

Synthèse en français (thèse rédigée en anglais) :

## Préambule

D'octobre 2007 à juillet 2011, j'ai conduit ma thèse de doctorat dans le laboratoire de Physiologie Membranaire et Moléculaire du Chloroplaste, dirigé par Francis-André Wollman, sous la direction de Catherine de Vitry. Mes travaux de thèse portent sur l'étude de la biogenèse, le contrôle qualité et la fonction des complexes photosynthétiques par une approche génétique de recherche de suppresseurs chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette approche m'a donné l'occasion de mener un projet pluridisciplinaire mêlant génétique, biologie moléculaire, génomique, biochimie, physiologie, biophysique et une pincée de cristallographie à partir d'un complexe protéique membranaire, le cytochrome *b<sub>6</sub>f*. L'étude fonctionnelle d'un tel complexe muté que j'ai construit et caractérisé a mené à une publication, dont je suis premier auteur, le 10 mai 2011 dans la revue Nature Communications. Deux autres manuscrits en préparation sont rapportés au sein de ma thèse, un manuscrit concernant le rôle d'un hème *c* atypique, l'hème *c<sub>i</sub>* du cytochrome *b<sub>6</sub>f* et un sur l'isolation et la caractérisation d'un mutant de la protéase FtsH1.

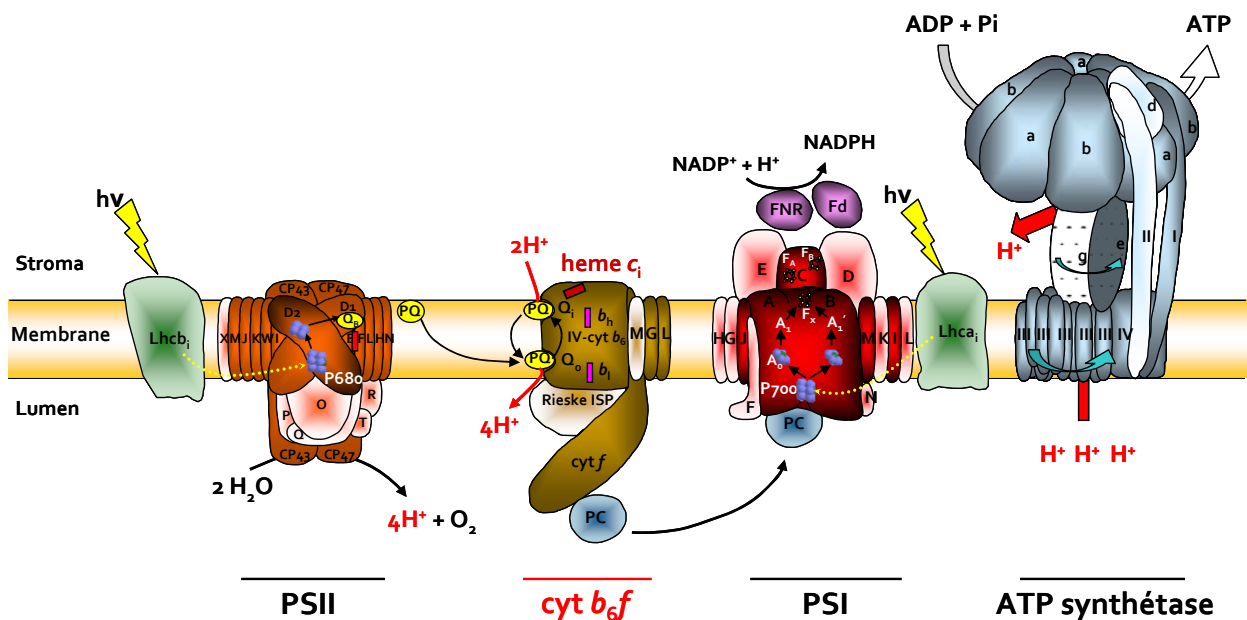
## Organisation de mon manuscrit

J'ai rédigé mon manuscrit de thèse en anglais par souci d'homogénéité puisque les publications scientifiques se font en anglais. Mon manuscrit commence par une introduction générale sur la photosynthèse, j'aborde ensuite plus en détail les sujets qui sont spécifiquement à la base de mon travail, en particulier l'organisme modèle *Chlamydomonas reinhardtii* utilisé au cours de cette étude, le cytochrome *b<sub>6</sub>f* ainsi que les méthodes biophysiques d'analyse spectroscopique *in vivo*. L'introduction à une autre partie de mon travail concernant les protéases du chloroplaste est placée en tête du chapitre correspondant (Chapitre III). J'ai organisé ensuite mon manuscrit selon trois chapitres. Dans le premier chapitre, je décris l'approche génétique de recherche de suppresseurs et les révertants obtenus. Dans le second chapitre se trouvent les manuscrits (le premier publié, le second en

