *Biochem. J.* **232**, 891-896.
30. **Thorneley, R. N. F., Abell, C., Ashby, G. A., Drummond, M. H., Eady, R. R. et Hughes, D. L.** (1994) Flavodoxins and nitrogen fixation: structure, electrochemistry and post-translational modification by coenzyme A. pp 343-354. Dans, W. de Gruyter et co, Berlin, Germany.
31. **Hill, S. et Kavanagh, E. P.** (1980) Roles of *nifF* and *nifJ* gene products in electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **141**, 470-475.

32. **Nieva-Gomez, D., Roberts, G. P., Klevickis, S. et Brill, W. J.** (1980) Electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 2555-2558.
33. **Shah, V. K., Stacey, G. et Brill, W. J.** (1983) Electron transport to nitrogenase : purification and characterization of pyruvate flavodoxine oxidoreductase, the *nifJ* gene product. *J. Biol. Chem.* **258**, 12064-12068.
34. **Yakunin, A. F. et Hallenbeck, P. C.** (1998) Purification and characterization of pyruvate oxidoreductase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1409**, 39-49.
35. **Wahl, R. C. et Orme-Johnson, W. H.** (1987) Clostridial pyruvate oxidoreductase and pyruvate-oxidizing enzyme specific to nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. are similar enzymes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10489-10496.
36. **Brostedt, E. et Nordlund, S.** (1991) Purification and partial characterization of a pyruvate oxidoreductase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* grown under nitrogen-fixing conditions. *Biochem. J.* **279**, 155-158.
37. **Hugues, N. J., Chalk, P. A., Clayton, C. L. et Kelly, D. J.** (1995) Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate flavodoxine oxidoreductase from *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **177**, 3953-3959.
38. **Bauer, C. C., Scappino, L. et Haselkorn, R.** (1993). Growth of the cyanobacterium *Anabaena* on molecular nitrogen: NifJ is required only when iron is limited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8812-8816.

39. **Masepohl, B. et Klipp, W.** (1996) Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* **165**, 80-90.
40. **Gennaro, G., Hubner, P., Sandmeier, U., Yakunin, A. F. et Hallenbeck, P. C.** (1996). Cloning, characterization, and regulation of *nifF* from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **178**, 3949-3952.
41. **Hallenbeck, P. C. et Gennaro, G.** (1998) Stopped-flow kinetic studies of low potential electron carriers of the photosynthetic bacterium, *Rhodobacter capsulatus*: ferredoxin I and NifF. *Biochim. Biophys. Acta.* **1365**, 435-442.
42. **Yakunin, A. F., Gennaro, G. et Hallenbeck, P. C.** (1993) Purification and properties of *nif*-specific flavodoxin from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **175**, 6775-6780.
43. **Hallenbeck, P. C., Jouanneau, Y. et Vignais, P. M.** (1982) Purification and molecular properties of a soluble ferredoxin from *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta.* **681**, 168-176.
44. **Yakunin, A. F. et Gogotov, I. N.** (1983) Properties and regulation of the synthesis of two ferredoxins from *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta.* **725**, 298-308.
45. **Vervoot, J., Heering, D., Peelen, S. et Berkel, W.** (1994) Flavodoxins in Methods in enzymology (Peckk, Jr., H.D. and LeGall, J., eds.) Vol **243**, pp 188-203, Academic Press. New York.

46. **Mayhew, S.G. et Tollin, G.** (1992) General properties of flavodoxins. Vol. **III**, pp 389-426. Dans Muller. Chemistry and biochemistry of flavoenzymes. CRC Press, Boca Raton,FL.
47. **LeGall, J. et Fauque, G.** (1988) Dissimilatory reduction of sulfur compounds in Biology of Anaerobic Microorganismes, pp 587-639, John Wiley& Sons, New York.
48. **Simonsen, R. P. et Tollin, G.** (1980) Structure-function relations in flavodoxins. *Mol. Cell. Biochem.* **33**, 13-24.
49. **Gennaro, G.** (2000) Thèse de doctorat. Revue de littérature. chap1. pp 104.
50. **Zhou, Z. et Swenson, R. P.** (1995) Electrostatic effects of surface acidic amino acid residues on the oxidation-reduction potentials of the flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris*. *Biochemistry.* **34**, 3183-3192.
51. **Peelen, S., Wijmenga, S. S., Erbel, P. J. A., Robson, R. L., Eady, R. R. et Vervoort, J.** (1996) Possible role of extra loop of the long-chain flavodoxin from *Azotobacter chroococcum* in electron transfer to nitrogenase. *J. Biomolecular. NMR.* **7**, 315-330.
52. **Anderson, R. D. et al.** (1972) Structure of the oxidized form of a flavodoxin at 2.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 3185-3188.
53. **Fukuyama, K., Wakabayashi, S., Matsubara, H. et Rogers, L. J.** (1990) Tertiary structure of oxidized flavodoxin from an eukaryotic red alga *Chondrus crispus* at 2.35-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **265**, 15804-15812.

