HAL
open science

Reprogrammation du métabolisme cyanobactérien de Synechocystis sp. PCC6803 pour une meilleure photoproduction d'hydrogène

Jérémy Dutheil

To cite this version:

Jérémy Dutheil. Reprogrammation du métabolisme cyanobactérien de Synechocystis sp. PCC6803 pour une meilleure photoproduction d'hydrogène. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112057 . tel-01061465

HAL Id: tel-01061465

https://theses.hal.science/tel-01061465

Submitted on 6 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : Gènes, Génomes, Cellules
Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Cyanobactéries
IBiTec-S – SB2SM/UMR 8221 CNRS – LB2C - CEA-Saclay

DISCIPLINE : Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 26/04/2013

par

Jérémy DUTHEIL

Reprogrammation du métabolisme cyanobactérien de *Synechocystis* sp. PCC6803 pour une meilleure photoproduction d'hydrogène

Directeur de thèse : Dr.Corinne CASSIER-CHAUVAT ..... Directeur de Recherche ..... CNRS-CEA-Saclay

Composition du jury :

Président du jury : Pr. Fabrice CONFALONIERI.....Professeur ..... Université Paris XI
Rapporteurs : Dr. Annick MEJEAN.....Maître de conférence ..... Université Paris VII
Dr. Marc ROUSSET..... Directeur de Recherche .....CNRS Marseille
Examinateurs : Pr. Eric DUBREUCQ.....Professeur ..... SupAgro Montpellier

REMERCIEMENTS

En premier lieu je tiens à remercier tout personnellement Franck et Corinne de m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Ces 4 années m'ont profondément changé, au plan professionnel évidemment, mais aussi personnel, bien plus qu'il ne pourrait y paraître au simple regard. Je vous suis très reconnaissant d'avoir permis, orienté et encadré ce changement jour après jour. Comme nous nous le sommes déjà dit, m'accueillir était un pari risqué, pour vous comme pour moi, et finalement je pense qu'il n'en est sorti que du positif. Merci pour cette chance, et merci pour le cadre de travail unique que vous m'avez offert, j'ai essayé de m'en montrer le plus digne possible, avec les imperfections qui sont les miennes et que je peux parfois regretter. J'ai beaucoup appris sur moi et mon futur métier, vous m'avez transmis rigueur et méthode et vous n'êtes aussi pas pour rien dans l'amélioration de ma confiance en moi. Pour tout ça : merci !

Je tiens aussi à remercier chacun des membres du jury d'avoir accepté de se porter juges de mes travaux de thèse comme de mon manuscrit. J'espère après coup que la lecture a été plus intéressante que fastidieuse malgré mes digressions qui parsèment le document. J'espère aussi que cela restera un bon souvenir pour chacun en dépit de circonstances qui ont parfois pu être stressantes. Pour moi c'est en tout cas un souvenir agréable et j'ai pris beaucoup de plaisir à rédiger ce manuscrit. Merci pour les échanges scientifiques lors de ma soutenance, ils resteront gravés longtemps dans ma mémoire.

Merci également à tous les responsables du concours et de la formation Irtelis, en particulier Christophe Carles, d'avoir financé ma thèse ainsi que de m'avoir permis d'accéder aux modules de la formation doctorale Irtelis. Chacun des modules que j'ai suivi me sera d'une grande aide pour mes projets professionnels immédiats et futurs. Je garde un excellent souvenir de chacun des intervenants et encadrants des formations, en particulier Sylvie Esterlin, toujours enjouée, la plus présente et motivée auprès de notre promotion. Je voulais également remercier tous les autres thésards qui ont contribué à ce que ces moments soient à chaque fois extrêmement agréables, j'espère garder un contact proche avec nombre d'entre eux!

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier tous ceux qui ont joué un rôle de près ou de loin dans cette période de ma vie. Qui ont soit rendu le quotidien agréable dans les moments difficiles, soit qui ont été là pour m'enseigner et me former, ou parfois encore, qui ont fait les deux :

Bien évidemment, ma première pensée va vers Sam qui a le plus grand rôle dans mon aventure. Merci, Sam, pour ta personne et tes qualités de pédagogie, d'humanité et de patience. Tu sais tout le bien que je pense de toi et l'admiration que je te porte pour tes actes et ta personne. Tu sais aussi tout ce que je te dois. C'est bien simple : sans toi, le moi actuel n'existerait pas. Je n'insisterai pas beaucoup plus sur ces points ici, mais tu as toute ma reconnaissance, particulièrement pour la compréhension que tu as montrée lors des moments difficiles que j'ai vécus (mais pas que), et tu sais que je ferai de mon mieux à l'avenir si tu as besoin d'aide et que c'est dans mes cordes de t'aider.

Merci les filles, Marcia & Emilie, d'avoir rendu ces 4 années aussi merveilleuses au quotidien, au travail comme en dehors. Impossible de faire un détail de tous les bons moments passés, et de toute façon il y en aura tellement d'autres que c'est un peu ridicule de se disperser en solennités ici...

Merci Hervé pour tous ces échanges personnels et professionnels qui m'ont à chaque fois ravi, j'espère ne pas perdre le contact de sitôt !

Merci à toutes celles et ceux qui sont passés par le laboratoire, grâce à vous tous, j'ai ouvert mon esprit sur de bien étranges façons de penser et de voir le monde qui m'ont toutes enrichies.

Merci à ma famille de m'avoir fait et éduqué, je vais recycler un truc que j'ai déjà dit mais tanpis : je suis fier que vous soyez fiers de moi et je ferai de mon mieux pour que ça continue !

Merci tous, de m'avoir rejoint sur Paris, je sais que c'est plus la crise qui vous y a poussés que mon charisme, mais c'était bien drôle quand même de vous avoir ici ! J'espère que vous allez finir par

me suivre une fois de plus de retour à Montpellier maintenant ! Merci à ma Zazou d'être aussi géniale et merveilleuse, tu es pour moi une éternelle source d'inspiration et d'admiration. Je ne pourrai jamais louer suffisamment ces qualités qui sont les tiennes et qui font que chaque matin je me lève et je me dis : « Halala... Une bien belle journée de plus qui commence! ». Tu es le soleil de ma nuit, la guimauve à la meringue de mon chocolat-chaud-chantilly, la petite mousse sucrée de mon panaché... Et tu as intérêt à t'en rappeler longtemps parce que ce n'est pas demain la veille que je réécrirai un truc aussi niais... *bleurk...*

D'un point de vue encore plus personnel, merci à celles et ceux qui étaient présents au début et pas à la fin, ça a été difficile à digérer mais c'est qu'il devait bien y avoir une raison, je m'y suis fait, j'ai appris, j'ai grandi... Symétriquement, merci à celles et ceux qui sont apparus à la fin et n'étaient pas là au début, c'est toujours tellement agréable de découvrir des gens merveilleux ! (et pourvu que ça dure ! Longtemps !)

Merci aussi à toutes celles et ceux qui ne se sont reconnus dans aucune de ces salves (et pourtant vous êtes sûrement inclus dans l'une d'elles) : mais dans l'hypothèse où, vraiment, j'aurais oublié quelqu'un : c'est parce que tu es tellement important que je t'oublie! Un peu comme j'oublierais mon téléphone, ou ma carte bleue au moment où j'en ai le plus besoin...

Merci !

AVANT-PROPOS

Organisation du manuscrit

L'objet de cette thèse est une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp. PCC6803, une cyanobactérie modèle. Ce projet, qui vise à terme à améliorer la photoproduction d'hydrogène de la cyanobactérie, présente un double intérêt : à la fois fondamental et appliqué, pouvant le rendre particulièrement délicat à présenter. Ainsi, dans un souci de l'introduire au mieux et de ne pas risquer de le cantonner à une seule de ses deux facettes, j'ai fait le choix d'une présentation qui permettrait, je l'espère, de le situer dans ses différents macro et micro-contextes, appliqués et fondamentaux.

Ce manuscrit de thèse s'articule ainsi en quatre sections : une introduction générale, deux parties présentant mes différents résultats, et une conclusion avec perspectives.

1. L'introduction générale présente les différents contextes de mon sujet de thèse, elle est divisée en 3 chapitres :

Le **premier chapitre** décrit les enjeux énergétiques et environnementaux présents et à venir. Le cycle du carbone, le réchauffement climatique et les différentes ressources énergétiques actuellement exploitées par l'Homme seront ici évoquées et ce premier bilan conclue à l'intérêt d'un développement durable dans lequel les énergies photosynthétiques doivent tenir une place de choix.

Le **deuxième chapitre** traite de la molécule de dihydrogène elle-même : une molécule simple mais rare, qui promet de nombreuses solutions mais qui présente aussi de nombreux défis technologiques. Seront ici évoqués : les différentes utilisations actuelles et futures de la molécule ainsi que ses principaux modes de production : physicochimiques et biologiques. Un détail des enzymes et des voies qui sont responsables de la production biologique d'hydrogène sera également effectué et permettra de conclure sur l'intérêt de la recherche sur l'hydrogène photosynthétique et en particulier à partir des cyanobactéries.

Le **troisième chapitre** traite de plusieurs caractéristiques des cyanobactéries en général, de *Synechocystis* sp. PCC6803 en particulier, ainsi que des principaux agents de la photosynthèse cyanobactérienne. Ensuite, un éventail des connaissances actuelles concernant l'hydrogénase bidirectionnelle, chez les cyanobactéries et *Synechocystis*, est effectué, traitant de son rôle probable chez ces organismes, de ses caractéristiques intrinsèques, de sa maturation et de quelques brefs éléments de sa régulation transcriptionnelle.

2. La première partie contient une introduction spécifique (le chapitre 4), suivie de mon premier article et de résultats supplémentaires:

Le **quatrième chapitre** délimite le cadre strict du sujet. Y sont évoqués les 2 régulateurs connus de l'hydrogénase de *Synechocystis* sp. PCC6803 : LexA et AbrB1. Plusieurs généralités concernant les deux superfamilles de protéines auxquels ils appartiennent seront compilées, puis un zoom sur leurs rôles connus dans le métabolisme de *Synechocystis* sera effectué.

Le **premier article**, dont je suis co-premier auteur, traite de l'identification d'un membre de la superfamille des protéines CyAbrBs, AbrB2, comme répresseur de l'expression de hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*.

Suivent ensuite plusieurs résultats supplémentaires non publiés, qui complètent les connaissances actuelles autour de la régulation de l'hydrogénase bidirectionnelle, et qui permettent de construire le réseau de régulation qui contrôle l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle.

3. La deuxième partie contient une courte introduction (chapitre 5), suivie du manuscrit soumis de mon deuxième article et de résultats supplémentaires :

Le **cinquième chapitre** traite du stress oxydant en général, auxquels sont soumis les organismes, des diverses techniques biologiques de résistance et d'évacuation de ce stress et notamment d'un processus particulier : la glutathionylation qui protège et module l'activité des protéines soumises à un stress oxydant.

Suit ensuite une autre partie de mes travaux de thèse, ici rapportée sous la forme du **manuscrit de mon deuxième article** et de résultats connexes. Ces travaux décrivent un mécanisme nouveau et inédit de la régulation post-traductionnelle du régulateur AbrB2. La modification de son unique cystéine par S-glutathionylation, que nous avons identifiée, module son activité régulatrice en fonction du niveau de stress oxydant auquel est soumise la cellule. Les résultats décrivent la caractérisation du rôle important de la cystéine d'AbrB2 ainsi que de sa modification.

4. Suivent enfin, une conclusion, sous forme de résumé, de mes travaux, ainsi que quelques perspectives à envisager pour continuer la caractérisation du métabolisme de l'hydrogène.

L'ensemble de mes travaux apporte une meilleure compréhension des mécanismes qui régulent l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*, et participent à la levée de plusieurs verrous qui limitent la production d'hydrogène par les cyanobactéries.

Ces connaissances nouvelles permettront, nous l'espérons, d'aider à construire une filière de production de photohydrogène durable et performante.