préparation) concernant la fonction du site  $Q_i$  du cytochrome  $b_6f$ . Le troisième chapitre comporte une introduction sur les protéases chloroplastiques, le manuscrit en préparation portant sur l'isolation et la caractérisation d'un mutant de la protéase FtsH1 puis une partie résultats complémentaires et discussion obtenus à partir de ce mutant. Enfin une conclusion résume les travaux que j'ai effectués et revient sur certains points saillants ainsi qu'énonce les ouvertures et perspectives de mon travail.

## Introduction

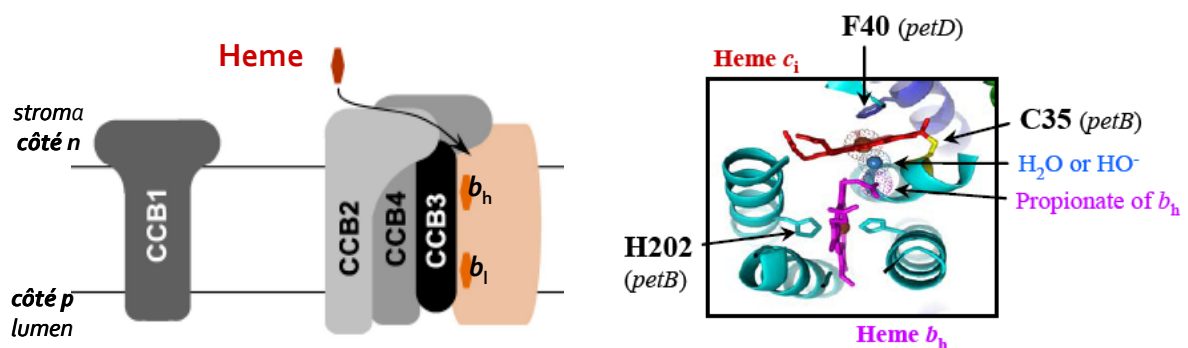
La photosynthèse permet la conversion d'énergie lumineuse, capturée par des complexes protéiques contenant de la chlorophylle, en pouvoir réducteur – le NADPH - et en énergie chimique – l'ATP -. Dans la photosynthèse oxygénique, la réduction photo-induite de  $NADP^+$  est exécutée par une chaîne de transfert d'électrons, qui scinde l'eau et produit de l'oxygène, composée en majorité des complexes protéiques suivants enchâssés dans la membrane du thylakoïde (Figure 1) : le photosystème II (PSII), le cytochrome  $b_6f$  et le photosystème I (PSI).



**Figure 1 : L'appareil photosynthétique.** Tons foncé et clair, sous-unité codée respectivement dans le génome chloroplastique et nucléaire. Adapté d'un schéma dessiné par Limor Minai.

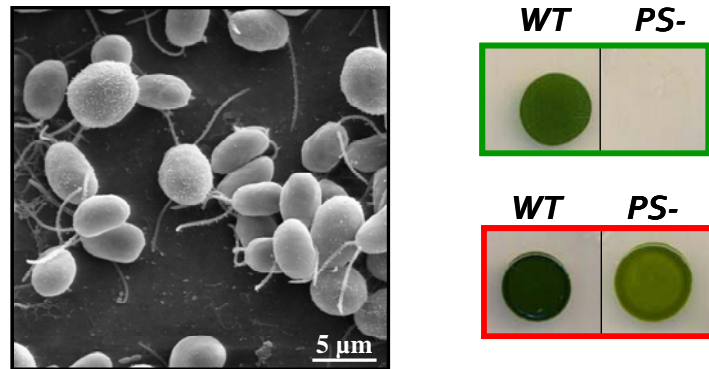
L'assemblage, la dégradation et la réparation de ces complexes protéiques exigent une coordination fine de l'expression de nombreuses sous-unités codées dans le chloroplaste ou dans le noyau auxquelles de nombreux cofacteurs tels des pigments (chlorophylles, caroténoïdes), des hèmes et des groupes fer-soufre doivent être ajoutés. L'adressage de ces protéines et de leurs cofacteurs moléculaires à une destination appropriée exige l'action d'une diversité de chaperonnes, de facteurs d'assemblage et de protéases qui assurent la biogenèse et le recyclage de ces complexes hétéro-oligomériques.