54. **Mierlo, van, C. P. M. et al.** (1990) A two-dimensional H-NMR study on *Megasphaera elsdenii* flavodoxin in the oxidized state and some comparisons with the two-electron-reduced state. *Eur. J. Biochem.* **194**, 199-216.
55. **Knauf, M. A. et al.** (1993) Homonuclear and heteronuclear NMR studies of oxidized *Desulfovibrio vulgaris* flavodoxin: sequential assignments and identification of secondary structure elements. *Eur. J. Biochem.* **213**, 167-184.
56. **Peelen, S. et Vervoort, J.** (1994) Two-dimensional NMR studies of the flavin binding site of *Desulfovibrio vulgaris* flavodoxin in its three redox states. *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 291-300.
57. **Jacobson, M. R., Brigle, K. E., Bennett, L. T., Setterquist, R. A., Wilson, M. S., Cash, V. L., Beynon, J., Newton, W. E. et Dean, D. R.** (1989) Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**, 1017-1027.
58. **Deistung, J., Cannon, F. C., Hill, S. et Thorneley, R. N. F.** (1985) Electron transfer to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*; *nifF* gene cloned and the gene product, a flavodoxin, purified. *Biochem. J.* **231**, 743-753.
59. **Bianchi, N. et al.** (1993) Flavodoxin is required for the activation of the anaerobic ribonucleotide reductase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 792-797.
60. **Ifuku, O., Koga, N., Haze, S. I., Kishimoto, J. et Wachi, Y.** (1994) Flavodoxin is required for the conversion of dethiobiotin to biotin in *Escherichia coli*. *Euro. J. Biochem.* **224**, 173-178.

61. **Thorneley, R. N. F. et Deistung, J.** (1988) Electron-transfer studies involving flavodoxin and a natural redox partner, the iron protein of nitrogenase. Conformational constraints on protein-protein interactions and the kinetics of electron transfer within the protein complex. *J. Biochem.* **253**, 587-595.
62. **Thorneley, R. N. F., Abell, C., Ashby, G. A., Drummond, M. H., Eady, R. R., Huff, S., Macdonald, C. J. et Shneier, A.** (1992) Posttranslational modification of *Klebsiella pneumoniae* flavodoxin by covalent attachment of coenzyme A, shown by ³¹P NMR and electrospray mass spectrometry, prevents electron transfer from the nifJ protein to nitrogenase. A possible new regulatory mechanism for biological nitrogen fixation. *Biochemistry.* **31**, 1216-1224.
63. **Frederick, M. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Serdam, J.G., Smith, J. A. et Struhl, K.** (1989). Short Protocols in Molecular Biology. Harvard Medical School
64. **Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. et White, T. J., eds.** (1990) PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA.
65. Current Protocols in Molecular Biology, (1989) Vol.I, Chap.8, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience.
66. **Yuhong, Z., Zhang, X. et Ebright, R. H.** (1991) Random mutagenesis of gene-sized DNA molecules by use of PCR with Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Research.* Vol. **19**, No. 21. pp 6052.

67. **Amon, A., Tyers, M., Futcher, B. et Nasmyth, K.** (1993) Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell*. **74**, 993-1007.
68. **Yuli, G. et Gralla, J. D.** (1997) DNA-binding Determinants of Sigma 54 as Deduced from Libraries of mutations. *J. Bacteriol.* **179**, 1239-1245.
69. **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. *Nature*. **15** (227), 680-685.
70. **Birnboim, H. C. et Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. **7**,1513-1523.
71. **Genome Sequencing center.** Washington University School of Medicine: Small Scale preparation of plasmid DNA II (from Z. Du- St. Louis). Cité dans le site suivant:
http://genome.Wustl.edu/gsc/protocols/plasmid_mini_prep_II.shtml.
72. Cette extraction est recommandée dans la trousse de séquençage “BIG DYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” ABI PRISM PERKIN ELMER/ Applied Biosystems.