PLAN

REMERCIEMENTS 1

AVANT-PROPOS Organisation du manuscrit 5

PLAN 9

LISTE DES FIGURES ET TABLES 16

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 : Cycle du carbone, Réchauffement climatique et Energies 23
1- La photosynthèse : condition du développement de la vie sur Terre 23
1-1- Créatrice de complexité chimique 23
1-2- Source de toute vie sur Terre 23
2- Le cycle du carbone, la formation du pétrole & le réchauffement climatique 25
2-1- Dimension temporelle du cycle du carbone 25
2-2- Dimension spatiale du cycle du carbone 26
2-3- La société humaine et le confort modernes sont sous perfusion d'énergie fossile épuisable 28
2-4- Un climat qui pourrait s'emballer ? 28
3- L'Energie 28
3-1- Qu'est-ce que l'énergie? 29
3-2- La vie & l'énergie 29
3-3- L'homme et l'énergie 30
3-4- Les énergies carbo-émettrices 31
3-5- Les énergies dites « propres » et « renouvelables » 32
3-6- La nécessité du développement durable et des énergies propres 35

CHAPITRE 2 : L'Hydrogène & les hydrogénases 37
1- Abondance de l'hydrogène 37
2- Quelques caractéristiques du dihydrogène 38
3- Les diverses utilisations de la molécule de dihydrogène 39
3-1- L'hydrogène combustible 39
3-1-1- Un carburant classique 39
3-1-2- La pile à combustible (pile à hydrogène) 40
3-2- Le dihydrogène vecteur énergétique 41
3-3- Le stockage du dihydrogène 41
3-3-1- Le stockage comprimé 41
3-3-2- Le stockage liquide cryogénique 42
3-3-3- Le stockage en hydrures métalliques 42
3-4- L'hydrogène réactif chimique 43
3-4-1- Hydrogénation catalytique pour l'industrie chimique 43
3-4-2- Hydrogénation catalytique pour l'industrie agroalimentaire 44
3-4-3- L'huile de palme : une huile controversée 45
4- La production d'hydrogène dans le monde: fruit de la combustion des hydrocarbures fossiles 46
4-1- Vaporéformage d'hydrocarbures fossiles 46
4-2- Electrolyse de l'eau 47
4-3- Intérêt d'une source de dihydrogène propre et renouvelable 47

5- La production d'hydrogène à partir du vivant 49
5-1- Production d'hydrogène par fermentation de matière organique chez les bactéries anaérobies 49
5-2- La biophotolyse 50
5-2-1- Directe 50
5-2-2- Indirecte 50
5-3- La production d'H_2 par fermentation de matière organique chez les bactéries fixatrices d'azote 51
5-4- Photofermentation 51
5-5- Potentiel du biohydrogène photolytique 52
6- Les enzymes liées au métabolisme du dihydrogène 53
6-1- Les nitrogénases 53
6-2- Les hydrogénases 54
6-2-1- Généralités 54
6-2-2- Les hydrogénases à [FeFe] : 55
6-2-3- Les hydrogénases à [NiFe] 58
6-2-3-1- Les différents groupes 59
6-2-3-2- Assemblage des hydrogénases à [NiFe] 61
6-2-3-3- Résistance à l'oxygène des hydrogénases à [NiFe] 62

CHAPITRE 3 : Les Cyanobactéries, *Synechocystis* sp. PCC6803, la photosynthèse & l'hydrogénase bidirectionnelle 65
1- Les cyanobactéries 65
1-1- Que sont-elles ? 65
1-2- Apparition et impact géologique des cyanobactéries 66
1-3- Les cyanobactéries aujourd'hui 67
1-4- Intérêt biotechnologique 68
1-5- Classification des cyanobactéries 69
1-5-1- Classification phylogénétique des cyanobactéries. 69
1-6- Taxonomie des cyanobactéries 71
1-7- Quelques caractéristiques des cyanobactéries 73
1-8- Culture de cyanobactéries 75
2- *Synechocystis* sp. PCC6803 76
2-1- Physiologie de *Synechocystis* sp. PCC6803 76
2-2- Génétique de *Synechocystis* 77
3- La photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries et *Synechocystis* 77
3-1- Le thylakoïde 78
3-2- Les phycobilisomes 78
3-3- Le photosystème II 80
3-4- Le complexe cytochrome *b6/f* 82
3-5- L'ATP synthase 83
3-6- Le photosystème I 83
3-7- Ferrédoxine/flavodoxine et FNR 84
3-8- La chaîne de transfert d'électrons 84
3-9- *Synechocystis* et l'hydrogène 86
4- L'hydrogénase bidirectionnelle HoxEFUYH de *Synechocystis* 87
4-1- L'enzyme 87
4-2- Région génomique de *hox* 90
4-3- Assemblage du site [Ni-Fe] 91

4-4- Transcription de l'opéron *hoxEFUYH* 92
4-4-1- L'ARN messager 92
4-4-2- Le niveau de transcription 93
4-4-3- Une régulation traductionnelle? 94
4-4-4- Les facteurs impliqués dans la transcription de l'opéron *hox* 94
4-4-5- Fonctionnement de l'hydrogénase de *Synechocystis* 94
4-4-6- Bilan sur l'hydrogénase de *Synechocystis* 95
4-5- Rôle biologique 97
4-5-1- Les rôles supposés 97
4-5-2- Un lien entre environnement et fonction? 99

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE 4 : Les régulateurs de l'hydrogénase, les CyAbrBs et AbrB2 105
1- Le régulateur transcriptionnel LexA 105
1-1- LexA, régulateur transcriptionnel lié à la réponse aux dommages à l'ADN 105
1-1-1- LexA et la « réponse SOS » 105
1-1-2- Importance biologique de LexA 107
1-1-3- Structure de LexA 107
1-2- CyLexA : LexA chez les cyanobactéries. 108
1-2-1- Structure de la protéine CyLexA 109
1-2-2- Que régule CyLexA ? 111
1-3- CyLexA régule le promoteur de l'opéron *hox* 112
1-3-1- Chez *Synechocystis* sp. PCC6803 112
1-3-2- Chez *Nostoc* sp. PCC7120 113
1-4- Bilan 113
2- AbrB 114
2-1- Le régulateur transcriptionnel AbrB 114
2-1-1- Régulateurs de l'état de transition 114
2-1-2- Rôle d'AbrB dans la sporulation chez *B.subtilis* 114
2-1-3- Structure des régulateurs AbrB-like 116
2-1-3-1- Historique 116
2-1-3-2- Détail de la structure 117
2-1-4- Interaction d'AbrB avec l'ADN 120
2-1-5- Autres représentants de la famille AbrB 121
2-1-5-1- Généralités 121
2-1-5-2- Les 8 groupes de la famille des « AbrB-like » 122
2-2- CyAbrBs, des protéines de cyanobactéries possédant des domaines AbrB 125
2-2-1- « AbrB-like » de cyanobactéries et CyAbrBs. 126
2-2-2- Particularités des CyAbrBs. 127
2-2-2-1- Structure des CyAbrBs. 127
2-2-2-2- Région génomique des gènes *abrB1* et *abrB2* 131
2-2-2-3- Régulation de gènes par les CyAbrBs 133
2-2-2-4- AbrB1 régule l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* 137
2-2-3- Bilan sur les CyAbrBs : 138

3- Bilan sur la régulation de l'hydrogénase: 139
3-1- Les facteurs environnementaux 139
3-2- Les facteurs de transcription 140
3-3- Autres informations 140
3-4- Conclusion 141

ARTICLE I : AbrB2 est un répresseur de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp. PCC6803 143
1- Un nouvel acteur de la régulation génique de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*..... 143
1-1- La biologie intégrative..... 143
1-2- Introduction & résumé de l'article Dutheil et al. 2012 147
Article I 149
1-3- Conclusion 156
2- Résultats complémentaires 161
2-1- Le mutant *abrB1*::Km^r /$AbrB1^+$ 162
2-2- Le mutant Δ*abrB2* 163
2-2-1- Le contenu pigmentaire de Δ*abrB2* est différent de la souche sauvage..... 163
2-2-2- Phénotypes de résistance de *ΔabrB2* 163
2-3- Les mutants Δ*lexA* et Δ*cymR (construits par Panatda Saenkham et Sandrine Farci)* 164
2-4- AbrB2 empêche d'observer l'effet de LexA sur la promotion de *hoxE* 164
2-5- Régulation de *ssr2227* par AbrB2 et LexA..... 165
2-6- Effet de LexA et AbrB2 sur *lexA* 166
2-7- Effet d'AbrB2, CymR et LexA sur *cymR* 167
2-8- Effet d'AbrB2 et LexA sur *abrB1* 167
2-9- Effets des paramètres environnementaux et des régulateurs AbrB1, AbrB2, LexA et CymR sur *abrB2* 167
2-10- Constitution du réseau de régulation de *hox* 168
2-11- Construction d'une souche produisant plus d'hydrogénase 169
2-12- Le transcriptome d'*abrB2* 170

DEUXIEME PARTIE
CHAPITRE 5 : Le stress oxydant, le glutathion & les mécanismes de résistance 175
1- Stress oxydant : le dioxygène n'oxyde pas la matière vivante..... 175
2- La photosynthèse et le stress oxydant 175
3- Les espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species en anglais ou ROS)..... 176
3-1- Les ROS..... 176
3-2- Autres dommages générés par les ROS 177
3-3- Les systèmes de protection contre les ROS et le stress oxydant..... 177
3-3-1- Systèmes passifs de récupération du stress oxydant 177
3-3-2- Systèmes actifs de récupération des ROS 178
4- Le glutathion GSH 179
4-1- Qu'est-ce que c'est ? 179
4-2- Voie de biosynthèse du glutathion 179
4-3- Maintien de l'homéostasie des thiols de protéines par le GSH et le système glutarédoxines. 180
4-4- Glutathionylation : une modification post-traductionnelle qui affecte l'activité des protéines 181
4-5- AbrB2 existe sous au moins deux forme *in vivo* 182

ARTICLE II : La régulation exercée par le répresseur de l'opéron *hox* AbrB2 est dépendante de son unique cystéine qui est modifiée post-traductionnellement. 185
1- Introduction & résumé du manuscrit de l'article Dutheil et al. (en cours de rédaction) 185
1-1- Préliminaire 185
1-2- Introduction & résumé de l'article Dutheil et al. 2013 186
Manuscrit Article II 189
1-3- Conclusion 226
2- Résultats supplémentaires 228
2-1- L'unique cystéine d'AbrB2 est importante pour l'expression de l'ensemble de son régulon. 228
2-2- Les ARN non-codant en amont et aval sont sensibles à AbrB2 234
2-3- La formation des complexes d'AbrB2 est dépendante de mécanismes redox 235
2-4- Une hypothèse 236