Nous avons réalisé un crible génétique ayant pour but d'identifier des protéases qui cibleraient le cytochrome  $b_6f$  à la dégradation. Le cytochrome  $b_6f$  diffère de son homologue respiratoire, le cytochrome  $bc_1$ , par la présence d'un hème supplémentaire, l'hème  $c_i$  situé au site de réduction des quinones,  $Q_i$  (Figure 2). Précédemment au laboratoire, les facteurs CCB impliqués dans la catalyse de la liaison covalente de l'hème  $c_i$  au cytochrome  $b_6$  ont été caractérisés par génétique classique dans *Chlamydomonas reinhardtii* et par génétique inverse dans *Arabidopsis thaliana*.



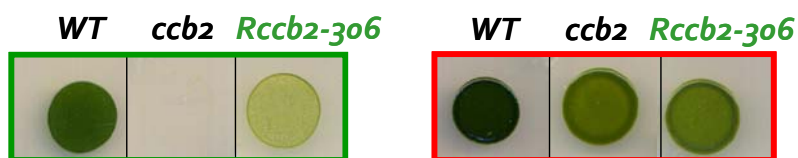
**Figure 2 : L'hème  $c_i$ , un hème  $c$  atypique présent dans le site  $Q_i$  du cytochrome  $b_6f$ .** A gauche, la voie de maturation de l'hème  $c_i$  (Saint-Marcoux et al. *J Cell Biol* 2009) ; à droite, structure de la poche  $Q_i$  contenant l'hème  $c_i$  attaché par une seule liaison thioéther au cytochrome  $b_6$  (Stroebel et al. *Nature* 2003, *Chlamydomonas* PDB 1Q90).

La microalgue verte unicellulaire *Chlamydomonas* est largement utilisée en tant qu'organisme modèle pour la recherche sur la photosynthèse car c'est un organisme photoautotrophe facultatif. Les mutants affectés dans le processus photosynthétique peuvent être cultivés en condition de croissance hétérotrophique sur une source de carbone réduite exogène comme l'acétate (Figure 3).



**Figure 3 :** *Chlamydomonas reinhardtii*, une microalgue verte modèle pour la recherche sur la photosynthèse. A gauche, image au microscope électronique à balayage (Wikimedia Commons). A droite, croissance phototrophique sur milieu minimum (encadré vert), croissance hétérotrophique sur milieu complet enrichi en acétate (encadré rouge). WT, souche sauvage ; PS-, souche non photosynthétique.

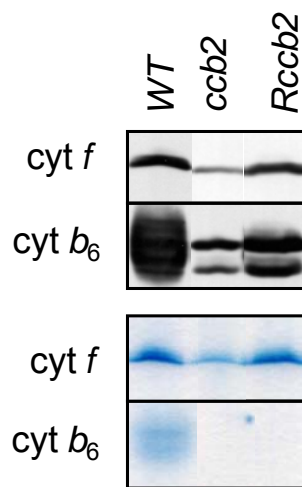
L'absence d'hème  $c_1$  (par mutagenèse dirigée de la cystéine impliquée dans la liaison covalente ou bien par mutation au sein d'un facteur de maturation CCB par exemple) entraîne une faible accumulation du cytochrome  $b_6f$  qui ne permet pas aux souches mutantes de pousser en condition phototrophique. Cette observation a fondé le crible de recherche de mutations suppresseur qui rétabliraient une accumulation plus haute de cytochrome  $b_6f$  fonctionnel, suffisante pour permettre une croissance phototrophique (Figure 4).



**Figure 4 :** Un exemple de rétablissement de la phototrophie chez un révertant obtenu à partir d'une mutagenèse UV sur le mutant *ccb2*. Encadré vert, milieu minimum; encadré rouge, milieu acétate.

Nous avons identifié une telle mutation suppresseur (mutation ponctuelle) au sein du gène codant pour une protéase de la membrane chloroplastique. Nous avons ainsi obtenu le premier mutant de la métalloprotéase à zinc ATP-dépendante FtsH1 chez *Chlamydomonas*. La mutation *ftsH1-R420C* est une substitution de l'arginine, acide aminé essentiel pour

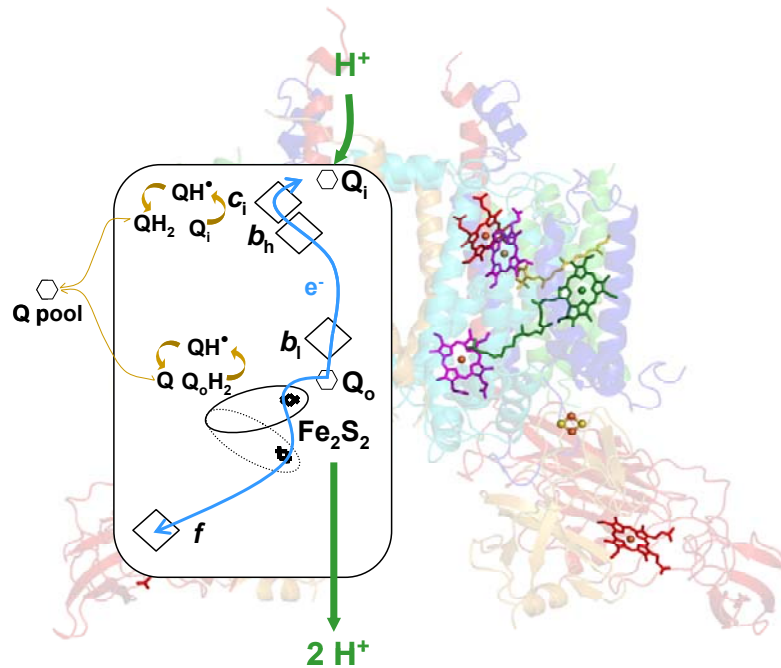
l'activité d'hydrolyse de l'ATP permettant le fonctionnement de la protéase d'après des travaux réalisés à partir d'homo-hexamères de FtsH chez *Escherichia coli*. Seulement FtsH1 et FtsH2 ont été identifiés dans la membrane du thylakoïde chez *Chlamydomonas* et ils forment probablement un hétéro-hexamères de FtsH comme chez les plantes supérieures. Le mutant FtsH1-R420C accumule un niveau de type sauvage de la protéase FtsH1 dont l'activité est altérée. Cette mutation isolée à partir du révertant *Rccb2-306* entraîne une accumulation de type sauvage de cytochromes *b<sub>6</sub>f* assemblés dépourvus d'hème *c<sub>i</sub>*, permettant ainsi leur étude fonctionnelle (Figure 5).



**Figure 5 : Accumulation de cytochrome *b<sub>6</sub>f* dépourvu d'hème *c<sub>i</sub>* chez le révertant *Rccb2* (*Rccb2-306*).** Immunoblot en haut en noir, signature en doublet caractéristique d'un cytochrome *b<sub>6</sub>* dépourvu d'hème *c<sub>i</sub>* lié covalamment ; en bas en bleu activité peroxydase de l'hème révélée par le TMBZ (le cytochrome *f* comporte un hème *c* lié covalamment ; on note l'absence de cette activité pour le cytochrome *b<sub>6</sub>* des mutants *ccb2* et *Rccb2*).

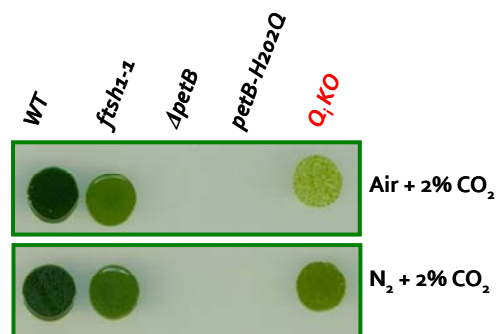
### **Le mutant *Q<sub>i</sub>KO*, un variant de cytochrome *b<sub>6</sub>f* exempt des hèmes *b<sub>h</sub>* et *c<sub>i</sub>*.**