CONCLUSION & PERSPECTIVES 239
1- Conclusion 240
2- Perspectives 244

MATERIELS & METHODES 247

REFERENCES 266

LISTE DES FIGURES

Liste des figures		
Figure #	**Nom**	**Page**
Figure 1	La photosynthèse, la complexité chimique et la chaîne alimentaire	20
Figure 2	La composition atmosphérique depuis 4 milliards d'années	21
Figure 3	La formation du pétrole	21
Figure 4	Le cycle du carbone et les flux associés	23
Figure 5	La population mondiale au cours du temps	24
Figure 6	La production d'énergie primaire dans le monde en 2011	27
Figure 7	Les émissions de carbone de différentes filières de production d'électricité	30
Figure 8	Les isotopes naturels de l'hydrogène (H)	34
Figure 9	La pile à combustible	36
Figure 10	Le mécanisme de l'hydrogénation catalytique	39
Figure 11	L'hydrogénation catalytique en agroalimentaire	40
Figure 12	L'huile de Palme rouge est la plus consommée au monde	41
Figure 13	Le procédé NExBTL de Neste Oil	41
Figure 14	Les différentes voies biologiques de production d'hydrogène	44
Figure 15	Les centres métalliques [FeFe] et [NiFe]	50
Figure 16	Le centre métallique [FeFe]	51
Figure 17	L'hydrogénase à [FeFe] de *Desulfovibrio desulfuricans*	51
Figure 18	Modèle de travail du procédé d'assemblage des hydrogénases à [FeFe]	53
Figure 19	Le centre métallique [NiFe]	54
Figure 20	L'hydrogénase dimérique de la bactérie pourpre non sulfureuse *Allochromatium vinosum*	54
Figure 21	Schéma de la phylogénie des hydrogénases à centre [NiFe]	55
Figure 22	Le centre métallique [NiFe]	57
Figure 23	Le réseau de maturation des hydrogénases à [NiFe] chez *E.coli*	58
Figure 24	Structure de l'hydrogénase à [NiFe] de *D.fructosovorans*	58
Figure 25	*Spirulina platensis*	61
Figure 26	Photobioréacteurs industriels	61
Figure 27	Les ères géologiques depuis la formation de la Terre	62
Figure 28	Transmission du chloroplaste dans l'arbre de la vie	63
Figure 29	Macroflore épiphytaire dans une jungle	64
Figure 30	Utilisation biotechnologique des cyanobactéries	64
Figure 31	Production industrielle de biomasse: différents procédés	65
Figure 32	L'arbre phylogénétique de la vie, zoom sur les bactéries	66
Figure 33	Diversité morphologique des cyanobactéries	67
Figure 34	Photographies de cyanobactéries collectées par l'expédition Tara Océans	69
Figure 35	La taille de différents génomes de cyanobactéries séquencées	69
Figure 36	Phylogénie des 58 cyanobactéries séquencées	70
Figure 37	*Synechocystis* sp. PCC6803	72
Figure 38	Le chromosome et les 7 plasmides de *Synechocystis* sp. PCC6803	73
Figure 39	La photosynthèse oxygénique des cyanobactéries	73
Figure 40	Le thylakoïde de *Synechocystis* sp.PCC6803 (micrographie)	74
Figure 41	Le thylakoïde de *Synechocystis* sp.PCC6803 (reconstruction en 3D)	74

Figure 42	Phycobilisome (vue schématique)	74
Figure 43	Deux phycobilines	75
Figure 44	Phycobilisome, le cœur et les antennes (microscopie électronique)	75
Figure 45	Le photosystème II (vue schématique)	76
Figure 46	Le complexe photosystème II + phycobilisome	76
Figure 47	La molécule de chlorophylle a	76
Figure 48	La molécule de béta-carotène	76
Figure 49	Crystal de photosystème II: position des pigments et du site actif	77
Figure 50	Le cytochrome *b6/f* (vue schématique)	78
Figure 51	Le cytochrome *b6/f* (cristal)	78
Figure 52	Une plastocyanine de *Synechococcus* sp. PCC7942	78
Figure 53	L'ATP synthase (vue schématique)	78
Figure 54	L'ATP synthase (cristal)	78
Figure 55	Le photosystème I (vue schématique)	79
Figure 56	Un trimère de photosystème I, les pigments et le site actif (cristal)	79
Figure 57	Un monomère de PSI et le site de fixation probable de la ferrédoxine	79
Figure 58	Une ferrédoxine cyanobactérienne	80
Figure 59	La ferrédoxine alimente en électron l'ensemble des voies métaboliques	80
Figure 60	La chaîne de transfert d'électrons et la photophosphorylation autour du processus de photosynthèse chez les cyanobactéries	81
Figure 61	La chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques et le métabolisme de l'hydrogène	82
Figure 62	Deux vues schématiques de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp. PCC6803	85
Figure 63	L'entrée du canal des gaz de la sous-unité HoxH de *D.fructosovorans*	85
Figure 64	Organisation génomique des complexes *hox* et *hyp* de quelques cyanobactéries	86
Figure 65	Le centre métallique [NiFe]	87
Figure 66	Le complexe HypABCDEF (cristallisation des protéines)	87
Figure 67	Production d'H_2, O_2 et CO_2 par *Synechocystis*	90
Figure 68	Assemblage de l'hydrogénase bidirectionnelle de Synechocystis	92
Figure 69	Le processus de fermentation	93
Figure 70	Lieux d'isolation de quelques cyanobactéries	96
Figure 71	Mécanisme de la réponse SOS	102
Figure 72	Les différents éléments structurels de LexA	103
Figure 73	Changements conformationnels par la charnière de LexA	104
Figure 74	Les deux conformations du monomère LexA	104
Figure 75	Alignement de séquence de différents LexA	105
Figure 76	Localisation cellulaire de LexA	106
Figure 77	Site de fixation de LexA en amont du promoteur de *hoxE*	108
Figure 78	Organisation de la région génomique de *Nostoc* sp. PCC7120 autour des clusters *hox*	109
Figure 79	Le cycle de la sporulation chez *B.subtilis*	111
Figure 80	Complexité du phosphorelais et rôle d'AbrB	111
Figure 81	Ancienne structure du dimère AbrB proposée en 2000	112
Figure 82	Structure du dimère AbrB et comparaison avec MazE et MraZ	112
Figure 83	Structures du domaine AbrB, variations entre AbrB, Abh et SpoVT	114
Figure 84	Structure d'AbrB de *B.anthracis*	115
Figure 85	Interaction du tétramère AbrB avec l'ADN	116
Figure 86	Les 3 possibilités d'interaction d'AbrB avec l'ADN (schéma)	116

Figure 87	Changements conformationnels d'AbrB en interaction avec l'ADN	117
Figure 88	Les 8 groupes de protéines de la superfamille d'AbrB	118
Figure 89	Domaine PIN	119
Figure 90	Mécanisme de l'addiction toxine/antitoxine de MazE/MazF	119
Figure 91	Structure de la protéine MraZ possédant 2 domaines AbrB	120
Figure 92	Le régulateur Sso7c4 de l'archée *S.solfataricus*	120
Figure 93	Les CyAbrBs en 2008. groupes phylogénétiques, conservation des domaines AbrB en C-terminal, et de la cystéine en N-terminal	124
Figure 94	Modélisation tridimensionnelle d'un CyAbrB	126
Figure 95	Zoom sur les domaines AbrB des CyAbrBs, résidus conservés	126
Figure 96	Régions géniques autour des AbrB1 et AbrB2	127
Figure 97	Les CyAbrBs en 2013. Les groupes phylogénétiques de CyAbrBs, et les cyanos possédant une hydrogénase bidirectionnelle	128
Figure 98	Site de fixation d'AbrB1 en amont du promoteur de *hoxE*	133
Figure 99	Site de fixation d'AbrB1 et LexA en amont du promoteur de hoxE, positions des ARNs non-codants	136
Figure 100	Les différents niveaux de régulation du gène au produit d'intérêt - L'approche Intégrative	139
Figure 101	L'architecture du promoteur de l'opéron *hox*: sites de fixation de AbrB1, LexA et AbrB2	157
Figure 102	Le mutant *abrB1::Km*^{r}/AbrB1+	158
Figure 103	Contenu pigmentaire d'*abrB1::Km*^{r}/AbrB1+	158
Figure 104	Contenu pigmentaire de *ΔabrB2*	159
Figure 105	Effet d'AbrB2 et LexA sur différentes régions promotrices en amont de *hoxE*	160
Figure 106	Effet d'AbrB2 et LexA sur le promoteur de *ssr2227*	161
Figure 107	Effet d'AbrB2 et LexA sur le promoteur de *abrB1*	163
Figure 108	Effet de différents régulateurs sur le promoteur de *abrB2*	164
Figure 109	Représentation du réseau de régulation qui contrôle l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle chez *Synechocystis* sp. PCC6803	165
Figure 110	Production d'hydrogène de différents mutants des régulateurs de *hox*	166
Figure 111	Spectre d'absorption du surnageant de culture de la souche sauvage et du mutant *ΔabrB2* en fonction du temps	169
Figure 112	Le surnageant de culture du mutant *ΔsigF*	171
Figure 113	Synaco clive les apo-caroténoides pour les transformer en rétinal	171
Figure 114	Les espèces réactives de l'oxygène	176
Figure 115	La voie de biosynthèse du glutathion	179
Figure 116	Le stress oxydant oxyde le pool de glutathion et oxyde/glutathionyle les protéines	180
Figure 117	Le processus de déglutathionylation par les Grx	180
Figure 118	Modèle de la régulation redox du régulateur OxyR de *E.coli*	181
Figure 119	AbrB2 existe sous au moins deux formes différentes chez *Synechocystis* sp. PCC6803	182
Figure 120	Le modèle de la régulation post-traductionnelle de l'activité d'AbrB2	226
Figure 121	Carte du métabolisme central - transcriptome de *ΔabrB2*	227
Figure 122	Carte du métabolisme central - transcriptome des souches réintroduites en allèle *abrB2* sauvage ou C34S	228
Figure 123	Carte des plasmides pSYSX et pSYSM - transcriptome de *ΔabrB2*	229
Figure 124	Carte des plasmides pSYSX et pSYSM - transcriptome des souches réintroduites en allèle *abrB2* sauvage ou C34S	230
Figure 125	Réponse transcriptomique des gènes significatifs du régulon AbrB2 dans les souches réintroduites en allèle abrB2 sauvage ou C34S	231
Figure 126	Réponse transcriptomique des gènes régulés négativement du régulon AbrB2 dans les souches réintroduites en allèle *abrB2* sauvage ou C34S	232

Figure 127	AbrB2 réprime les ARN non-codants autour du cluster *hox*	233
Figure 128	Les différentes espèces AbrB2 détectées par western blot dans la souche WT+pFC1abrB2	235
Figure 129	Représentation du réseau de régulation qui contrôle l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle chez *Synechocystis* sp. PCC6803	241
Figure 130	Le modèle de la régulation post-traductionnelle de l'activité d'AbrB2	244

Liste des Tables

Table #	Nom	Page
Table 1	Compositions élémentaires su système solaire, du soleil et de la Terre	33
Table 2	Compositions élémentaires de l'océan et de l'atmosphère	34
Table 3	Energies massique et densité d'énergie de quelques combustibles	35
Table 4	Capacité de stockage d'hydrogène de certains hydrures métalliques	38
Table 5	Les 4 types de bioproduction de dihydrogène	45
Table 6	Les 4 groupes d'hydrogénases à [NiFe]	55
Table 7	Les 5 groupes phylogénétiques de cyanobactéries	67
Table 8	Les 5 groupes phylogénétiques de cyanobactéries (récent)	68
Table 9	Caractéristiques de quelques phycobilines	75
Table 10	Découverte des hydrogénases bidirectionnelles chez les cyanobactéries	84
Table 11	Les sous-unités de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*	84
Table 12	Les variations transcriptomiques des gènes *hox* et des 3 régulateurs LexA, AbrB1 et AbrB2 en réponse à différentes conditions environnementales	135

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1

Cycle du carbone, Réchauffement climatique et Energies

CHAPITRE 2

L'Hydrogène & les hydrogénases

CHAPITRE 3

Les Cyanobactéries, *Synechocystis* sp. PCC6803, la photosynthèse & l'hydrogénase bidirectionnelle

CHAPITRE 1

Cycle du carbone, Réchauffement climatique et Energies

*Ce **premier chapitre** décrit les enjeux énergétiques et environnementaux présents et à venir. Le cycle du carbone, le réchauffement climatique, les différentes ressources énergétiques actuellement exploitées par l'Homme seront ici évoquées et ce premier bilan amène la conclusion de l'intérêt d'un développement durable dans lequel les énergies photosynthétiques doivent tenir une place de choix.*

1- La photosynthèse : condition du développement de la vie sur Terre

1-1- Créatrice de complexité chimique

La photosynthèse est un processus biologique qui utilise l'énergie solaire, l'eau et le dioxyde de carbone afin de créer des molécules plus complexes indispensables au fonctionnement des cellules.

Le photosystème II capte l'énergie solaire via ses antennes photosynthétiques, les molécules qu'elles contiennent atteignent alors un état excité, chargées d'énergie, et cette énergie est ensuite utilisée pour rompre la liaison chimique des molécules d'eau et en extraire 4 protons et 4 électrons (c'est cette opération qui dégage le dioxygène). Ces électrons voyagent ensuite dans la cellule de complexe protéique à complexe protéique par excitation de molécules, jusqu'à atteindre la ferrédoxine qui va transmettre cette énergie à différentes enzymes qui s'en serviront pour, à partir des nutriments élémentaires : carbone, azote et soufre naturellement disponible dans l'environnement, créer les briques de la vie : acides nucléiques, acides aminés, sucres et lipides, avec quoi la cellule fabriquera ses membranes cellulaires, ses protéines et enzymes et pourra multiplier son patrimoine génétique (l'ADN) et ainsi se multiplier par division (une description plus détaillée du processus photosynthétique sera apportée dans le chapitre 3).

Ces briques du vivant sont créées à partir de la seule énergie solaire, par tous les organismes autotrophes réalisant la photosynthèse oxygénique. L'énergie solaire captée par ces organismes se trouve alors emprisonnée dans chacune de leurs molécules.

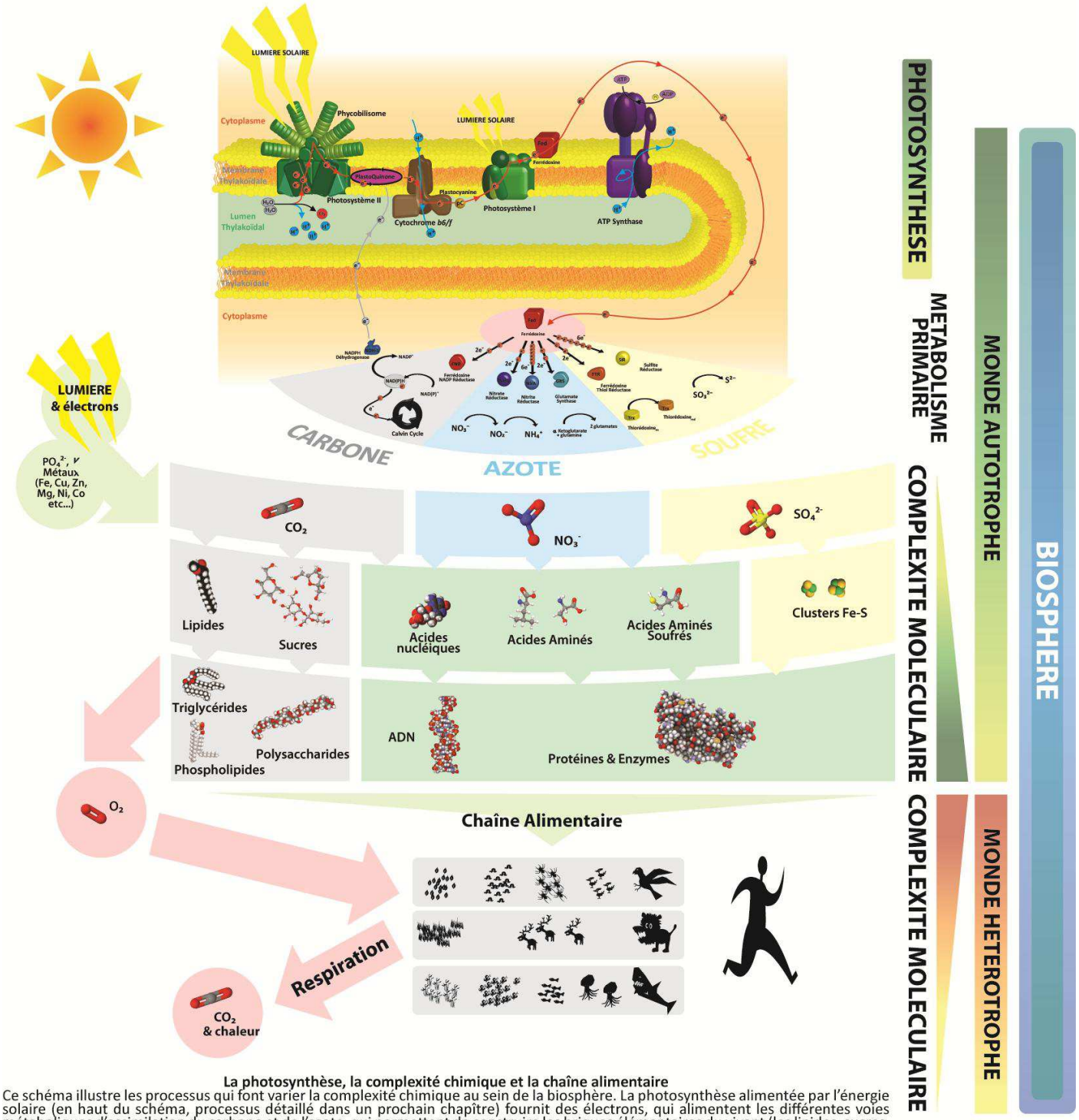
1-2- Source de toute vie sur Terre

Avant la vie, il n'y avait sur Terre que des atomes individuels, éventuellement réduits ou oxydés, la vie en a émergé très difficilement il y a plusieurs milliards d'années, cherchant divers moyens pour assurer sa pérennité à partir des seules ressources minérales dont elle disposait. Puis le vivant a connu sa plus grande révolution lorsque la photosynthèse est apparue.

La photosynthèse est le seul processus biologique terrestre qui a une balance de complexité chimique positive, c'est à dire qui, tout considéré, « créée » des molécules. Là où tous les autres procédés vivants brûlaient des molécules pour en créer d'autres, là où les premières formes de vie dépendaient des quelques molécules que le monde minéral seul avait pu fabriquer spontanément, la photosynthèse en créé à partir de la lumière du Soleil (virtuellement inépuisable).

A compter de cette découverte, toute la Biosphère dépendra pour sa survie de ce processus biologique : les organismes hétérotrophes ont trouvé dans ces nouveaux organismes une nouvelle source d'énergie infiniment plus rentable et abondante. Le développement du monde hétérotrophe ne s'est réellement développé de manière efficace que lorsqu'il a pu disposer des ressources

conséquentes apportées par la photosynthèse des organismes autotrophes. Ainsi, toute forme de vie terrestre voit dans chacune de ses cellules et chacune de ses molécules, couler l'énergie solaire captée un jour par un organisme photosynthétique par le biais du processus de la chaîne alimentaire. S'il ne s'agit pas de la molécule originellement créée, il s'agit alors d'une molécule créée via la consommation d'une molécule de la photosynthèse.



La photosynthèse, la complexité chimique et la chaîne alimentaire

Ce schéma illustre les processus qui font varier la complexité chimique au sein de la biosphère. La photosynthèse alimentée par l'énergie solaire (en haut du schéma, processus détaillé dans un prochain chapître) fournit des électrons, qui alimentent les différentes voies métaboliques d'assimilation du carbone et de l'azote, qui permettent de construire les briques élémentaires du vivant (les lipides, sucres, acides nucléiques, acides aminés etc...). Ces briques deviennent ensuite les macromolécules qui permettent de construire et maintenir la vie des organismes autotrophes. Les prédateurs hétérotrophes consomment ensuite ces molécules, en extraient l'énergie et la matière première nécessaire au maintien de leurs propres molécules, avec une diminution nette de la complexité chimique et de l'énergie contenue dans le stock de biomasse (dissipée sous-forme de chaleur) à chaque maillon de la chaîne alimentaire. Le soleil fournit l'énergie grâce à laquelle l'ensemble de la chaîne existe.

Figure 1

2- Le cycle du carbone, la formation du pétrole & le réchauffement climatique

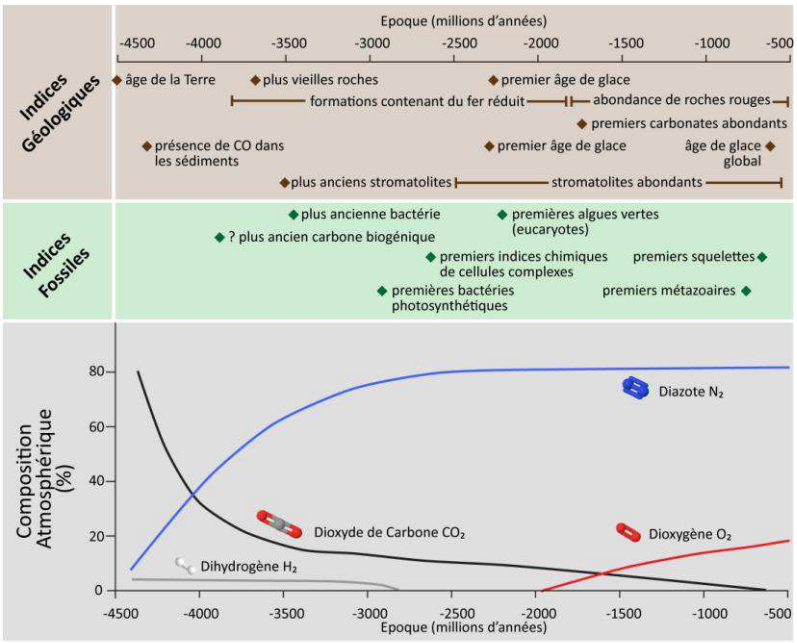
Comme décrit précédemment, avant la vie, et schématiquement, avant la photosynthèse, la majorité des atomes que contenait la planète Terre étaient présents sous leur forme élémentaire (carbone sous forme CO_2 ou CH_4, azote sous forme N_2, soufre sous forme SH_2 etc...). Lorsque la photosynthèse apparut, la vie commença à pouvoir transformer ce stock de molécules et à assembler ces briques en molécules plus complexes. Le cycle du carbone nous intéresse particulièrement parce que c'est son taux dans l'atmosphère à un instant t qui détermine la température d'une époque.

2-1- Dimension temporelle du cycle du carbone

Le carbone atomique est devenu du carbone moléculaire

La quantité d'atome de carbone sur Terre est finie. Elle n'a pas varié depuis la création de la Terre. A l'origine, la température terrestre était très élevée. L'eau n'était pas présente sous sa forme liquide. La Terre refroidissant peu à peu, l'eau a pu commencer à condenser, formant les océans et entrainant avec elle une grande partie du carbone atmosphérique. L'eau liquide permit alors l'apparition de la vie. Les premiers organismes photosynthétiques apparurent ensuite, et le carbone contenu dans l'air devint biomasse vivante, les atomes devinrent molécules plus complexes et vie. Cette nouvelle diminution du taux de carbone entraina une autre chute des températures et, couplée à différents évènements comme notamment l'augmentation du taux d'oxygène dans l'air par ces mêmes organismes, créa une atmosphère profondément différente à laquelle ces organismes n'étaient pas adaptés : diminution de la température et apparition d'une atmosphère très oxydante ont entrainé la mort en masse de ces organismes.

Figure 2



La composition atmosphérique depuis l'apparition de la Terre corrélée aux preuves géologiques et paléontologique dont nous disposons.

Le carbone moléculaire s'est retrouvé enfoui et, avec lui, le climat de l'époque

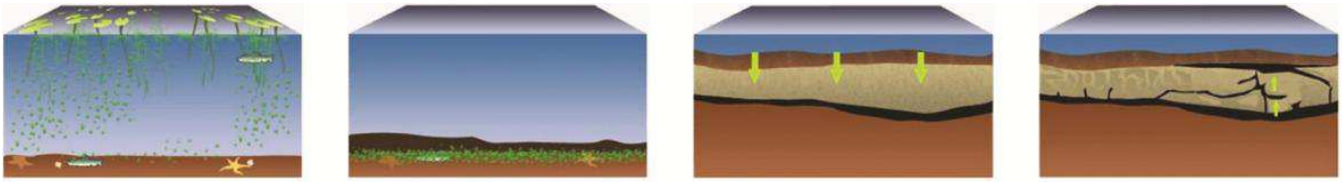


Figure 3 **Formation du Pétrole**

1/ les organismes photosynthétiques meurent en raison des variations climatiques et environnementales engendrées par leur prolifération. 2/ les cadavres coulent au fond des océans et sont recouvert par les sédiments. 3/ enfouie dans le sol, la biomasse subit une augmentation de la température et de la pression. 4/ la biomasse devient pétrole.