Les membranes des chaînes photosynthétiques et respiratoires comportent chacune un composant central, le cytochrome *b<sub>6</sub>f* et son homologue le cytochrome *bc<sub>1</sub>* respectivement. Ces quinol oxidoréductases jouent un rôle majeur dans la production d'énergie cellulaire. En effet, les réactions de transfert d'électrons qu'ils catalysent sont couplées à la construction d'un gradient de proton qui permet la formation d'ATP. Ce processus a été décrit par Peter Mitchell dans les années 1960 et il est connu sous le nom de théorie chimiosmotique. Le couplage de transfert d'électrons à la translocation de proton dans la famille des cytochromes *bc* forme une boucle redox nommée « Q-cycle » indispensable pour la croissance (Figure 6). Ceci tient pour paradigme dans le domaine de la bioénergétique. Les tentatives de falsifier ce paradigme dans le cas du cytochrome *bc<sub>1</sub>* ont échoué. La dégradation protéolytique rapide des cytochromes *b<sub>6</sub>f* portant des mutations qui visent à gêner le fonctionnement du Q-cycle avait écarté jusqu'ici l'évaluation expérimentale de ce modèle dans la chaîne photosynthétique.



**Figure 6 : Le complexe dimérique de cytochrome  $b_6f$  opère selon un Q-cycle modifié.** Le cytochrome  $b_6f$  transfère deux protons (flèches vertes) par électron transféré (flèches bleues) le long d'une chaîne de haut potentiel (cluster  $Fe_2S_2$ , cytochrome  $f$ ) et d'une chaîne de bas potentiel (hèmes  $b_1$ ,  $b_h$ ,  $c_1$ ). Quinol ( $QH_2$ ) oxydation au site  $Q_o$  site, Quinone (Q) réduction au site  $Q_i$ .

Le mutant FtsH1-R420C s'est révélé être un outil excellent pour accumuler des variants de cytochrome  $b_6f$  dépourvus d'hème(s). Nous l'avons en effet combiné aux mutations qui inactivent la boucle redox (mutation de l'histidine ligand de l'hème  $b_h$ ,  $petB-H202Q$ ). Nous avons ainsi restauré un niveau d'accumulation de type sauvage de cytochrome  $b_6f$  mutant. Ceci nous a permis de tester et de démontrer que le Q-cycle est dispensable pour la croissance photosynthétique oxygénée (Figure 7) (Malnoë et al. *Nature Communications* 2011).

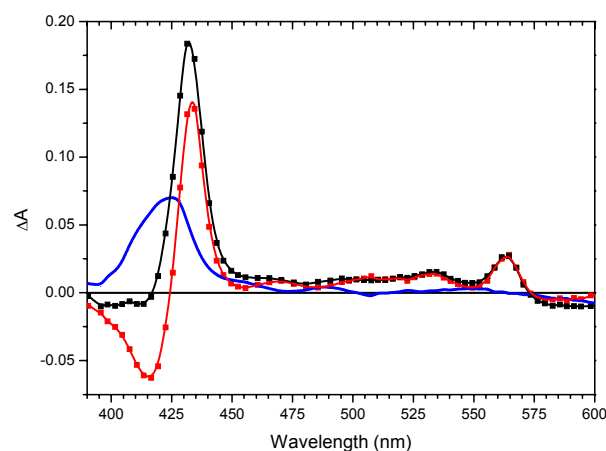


**Figure 7 : Une croissance phototrophique (sensible à l'oxygène) est possible malgré un Q-cycle dysfonctionnel.**  $Q_iKO$  est un double mutant *ftsH1-1* (FtsH1-R420C) : *petB-H202Q*. Encadré vert, milieu minimum.

## Le mutant *Rccb2*, un variant de cytochrome *b<sub>6</sub>f* exempt d'hème *c<sub>i</sub>*.

En 2003, des données obtenues par cristallographie aux rayons X ont dévoilé la présence d'un hème supplémentaire au sein du cytochrome *b<sub>6</sub>f*, par opposition au complexe *bc<sub>1</sub>*, qui est conservé parmi tous les organismes à photosynthèse oxygénique. La catalyse de l'unique liaison covalente de l'hème *c<sub>i</sub>* au cytochrome *b<sub>6</sub>* est réalisée par une voie de maturation nommée système IV qui agit sur le côté *n* de la membrane en opposition avec les autres voies connues de maturation de cytochrome *c* qui agissent sur le côté *p*. Le système IV implique au moins quatre facteurs CCB.