Ces premiers organismes vivants qui avaient capté dans leur biomasse le carbone atmosphérique moururent et leurs cadavres en vinrent à couvrir le fond des océans. Les mouvements des sols recouvrirent la biomasse et finirent par isoler durablement ce carbone de la biosphère. Emprisonnée dans les sols, cette biomasse carbonée souffrit d'augmentation de la pression et de la température et le carbone, autrefois aérien sous forme simple puis vivant sous forme moléculaire, devint alors

pétrole : de lourdes molécules composées d'atomes de carbones liés entre eux, retenant dans toutes ces liaisons chimiques de l'énergie solaire concentrée. Le pétrole n'est pas une ressource minérale, il s'agit bien d'une ressource organique, autrefois vivante.

La vie s'est adaptée progressivement au climat qui évoluait, formant petit à petit un écosystème stable. Néanmoins, ponctuellement, des variations soudaines du climat ont parfois entrainé ce qu'on appelle aujourd'hui les 6 grandes extinctions massives d'espèces.

On remarque que sur ces 6 extinctions massives, toutes ont cette fois eu pour cause un facteur externe à la biosphère. La plus connue de ces extinctions, et la plus récente, est celle qui a vu la disparition des dinosaures. Les raisons présumées de cette extinction sont des activités volcaniques extrêmes sans doute combinées à la chute d'un astéroïde. Ces 2 phénomènes, ne dépendant pas de la moindre activité biologique, ont obscurcit le ciel, perturbant grandement la photosynthèse. La disparition de beaucoup de plantes entraina mécaniquement la disparition des organismes herbivores, puis des carnivores s'en nourrissant. Ne survécurent à ces nouvelles conditions de vie que les quelques organismes charognards qu'étaient les petits mammifères, qui eurent ensuite la voie libre pour occuper toutes les niches écologiques libérées.

Un autre exemple marquant est la plus importante des extinctions massives (Permien-Trias il y a 252 millions d'années), celle-ci vit la disparition de plus de 95% des espèces marines et 70% des espèces terrestres. La raison est ici aussi d'origine extérieure à la biosphère : la raison présumée en est la tectonique des plaques qui aurait refermé un océan. Changeant ainsi les courants marins qui régulaient le climat et eutrophisant (diminution de l'oxygène) les océans (M.Benton 2005, *When life nearly died*).

On retiendra de ces catastrophes que, depuis 2 milliards d'années, les écosystèmes ont connus 6 remises à zéro, et qu'à chaque fois l'écosystème s'est effondré, non pas de lui-même, mais à cause d'un évènement hors de son contrôle, extérieur à l'écosystème. Nous vivons aujourd'hui une 7ème extinction de masse, et elle est, sur certains points, déjà plus grave que la pire des 6 précédentes, notamment en ce qui concerne le vitesse annuelle de disparition des espèces.

2-2- Dimension spatiale du cycle du carbone

On le sait, le taux de carbone atmosphérique, influe directement la température globale (au même titre que d'autres phénomènes comme les courants marins), notamment par le processus de l'effet de serre et de captation de chaleur (les liaisons chimiques carbonées CH et CO absorbent en effet très efficacement les rayonnements chauds et infra-rouges). La compréhension du cycle du carbone est donc un des leviers qui nous permettra de diminuer ce taux de carbone et peut-être espérer contrôler notre climat.

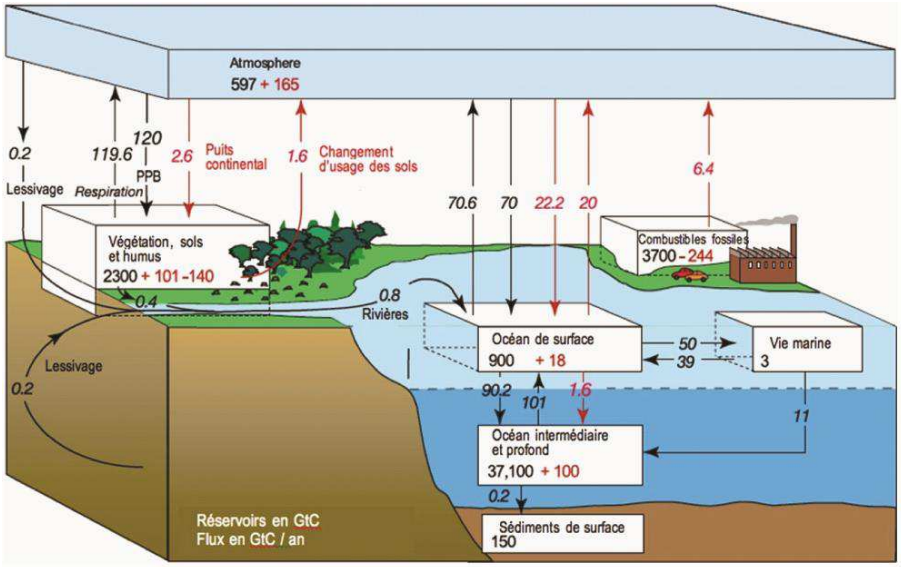
En dehors de toute activité humaine, le carbone terrestre se partage entre 3 lieux :

- L'atmosphère sous forme de dioxyde de carbone CO_2 ou de méthane CH_4. C'est le seul carbone qui participe à l'effet de serre et à la régulation climatique. Cette quantité de carbone est stable lorsque l'écosystème est lui aussi stable et non-perturbé.
- La biosphère sous forme de biomasse : lignocellulose des arbres, lipides membranaires et protéines de toutes les formes de vie etc... Ce carbone solide ne participe pas directement à l'effet de serre. Cependant le carbone de la biosphère s'échange en permanence avec le carbone atmosphérique via la photosynthèse des organismes autotrophes qui le fixent et la respiration des hétérotrophes qui en dégagent.
- La lithosphère sous forme de pétrole, gaz naturel et charbon. Ce carbone là ne participe plus depuis 2 milliards d'année à la régulation du climat.

La température globale est en bonne partie déterminée par la quantité de carbone contenue dans les 2 première « sphères », et particulièrement dans la première : l'atmosphère.

Depuis 2 milliards d'années ce taux de carbone était relativement stable (bien que soumis à certains cycles périodiques), mais, depuis quelques décennies, les activités anthropiques déséquilibrent profondément l'écosystème et la régulation climatique en perturbant le cycle du carbone naturel (les flèches rouges sur la figure 4).

Figure 4



Le cycle du carbone et les flux massiques associés.
Les flèches en noir correspondent aux flux tels qu'ils étaient équilibrés avant l'ère industrielle (avant 1750) les flèches en rouges correspondent aux variations depuis lors. Le bilan net pour l'atmosphère correspond à une augmentation de près de 30% de la quantité de carbone. (www.manicore.com)

En utilisant le pétrole et le charbon depuis la révolution industrielle, l'Homme a créé une communication entre la lithosphère et l'atmosphère. Ce faisant, le pool de carbone que se partagent l'atmosphère et la biosphère est augmenté: l'Homme injecte chaque jour de plus en plus de carbone dans un endroit où il n'a rien à faire.

En parallèle, l'Homme s'assure également que ce carbone reste le plus nocif possible en l'empêchant de se fixer dans la biosphère : en déforestant, la fixation du carbone est empêchée et le carbone reste dans la seule « sphère » où son impact est le plus important. L'Homme est en train de créer artificiellement une atmosphère carbonée, et mécaniquement plus chaude, que la Terre n'avait pas connue depuis des centaines de millions, voire des milliards d'années, avec tout ce que ça implique pour l'écosystème qui n'y est plus adapté.

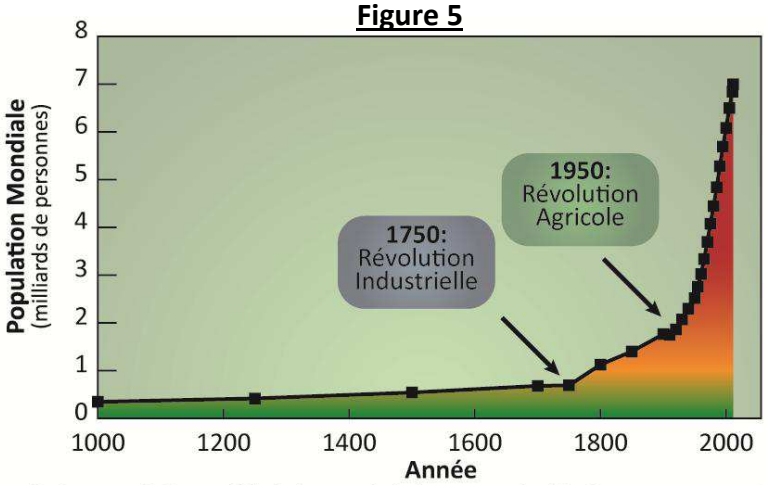
L'ingénieur-conseil Jean-Marc JANCOVICI estime à partir des données fournies par le Groupement International d'Experts sur le Climat que la quantité de dioxyde de carbone a déjà augmenté de plus de 30% depuis le début de l'ère industrielle.

Le résultat de ce dérèglement se chiffre déjà : nous vivons en ce moment la 7ème extinction massive d'espèce, le taux de disparition des espèces est évalué de 10 à 100 fois pire que celui des 6 précédentes extinctions et la raison cette fois est bien liée à une activité « biologique » : le fait des Hommes.

2-3- La société humaine et le confort modernes sont sous perfusion d'énergie fossile épuisable

Le confort est une notion ancienne, mais son sens moderne est devenu très différent de celui du passé. Autrefois il pouvait faire référence à l'espace ou aux ornements dont on pouvait disposer, mais aujourd'hui il fait référence au bien-être et aux économies de corvées. L'Homme d'aujourd'hui est devenu de plus en plus dépendant de son confort et de ses outils technologiques, et cette dépendance est tant physique que philosophique: par le confort de son habitat moderne, l'Homme se protège contre la rudesse de la nature sauvage tout en s'éloignant de plus en plus de sa condition d'animal sensible et fragile.

Figure 5



Population mondiale corrélée à de grands évènements du développement Humain. La révolution industrielle est estimée à 1750 et la révolution « verte » de l'après guerre : 1950. A ces 2 dates la population mondiale a connu des booms de croissance importants.

Le confort moderne est le fruit des révolutions industrielle de 1750 et agricole de 1950. Ces 2 évènements ont permis 2 booms consécutifs de la population mondiale et selon plusieurs prédictions de l'ONU la population mondiale pourrait atteindre les 10 milliards en 2050 et les 15 milliards en 2100. D'autres scénarios étudiés par l'ONU en fonction des décisions politiques prises par les gouvernements prévoient que la population se stabiliserait ou encore connaitrait une diminution avant de se stabiliser. Quoi qu'il en soit, il est vraisemblable que les humains du futur seront toujours très attachés à leur confort, tout différent qu'il puisse être de celui d'aujourd'hui.

Ce confort moderne qui a permis le développement de la société humaine n'est cependant pas un dû: la première condition de son existence, ce qui l'alimente et le rend possible, c'est l'énergie. Il n'y a pas d'électricité sans énergie, il n'y a pas d'électroménager sans usines alimentées en énergie, il n'y a pas de liberté de déplacement sans voitures ni sans l'énergie requise pour la faire avancer. Or cette énergie n'est pourtant pas acquise et depuis 200 ans l'humanité prélève chaque année son énergie sur des réserves limitées et épuisables.

En effet, avant 1750 et depuis la découverte du feu l'humanité trouvait son énergie principalement en brûlant du bois. Bois qui appartient à la biosphère et dont l'utilisation à faible échelle n'a jamais causé de problème environnemental notable, pas plus que permis de boom démographique. Par contre, depuis 1750 l'Homme pioche son énergie dans le charbon, le gaz et le pétrole. Trois ressources qui n'appartiennent plus à la cette biosphère depuis près de 2 milliards d'années. Ce gain de confort que s'est octroyé l'humanité n'est ainsi qu'une situation temporaire extraordinaire et en dehors du temps. De même que la biosphère est directement dépendante de l'énergie solaire, la société humaine est sous la perfusion directe de molécules fossiles formées il y a 2 milliards d'années, et lorsque cette ressource se tarira, la société, si elle n'a pas évolué entretemps, disparaîtra avec (indépendamment des changements climatiques liés à la carbonation de l'atmosphère).

2-4- Un climat qui pourrait s'emballer ?

Dans une récente revue, Barnosky et al. 2012 ont rapporté différents indicateurs qui révèlent que l'activité anthropique a profondément perturbé l'écosystème terrestre dans son ensemble. Ils expliquent que la biosphère, si elle répondait comme les micro-écosystèmes connus pour rapidement disparaître au delà d'un certain seuil de sollicitation, finirait par basculer elle-aussi irréversiblement vers un nouvel état d'équilibre très différent de ce que la Terre connait depuis des lustres. Leur

indicateur le plus alarmant, le taux d'utilisation des sols par l'Homme (transformation d'un écosystème naturel en surface urbaine ou agricole) dépassera le seuil de 50% des terres émergées dès 2025.

Les auteurs s'inquiètent finalement du fait que, passé un certain seuil encore inconnu de sollicitation, le réchauffement climatique forcé par l'Homme et les émissions de GES, pourrait lui aussi connaître un emballement incontrôlable et précipiter l'écosystème vers un nouvel état d'équilibre profondément différent de celui auquel l'Homme et son écosystème sont adaptés. Cette hypothèse d'un emballement irréversible n'avait jusque-là jamais été évoquée dans les scénarios du GIEC qui ont toujours considéré que le réchauffement climatique serait linéaire et réversible si l'on s'en donnait la peine.

Le Développement Durable : ce mode de développement qui n'affecte pas celui des générations futures, devient ainsi de plus en plus une question de survie. L'Homme doit rapidement trouver un moyen de s'affranchir des énergies fossiles et carbonées.

3- L'Energie

3-1- Qu'est-ce que l'énergie ?

En physique, l'énergie se mesure en joules (J) ou en watt par heure ($W.h^{-1}$), c'est une mesure de la capacité d'un système à modifier un état. C'est à dire sa capacité à produire un travail qui va entrainer un mouvement, un rayonnement électromagnétique ou de la chaleur par exemple.

La thermodynamique est l'étude des transformations qui font intervenir l'énergie thermique: le premier principe de la thermodynamique est celui de la conservation de l'énergie. Selon celui-ci, l'énergie ne peut ni se créer ni se détruire mais uniquement se transformer d'une forme vers une autre (principe de Lavoisier) ou être échangée d'un système à un autre (principe de Carnot). Le second principe est un principe de limitation : la conversion d'énergie d'une forme vers une autre n'est en général pas complète et une partie de l'énergie présente au départ est dégradée sous forme d'énergie cinétique désordonnée. Ainsi l'entropie, qui mesure le désordre d'un système, ne peux que croître et tout système, quel qu'il soit, n'existe qu'à la condition que son entropie augmente ou soit stable dans le cas d'une transformation parfaite. Cela a pour conséquence que l'ensemble de l'Univers, le seul système englobant tous les autres systèmes considérables, et ce depuis le big bang, tend vers l'entropie maximale où le désordre sera maximal et où plus aucune énergie ne pourra s'échanger. A l'échelle universelle cette tendance s'entend aisément, mais à l'intérieur de cet univers, quelques phénomènes physiques créent de l'ordre et peuvent, au premier abord, sembler aller à l'encontre du deuxième principe et de la direction générale de l'Univers. Le vivant en est un de ces exemples : Comment les êtres vivants peuvent-ils se construire, croître et maintenir leur organisation, c'est à dire créer et maintenir de l'ordre, sans diminution d'entropie?

3-2- La vie & l'énergie

Même ces phénomènes, à première vue, créateurs d'ordre, se déroulent dans des systèmes d'entropie positive. La création d'ordre dans le vivant se fait effectivement au dépend de la consommation continue d'un flux énergétique qui le traverse et de la dissipation de chaleur dans le milieu extérieur. C'est cette dissipation d'énergie qui constitue l'augmentation entropique, et elle est plus grande que la diminution effectivement apparue grâce à la conversion de cette énergie.

Ainsi, à l'échelle d'un organisme hétérotrophe la création d'ordre se fait en utilisant les molécules de son alimentation comme source énergétique : l'énergie chimique contenue dans les molécules consommées est libérée par les processus biologiques, l'énergie est alors convertie en de nouvelles molécules nécessaires à l'organisme vivant (création d'ordre) et également en chaleur qui se dissipe (création de désordre). De plus, un organisme vivant hétérotrophe, même au repos, dissipe en permanence de l'énergie de par les processus biologiques qui se déroulent en son sein (un être humain

au repos dissipe ainsi environ 70 watts, soit autant qu'une ampoule classique), et il a constamment besoin d'apport énergétique pour se maintenir.

Pour les organismes dits « autotrophes », le principe est le même que pour les organismes hétérotrophes, sauf que l'entrée énergétique dans ces organismes ne provient pas de la consommation d'énergie chimique sous forme de molécules, mais de l'utilisation directe de l'énergie lumineuse du soleil qui est convertie par la photosynthèse en molécules réservoirs d'énergie chimique.

De manière intéressante, la vie hétérotrophe est actuellement dépendante, en grande partie, des molécules crées par la photosynthèse, et donc de l'énergie solaire. L'exception étant constituée des quelques microorganismes extrémophiles qui récupèrent l'énergie chimique des molécules résultant de l'activité géochimique.

Ainsi le système [biosphère] a bien une entropie positive : elle consomme et convertit de l'énergie solaire ou géologique pour se maintenir et elle dissipe de la chaleur en le faisant, générant du désordre. Même la première loi de la thermodynamique est bien respectée par l'ensemble du vivant : toute l'énergie qui transite dans l'ensemble de la chaîne trophique est initialement sourcée dans le soleil (ou dans l'activité géologique). La conséquence en est que tout phénomène qui altère l'apport d'énergie au système se traduit extrêmement rapidement par un effet létal immédiat sur l'écosystème dès lors que les quelques stocks prévisionnels de chaque organisme sont consommés.

La vie ne va ainsi pas à l'encontre totale des lois de la physique : elle y est totalement soumise. Les seules questions à son sujet ne concernent plus sa réalité, mais bien son origine et son but, qui restent énigmatiques au même titre que l'apparition de l'univers et de la matière.

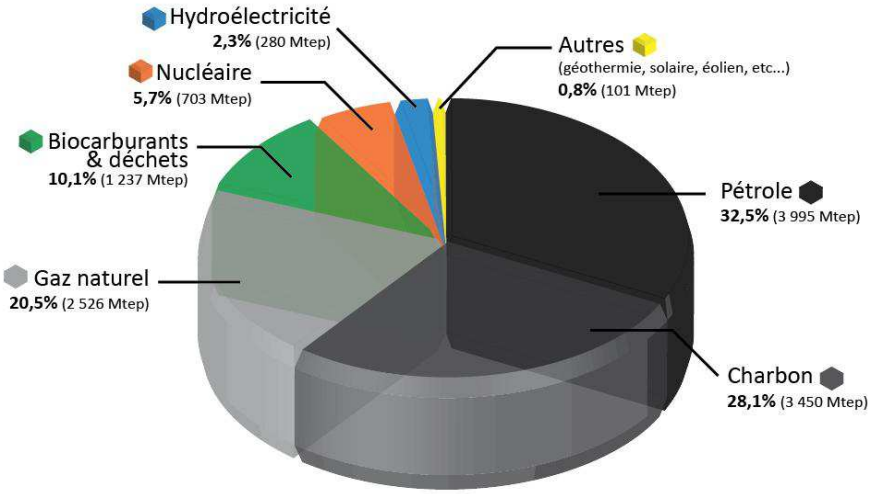
3-3- L'homme et l'énergie

Au même titre que le reste du règne vivant, l'homme est capable de déployer de l'énergie de lui-même, avec son propre corps comme outil et son alimentation comme carburant, afin de transformer son environnement à sa guise et de garantir sa pérennité matérielle.

Au fil de l'Histoire, l'Homme, simple animal, a déployé diverses astuces pour économiser sa propre énergie : le feu, les outils et la domestication sont autant de découvertes qui lui ont permis de mobiliser davantage d'énergie que son seul corps ne le lui permettait. Ces premières « économies d'énergie » que l'on peut qualifier de « civilisatrices » lui firent disposer de davantage de ressources énergétiques et de temps pour ne plus se concentrer que sur l'amélioration de ses conditions de vie. L'énergie économisée par les premières découvertes fut dédiée à l'imagination de nouveaux moyens de récupérer encore d'avantage d'énergie dans la nature afin d'augmenter encore le confort matériel de l'humanité: il a appris à exploiter la force du vent puis la force de l'eau.

L'invention des machines thermiques fut, plus tard, un progrès remarquable de l'exploitation initiale du feu. Ces machines permettent de transformer de l'énergie chimique en énergie thermique puis en énergie mécanique. Cette énergie chimique, l'Homme la trouvait initialement directement dans la biomasse végétale, et plus récemment dans les ressources fossiles (gaz, charbon et pétrole) qui ne sont rien d'autre que de la biomasse végétale modifiée et dégradée par le temps et les forces tectoniques.

Notre monde civilisé actuel n'a pu apparaître et n'existe encore que grâce à l'exploitation ingénieuse des énergies produites par des organismes vivants, actuels ou passés, et dans une moindre mesure par l'eau et l'air (la part du fossile est effectivement ultra majoritaire : plus de 80% de l'énergie produite chaque année voir fig6).



Production d'énergie primaire dans le monde en 2011
Total: 12 292 Mtep. Mtep: Milliard de tonnes-équivalent pétrole.
Source: BP Statistical Review of World Energy, Juin 2011

Figure 6

3-4- Les énergies carbo-émettrices

Cela fait donc bientôt 3 siècles que nous extrayons du sol le carbone moléculaire qui y est enfoui depuis des milliards d'années. Nous brûlons ces molécules carbonées (de gaz naturel, charbon ou pétrole) qui ont été créées par les premiers organismes photosynthétiques, et en faisant cela, nous simplifions ce carbone « moléculaire » (C_n) en carbone « atomique » (C_1) par la réaction suivante :

$$C_nH_{2n} + 1{,}5n\,O_2 \rightarrow nCO_2 + n\,H_2O + énergie$$

Principe : L'énergie thermique issue de la combustion des hydrocarbures sert à faire bouillir de l'eau dont la vapeur entraine des turbines et des dynamos pour produire de l'électricité. C'est le fonctionnement de toutes les centrales thermiques actuelles.

Plus récemment de nouveaux types de centrales thermiques apparaissent et proposent d'exploiter des cycles thermodynamiques différents et ainsi atteindre de meilleurs rendements énergétiques, tout en limitant les émissions de particules autres que le carbone.

Limites : Ces améliorations, bien que nécessaires pour limiter les dégâts environnementaux, ne doivent pas faire perdre de vue la réalité de ce type de centrales : leur fonctionnement se base sur des ressources épuisables, de plus en plus chères, problématiques d'un point de vue géopolitique et dont l'utilisation a un effet très important sur l'environnement.