La mutation *ftsH1-R420C* a été obtenue lors de la recherche de suppresseur avec pour mutant de départ, le mutant *ccb2*. Nous avons ainsi récupéré un révertant (*Rccb2-306*) qui présente une accumulation de cytochrome *b<sub>6</sub>f* de type sauvage mais dépourvu d'hème *c<sub>i</sub>* (Figure 8). Des mesures spectroscopiques et de titration redox ont indiqué que les propriétés physicochimiques de l'hème *b* proche du site *Q<sub>i</sub>* étaient fortement affectées en absence de *c<sub>i</sub>*. Ces modifications, ajoutées à l'absence de *c<sub>i</sub>*, suppriment l'activité de réduction de quinone au sein du site *Q<sub>i</sub>*. De plus, nous avons montré qu'un *b<sub>6</sub>f* dépourvu d'hème *c<sub>i</sub>* présente une activité plastoquinone:plastocyanine oxidoreductase significative. Ce résultat démontre que l'hème *c<sub>i</sub>* n'est pas strictement exigé pour une croissance photosynthétique en accord avec notre découverte pour le mutant *Q<sub>i</sub>KO*. L'absence d'hème *c<sub>i</sub>* covalentement attaché dans le mutant *Rccb2* entraîne une photosensibilité accrue en présence d'oxygène ce qui sous-tend un rôle pour l'hème *c<sub>i</sub>* dans un environnement riche en oxygène.



**Figure 8 : Spectres (réduit – oxydé) des hèmes *b* et *c<sub>i</sub>* à partir de cytochrome *b<sub>6</sub>f* isolé.** Noir, complexe WT ; rouge, complexe *Rccb2*, bleu, [WT] – [Rccb2] ~ spectre d'hème *c<sub>i</sub>* (cf. Alric et al, *PNAS* 2005).

### Le mutant *FtsH1-R420C* (*ftsH1-1*)

Le domaine des protéases chloroplastiques a récemment connu un intérêt croissant en particulier du à leur rôle dans la réponse au stress oxydatif qui résulte de la combinaison d'oxygène moléculaire avec des espèces radicalaires, toutes deux produites lors de l'illumination de l'appareil photosynthétique. Des données de génomique et de protéomique ont permis l'identification d'un vaste jeu bien défini de protéases chloroplastiques d'origine bactérienne, dont la plupart sont codées par des gènes nucléaires, à l'exception de la sous-unité catalytique ClpP de la protéase Clp qui est codée par le génome chloroplastique. Les protéases Clp, Deg et FtsH sont les enzymes protéolytiques majeures dont l'activité a été impliquée dans le contrôle de biogenèse et la réparation de protéines photosynthétiques (Figure 9). Par exemple Clp, FtsH et Deg ont été identifié comme jouant un rôle dans la réparation de PSII lors de la photoinhibition. Cependant, les connaissances sur la diversité de substrats et la fonction régulatrice de ces protéases demeurent restreintes.