Sur ce dernier point en effet, on voit que le problème de ce procédé réside dans le relargage atmosphérique d'un CO_2 qui n'a plus sa place dans la biosphère depuis longtemps. Cela cause déjà la 7ème extinction massive d'espèces, et le plus urgent aujourd'hui est de trouver un moyen de fixer ce carbone. Certaines centrales proposent déjà de capter le CO_2 sous-forme solide en sortie des centrales afin de limiter les émissions, mais cela reste une portion anecdotique des centrales, et cela ne règle de toute façon pas le problème de la future pénurie des combustibles.

Comment pourrions-nous diminuer la dépendance aux énergies fossiles et leurs dégâts? En abaissant un standard de vie très énergivore? A l'heure actuelle, les mentalités mondiales indiquent clairement que cela n'est pas à l'ordre du jour. En abaissant la consommation énergétique de nos outils quotidiens ? En exploitant d'autres sources d'énergie? Ces deux pistes sont effectivement les plus privilégiées.

3-5- Les énergies dites « propres » et « renouvelables »

Ces énergies sont décrites comme telles car, dans l'inconscient collectif, elles ne sont pas sensées émettre de CO_2 lors du processus de production d'énergie. Cependant pour nombre d'entre elles la propreté réelle n'est pas aussi grande qu'espérée et certaines limites parfois inattendues se présentent.

- Solaire

Principe : Les panneaux solaires utilisent l'énergie lumineuse du soleil pour en faire de l'électricité. La technologie utilise des matériaux inorganiques très couteux à base de silicium qui, sous l'excitation des photons, créent un courant électrique.

Limites : Ces panneaux solaires pourraient virtuellement être installés dans toutes les places ensoleillées de la planète, comme les déserts, mais c'est alors le problème de l'acheminement de l'électricité vers les lieux où elle est consommée qui peut poser problème. De plus la production de ces panneaux solaires est encore loin d'être verte, de même que l'entretien. Au vu des émissions de CO_2, elle n'est pas neutre non plus, mais elle reste avantageuse par rapport aux différents types de centrales thermiques.

Un autre inconvénient de cette technologie est son intermittence, la production d'électricité par le solaire ne se fait que durant la journée et est plus efficace durant les saisons à ensoleillement maximal comme l'été. Pourtant on le sait, les pics de consommation électriques ont lieu la nuit pour l'éclairage et l'hiver pour le chauffage. L'énergie solaire nécessite donc de déployer d'autres appareils permettant le stockage de cette électricité et, à ce jour, de tels accumulateurs (piles chimiques par exemple) présentent eux aussi de nombreux problèmes environnementaux.

- Eolien

Principe : Cette énergie vise à directement faire tourner des dynamos sous l'action du vent.

Limite : C'est effectivement une des énergies les plus « carboneutres » existantes avec l'hydraulique et le nucléaire, mais tout comme pour le solaire elle pose le problème de l'intermittence de la production d'électricité. Un pays ou une région ne peut pas dépendre pour son énergie des aléas du vent et cette électricité ne peut pas suffire pour se substituer seule aux centrales thermiques. Dans les faits, l'implantation de champs d'éoliennes s'accompagne toujours de centrales à gaz pour lisser l'intermittence de la production d'électricité verte.

- Eolien off-shore

Principe : Même principe que les éoliennes terrestres, mais installées en haute mer.

Limites : Les détracteurs de ce système parlent surtout de la perturbation des écosystèmes marins, ou des voies maritimes. Les vents en pleine mers sont souvent plus puissants que les vents terrestres (moins d'obstacles) mais la salinité de l'air entraîne aussi des coûts d'entretien liés à la rouille du matériel plus importants que pour l'éolien terrestre.

- Hydraulien/marémotrice

Principe : L'hydraulien consiste en la pose « d'éoliennes sous-marines » qui tirent leur énergie des courants sous-marins ou des courants de marées.

Limites : A l'heure actuelle il ne s'agit que de prototypes. A priori, les courants marins sont soumis à moins d'intermittences que les courants aériens, et cette technologie sera certainement intéressante à l'avenir.

•Houlomotrice

Principe : Ces procédés utilisent l'énergie de la houle des vagues pour produire de l'électricité. Il s'agit de dispositifs mécaniques qui convertissent les ondes des vagues en énergie.

Limites : Encore au stade de prototypes, cette technologie est prometteuse mais peut présenter des problèmes pour certaines voies maritimes importantes. Comme l'ensemble des technologies marines et océaniques, elle n'est bien évidemment pas accessible aux pays continentaux qui n'ont pas d'accès à la mer.

•Hydraulique

Principe : La technologie des barrages vise à bloquer le cours d'une rivière et créer une rétention d'eau suffisamment importante pour que lors de l'ouverture des vannes, la pression de l'eau entraine des turbines et produise de l'électricité.

Limites : Le procédé n'émet a priori pas de carbone, à part lors de la construction des installations. Mais la destruction locale de l'environnement qu'il entraine pose un autre type de soucis : des forêts, pièges à carbone, sont noyées dans les lacs artificiels, et la faune et la flore des cours d'eaux sont profondément perturbées en amont et en aval des barrages. De plus, dans certains cas, les forêts noyées émettent de grandes quantités de méthane de putréfaction pendant des décennies.

L'autre principale limite de la technologie est son potentiel de développement, en effet en Europe la quasi-totalité des fleuves est déjà barrée plusieurs fois et la technologie n'est déjà plus extensible. Dans d'autres pays où l'irrigation des cultures est encore plus primordiale que sous les latitudes tempérées, de nombreux fleuves n'arrivent déjà plus à leur embouchure en raison des trop nombreux prélèvements qui y sont faits. A terme, la question d'utiliser l'eau pour la production d'énergie ou bien d'aliments risque également de se poser.

•Nucléaire

Principe : L'énergie nucléaire propose d'utiliser la radioactivité naturelle des atomes les plus lourds présents sur notre planète. C'est l'instabilité de certaines variantes des atomes d'uranium que l'on utilise ici pour produire de l'électricité. Ces atomes instables éclatent naturellement en dégageant des rayonnements et de la chaleur, chaleur alors utilisée pour faire bouillir de l'eau et entrainer des turbines et produire de l'électricité.

Limites : Ce procédé n'émet effectivement pas de carbone lors de l'étape de production d'énergie, il pourrait ainsi sembler une excellente alternative pour réduire les émissions de gaz à effet de serre. Mais cependant il faut garder à l'esprit que le nucléaire ne peut pas non plus être une solution durable de production d'électricité ; même sans parler des risques extrêmes liés à la maitrise même de la technologie (les évènements de Fukushima, Three Miles Island et Tchernobyl), la raison la plus simple de cette non-durabilité est tout simplement la faible quantité de matière fissile existante sur Terre.

Par contre, la question peut se poser de favoriser le nucléaire par rapport aux centrales thermiques comme énergie de transition, avant d'avoir découvert une énergie verte du futur. Le dilemme posé ici en est de savoir choisir entre la peste et le choléra. Le nucléaire présente des risques inacceptables pour certains, dont les dégâts éventuels restent a priori géographiquement contenus (quoi qu'il semble que les courants marins aient apporté de la radioactivité sur l'ensemble de l'océan pacifique), alors que le thermique présente un autre type de risques : un réchauffement climatique global, aux conséquences immédiates et qui s'aggravent chaque année.

•Biomasse/combustion

Principe : La filière Biomasse vise à faire pousser des arbres, puis les transformer en granules pour les brûler dans des centrales thermiques. La conversion de cette biomasse ligno-cellulosique en bioéthanol est également possible et pourrait apporter une alternative au pétrole et aux biocarburants actuels qui sont en compétition avec l'alimentaire. Couplé à une exploitation durable des forêts, ces procédés sont considérés par beaucoup comme carboneutres en émissions de CO_2 et connaissent une croissance exponentielle, notamment au Canada.

Limites : Pourtant, cette filière ne devrait pas être considérée comme carboneutre. Un récent rapport de Greenpeace, dont une partie des allégations ont été confirmées par le CNRS, met en évidence le fait que cette carboneutralité est fictive. Le principe jusqu'alors invoqué par les industriels pour cette carboneutralité est le fait que, théoriquement, tout le carbone qui transite par cette filière est en circuit fermé : le carbone émis lors de la combustion serait ensuite refixé dans les nouvelles plantes qui poussent. En réalité les étapes de transformation et de récolte de la biomasse émettent du carbone, ce qui est rarement pris en considération et n'est pas négligeable. Et de plus les particules issues de la combustion de bois vert sont beaucoup plus néfastes que celles issues de la combustion du carbone fossile. La fixation du carbone par les forêts est aussi un processus qui n'est réellement efficace qu'à partir d'un certain âge des forêts, coupées trop jeunes, le gain en fixation de carbone est trop faible pour créer un cercle vertueux.

Tous les arbres coupés en 2008 dans quatre provinces canadiennes, représentant 47 millions de mètres cubes, ont seulement contribué à hauteur de 3,4 % de la production totale d'énergie primaire (chauffage et électricité) du pays. Et pour fournir ne serait-ce que 15 % de la production électrique canadienne, il faudrait donc brûler l'équivalent de tous les arbres coupés en 2008 au Canada (147 millions de m^3). Quant au biocarburant, plus de 560 000 arbres devraient être coupés quotidiennement pour produire assez d'éthanol pour alimenter l'ensemble des voitures canadiennes.

L'ONG rappelle cependant que cette filière reste préférable aux filières du thermique fossile.

•Géothermie

Principe : Collecter l'énergie thermique du sol afin de l'utiliser directement (chauffage) ou pour la convertir en énergie mécanique/électrique. Des forages typiques pour accéder aux fortes chaleurs sont de l'ordre de 2 500m.

Limites : Cette technologie est a priori déployable partout, mais elle l'est surtout dans les pays à forte activité volcanique pour des raisons de moindre coût et de meilleure rentabilité (forages moins importants), le meilleur exemple de pays exploitant la géothermie est l'Islande qui produit plus de 99% de son électricité à partir des seules technologies hydrauliques et géothermiques. C'est également le seul pays où la production d'hydrogène n'est pas trop coûteuse, et ce grâce à cette même énergie géothermique (la problématique de l'hydrogène sera détaillée dans le prochain chapitre).

•Osmotique

Principe : ce procédé déployable uniquement aux embouchures de fleuves, propose d'exploiter l'énergie osmotique dégagée par le mélange d'eau douce et d'eau salée au travers d'une membrane. L'osmose génère une surpression lorsque l'eau douce dilue l'eau salée en traversant la membrane, l'augmentation de pression est alors utilisable pour actionner une turbine et produire de l'électricité.

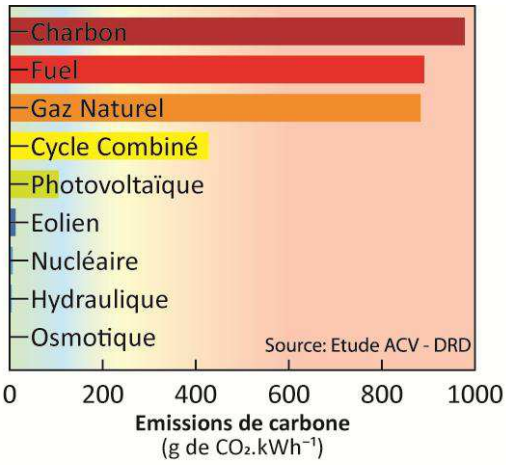
Limites : le potentiel de développement de cette technologie est limité par le nombre d'embouchures de fleuves libres (nombre qui diminue à cause de l'irrigation croissante et de la sécheresse). La compagnie norvégienne Statkraft, qui développe la technologie en partenariat avec l'UE, estime la capacité mondiale à environ la moitié des besoins énergétique de la Chine.