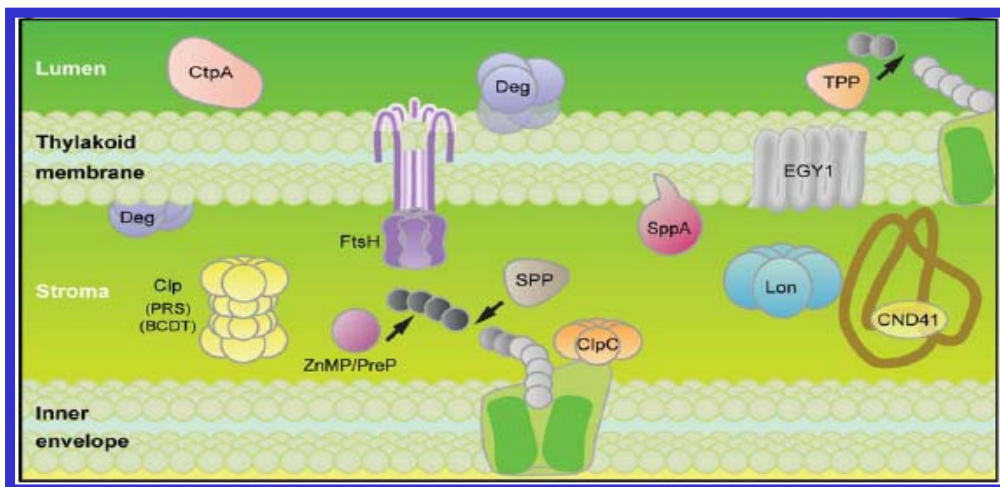
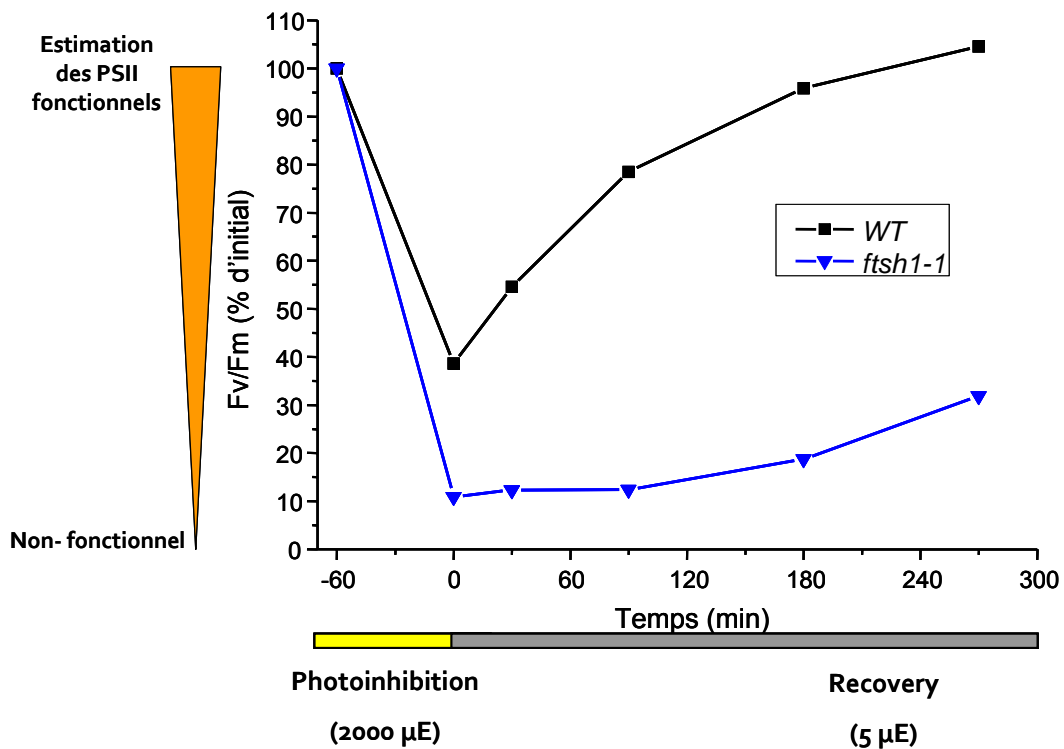


Figure 9 : Les protéases chloroplastiques. Sakamoto W, *Annu Rev Plant Biol* (2006) 57:599-621

De même qu'il a été montré chez les cyanobactéries et les plantes supérieures, nous avons montré que FtsH joue un rôle dans la réparation de PSII lors de la photoinhibition (Figure 10). De manière importante, nos résultats démontrent que sa fonction s'étend au-delà, par exemple dans le contrôle de l'accumulation du cytochrome *b<sub>6</sub>f* et du PSII dans des conditions de stress divers comme une carence en azote, soufre et ou phosphore. Nous proposons que la mutation ponctuelle d'un résidu arginine nécessaire pour l'hydrolyse d'ATP empêche la dégradation graduelle de protéines photosynthétiques membranaires par le complexe FtsH, en particulier lorsque les substrats sont difficiles à déplier.



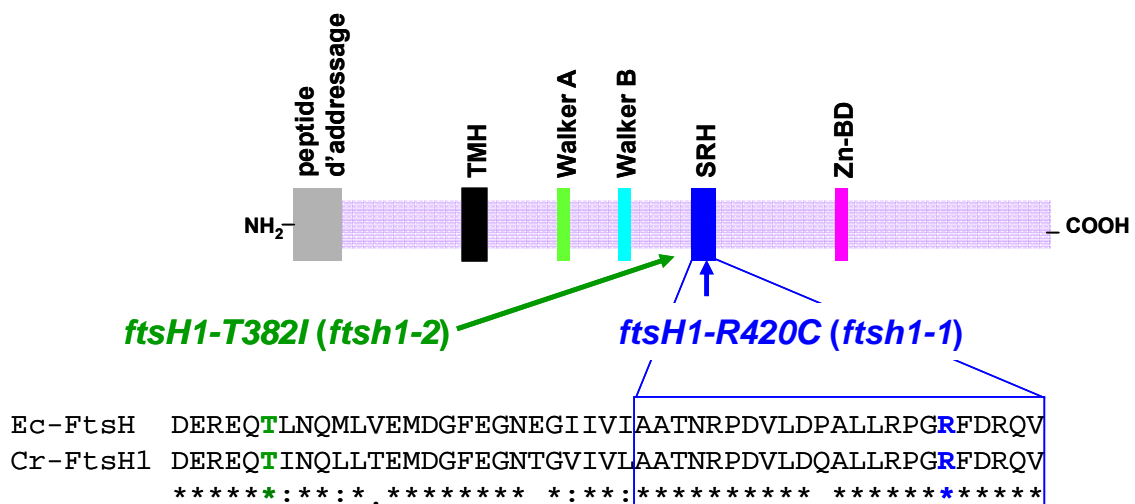


**Figure 10 : Le mutant *ftsh1-1* ne peut pas réparer le PSII endommagé suite à un traitement photoinhibiteur.** Mesures de la fluorescence sur culture cellulaire ; F0, fluorescence initiale ; Fm, fluorescence maximale ; Fv, fluorescence variable :  $Fv = Fm - F0$ .

Des résultats préliminaires indiquent la participation de FtsH dans la dégradation du PSI. Nos données identifient la protéase FtsH1 comme une enzyme d'entretien du chloroplaste majeure impliquée dans le contrôle qualité de nombreuses protéines et dans la régulation du contenu protéique de la membrane du thylakoïde en réponse à des changements de conditions environnementales.

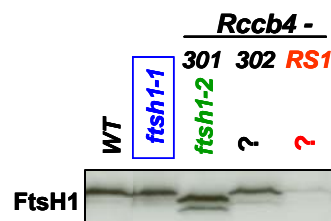
### Autres révertants obtenus et perspectives

La recherche de suppresseurs à partir de mutants *ccb* a été fructueuse. En effet, à partir du mutant *ccb4*, nous avons obtenu un autre allèle muté du gène *FTSH1* nommé *ftsh1-2*. De même que la mutation *ftsh1-1*, la mutation suppressueur *ftsh1-2* est une mutation ponctuelle qui affecte une thréonine très conservée du domaine ATPasique de FtsH1 (Figure 11).



**Figure 11 : Mutations *ftsH1* obtenues suite au criblage de recherche de suppresseur.** Représentation schématique de la protéase FtsH1, hélice transmembranaire (TMH), motifs ATPase Walker A et B, « second region of homology » (SRH), domaine de liaison du zinc (Zn-BD). Alignement du motif SRH de *Escherichia coli* (Ec-FtsH) et de *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr-FtsH1).

Comme la mutation *ftsH1-1*, la mutation *ftsH1-2* semble altérer la fonction de la protéase FtsH1 puisqu'elle permet l'accumulation de cytochrome *b<sub>6</sub>f* dépourvu d'hème *c<sub>i</sub>*. La fonction de la protéase est altérée mais son accumulation propre ne l'est pas (Figure 12). Son profil de migration est par ailleurs modifié ce qui peut être dû au changement d'acide aminé thréonine en isoleucine. Nous avons donc obtenu deux mutations ponctuelles distinctes dans la même protéase. Nous avons aussi obtenu un révertant qui présente un phénotype similaire aux autres révertants quant au cytochrome *b<sub>6</sub>f* mais qui ne présente pas de mutation directe au sein de la protéase FtsH1 ou FtsH2. De manière intéressante, c'est l'accumulation propre de la protéase FtsH1 qui est ici fortement diminuée. La ou les mutations restent à caractériser.



**Figure 12 : Niveau d'accumulation de la protéine FtsH1 chez divers mutants.** Les protéines cellulaires totales ont été séparées sur gel de polyacrylamide 12-18% et analysées par immunodétection avec un anticorps spécifique contre FtsH1 (anticorps obtenu à partir de FtsH1 d'*Arabidopsis* par Zach Adam). Les mutants *Rccb4* sont des révertants obtenus à partir du mutant *ccb4*.