3-6- La nécessité du Développement Durable et des énergies propres

La figure 7 montre les émissions de carbone par kWh de quelques unes des filières précédemment détaillées. Il ressort de ce panel que les technologies énergétiques les plus largement utilisées actuellement (fossile) sont également les plus émettrices de carbone (près de 1 kg de CO_2 par kWh, soit 1 kg de CO_2 pour 10h de fonctionnement d'une ampoule de 100W).

La plupart des énergies renouvelables les plus utilisées à ce jour présentent un meilleur bilan carbone, mais restent néanmoins carbo-émettrices et dans certains cas seulement carboneutres. Résoudre le problème de la diminution de l'accumulation du CO_2 dans l'atmosphère passe donc par une diminution du recours aux énergies très carbonées et par privilégier celles qui émettent peu, voire pas du tout.

Figure 7



Emissions de carbone de différentes filières de production d'électricité

Les énergies fossiles et épuisables émettent beaucoup de gaz à effet de serre (à l'exception du nucléaire) là où les énergies renouvelables sont presque carboneutres.

Dans ce contexte, les énergies photosynthétiques constituent un grand espoir : elles auraient le double avantage d'assurer une énergie à la fois renouvelable et durable en plus d'être pratiquement carboneutres. Elles ne nécessitent pour être produites pratiquement que de l'eau, des terres, du CO_2 et du soleil. De plus, dans le cas des organismes photosynthétiques algaux, les besoins en terres arables sont contournés ou carrément ignorés: les algues peuvent être cultivées en hautes mers, en bassins ouverts ou en photobioréacteurs, n'entrant ainsi pas en compétition avec la production alimentaire.

L'autre intérêt de ces technologies photosynthétiques est leur grand potentiel d'amélioration par les génies agronomique et génétique. La production d'énergie et/ou de biocarburant à partir de plantes et al.gues est en effet améliorable depuis la matière première jusqu'au procédé final, alors que pour toutes les autres formes d'énergies, la matière première n'est pas « améliorable » par l'Homme (l'eau, le vent, le soleil et les ressources fossiles ne peuvent être modifiées).

Quoi qu'il en soit, la courbe d'accumulation du CO_2 dans l'atmosphère ne pourra jamais s'inverser avec les seules technologies que nous connaissons aujourd'hui: comment fixer du CO_2 alors que toutes les énergies sont carbo-émettrices ou carbo-neutres et que les surfaces forestières mondiales ne font que diminuer année après année? (A l'exception notable de la France où la surface forestière augmente de 70 000 ha chaque année depuis 1980. source : ministère de l'agriculture)

En attendant le jour où la science permettra de produire de l'énergie à partir de la biomasse végétale sans qu'on n'ait à la brûler et donc d'avoir des procédés énergétiques « carbo-fixateurs », le contexte de pénurie des énergies fossiles impose de toute manière de s'orienter vers les technologies photosynthétiques renouvelables.

Le développement des bioénergies est ainsi un enjeu actuel fort. Parmi ces bioénergies, on trouve bien entendu les biodiesels et le bioéthanol, mais également le biohydrogène, molécule qui fait l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE 2

L'Hydrogène & les hydrogénases

Ce chapitre traite du dihydrogène : une molécule simple mais rare, porteuse de nombreuses solutions qui demande de relever de nombreux défis technologiques. Seront évoqués : les différentes utilisations actuelles et futures de cette molécule ainsi que ses principaux modes de production : physicochimiques et biologiques. Je mettrai l'accent principalement sur les voies métaboliques et notamment sur les enzymes impliquées dans ces voies de production biologiques. Je terminerai sur l'intérêt de poursuivre des recherches sur la photoproduction d'hydrogène grâce à des organismes photosynthétiques et en particulier à partir des cyanobactéries.

1- Abondance de l'hydrogène

L'hydrogène (H) est l'atome le plus abondant de l'Univers : 71 % en masse et 91 % en nombre d'atomes. Pour cause : c'est la configuration atomique la plus simple existant : un seul proton contrebalancé par un seul électron, et aucun neutron.

Composition du **Système Solaire**				Composition du **Soleil**			Composition de la **Terre**			
Elément	Symbole	%(mole)	%(masse)	Elément	Symbole	% (masse)	Elément	Symbole	% (mole)	% (masse)
Hydrogène	H	91,01%	70,84%	Hydrogène	H	73,46%	Oxygène	O	48,24%	29,66%
Hélium	He	8,87%	27,63%	Hélium	He	24,85%	Magnésium	Mg	16,41%	15,38%
Oxygène	O	0,05%	0,59%	Oxygène	O	0,77%	Silicium	Si	15,01%	16,08%
Carbone	C	0,03%	0,30%	Carbone	C	0,29%	Fer	Fe	14,81%	31,86%
Azote	N	0,01%	0,11%	Fer	Fe	0,16%	Aluminium	Al	1,53%	1,59%
Néon	Ne	0,01%	0,16%	Néon	Ne	0,12%	Calcium	Ca	1,11%	1,71%
Silicium	Si	0,00%	0,07%	Azote	N	0 ,09%	Nickel	Ni	0,80%	1,82%
Magnésium	Mg	0,00%	0,05%	Silicium	Si	0,07%	Hydrogène	H	0,67%	0,03%
Fer	Fe	0,00%	0,12%	Magnésium	Mg	0,05%	Soufre	S	0,52%	0,63%
Soufre	S	0,00%	0,04%	Soufre	S	0,04%	Chrome	Cr	0,23%	0,47%

Table 1

Table 2

Composition de l'**Océan**			Composition de l'**Atmosphère** (sèche)		
Elément	Symbole	% (masse)	Gaz	Symbole	% (volume)
Oxygène	O	85,84%	Diazote	N_2	78,08%
Hydrogène	H	10,82%	Dioxygène	O_2	20,95%
Chlore	Cl	1,94%	Argon	Ar	0,93%
Sodium	Na	1,08%	Dioxyde de Carbone	CO_2	0,04% * (392ppmv)
Magnésium	Mg	0,13%	Néon	Ne	18,18ppmv
Soufre	S	0,09%	Hélium	He	5,24 ppmv
Calcium	Ca	0,04%	Méthane	CH_4	1,75 ppmv
Potassium	K	0,04%	Krypton	Kr	1,14 ppmv
Brome	Br	0,01%	Dihydrogène	H_2	0,55 ppmv
Carbone	C	0,00%	Eau	H_2O	+ 1-4%

Pourtant sur Terre on n'en trouve que 0,67% en nombre (8ème rang) et 0,03% en masse (16ème rang) et quasiment jamais sous sa forme diatomique H_2 : la quasi-totalité de l'hydrogène se présentant sous la forme de composés chimiques hétérogènes comme les hydrocarbures (C_nH_m), l'eau (H_2O) ou d'autres molécules plus complexes encore.

Au final la proportion d'H_2 naturellement présente sur Terre est généralement d'origine biologique (par des archées hydrogénogènes) et est infinitésimale : 0,55 ppmv, soit environ 0,000055% en volume de l'atmosphère terrestre. La raison de ce faible taux est due principalement à son faible poids (2g/mol) qui en fait la molécule la moins retenue par la gravité Terrestre, la laissant s'échapper en permanence de l'atmosphère vers l'espace intersidéral.

2- Quelques caractéristiques du dihydrogène

L'atome d'hydrogène ne pèse que 1 gpar mole (1 mole correspondant à $N_{Avogadro}$=6,02 10^{23}molécules) et la molécule de dihydrogène, la plus simple de toutes les molécules, 2 gpar mole. L'hydrogène existe naturellement sous la forme de 3 isotopes principaux : le *protium* ^1H (99,985% de tout l'hydrogène), le *deuterium* ^2H (0,015%) et le *tritium* ^3H (traces), ce dernier étant le seul des trois isotopes à être radioactif. Le tritium serait fréquemment utilisé pour « améliorer » l'efficacité des bombes à fission nucléaires. D'autres isotopes ont également pu être synthétisés en laboratoire ^4H et ^7H.

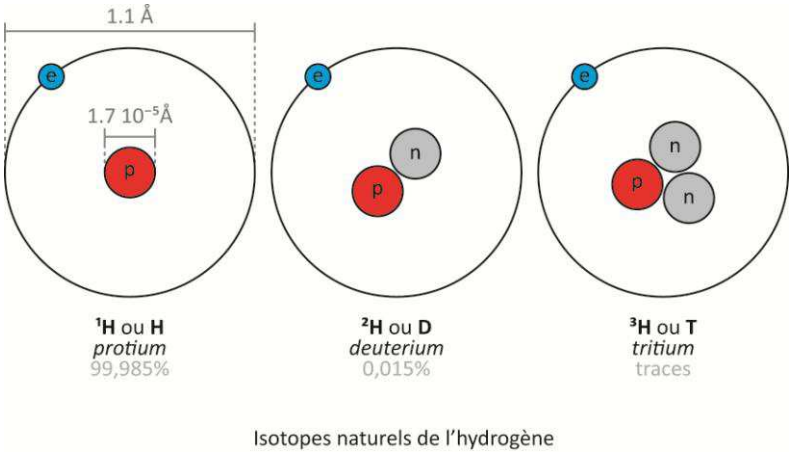


Figure 8

Le dihydrogène a le deuxième plus bas point d'ébullition de toutes les substances (devancé seulement par l'Hélium) : à pression atmosphérique, il est liquide en dessous de 20 Kelvin et solide en dessous de 14 Kelvin.

Le dihydrogène (H_2) forme une mixture explosive avec l'air dès lors qu'il atteint des concentrations comprises entre 4 et 74% et ce mélange est susceptible d'exploser spontanément sous

l'effet de la chaleur, d'une étincelle ou de la lumière du soleil. Sa température d'autoinflammation dans l'air et de 500°C.

Son enthalpie de combustion est relativement élevée (-286kJ/mol) et sa combustion exothermique avec l'oxygène de l'air n'entraîne que la production d'eau :

$$2\,H_{2(g)} + O_{2(g)} \rightarrow 2\,H_2O_{(l)} + 572\ \text{kJ}$$

3- Les diverses utilisations de la molécule de dihydrogène

Elle présente beaucoup d'utilisations potentielles : soit en tant que combustible classique, ou bien en carburant au sein d'une pile à combustible, ou encore comme réactif chimique et comme vecteur énergétique.

3-1- L'hydrogène combustible

3-1-1- Un carburant classique

D'une certaine manière, la molécule de dihydrogène peut être considérée comme un hydrocarbure sauf qu'il ne comporte pas de carbone et peut être directement utilisé dans des moteurs à explosion classique pour générer de l'énergie mécanique (par exemple dans un véhicule ou toute autre machine thermique). Le bilan de la combustion d'un hydrocarbure (déjà évoqué au chapitre 1):

$$C_nH_{2n+2} + \frac{(3n+1)}{2}O_2 \rightarrow\ (n+1)H_2O + nCO_2$$

Devient alors avec n=0 :

$$H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$$

Le dihydrogène est ainsi le seul carburant dont la combustion ne génère que de l'eau et de l'énergie et absolument aucune trace de dioxyde de carbone

D'un point de vue énergétique, le dihydrogène est le carburant qui présente la plus grande énergie massique de tous. C'est une conséquence de son très faible poids moléculaire (2g.mol^{-1}). C'est pour cette raison qu'il a longtemps été le carburant de choix de l'aéronautique et de l'aérospatiale : à poids égal on transporte 2,5 fois plus d'énergie avec de l'hydrogène qu'avec d'autres carburants.

A l'inverse, d'un point de vue volumique, l'hydrogène présente la plus faible densité volumique d'énergie de tous les carburants. Cela est notamment dû au fait que l'énergie est contenue dans la liaison chimique entre les atomes de la molécule. Dans le cas des hydrocarbures, davantage de liaisons chimiques par molécule existent, ainsi, même si l'atome de carbone est beaucoup plus lourd que l'atome d'hydrogène, il peut porter 4 liaisons chimiques là où l'atome d'hydrogène ne peut en créer qu'une. La conséquence directe de cette propriété est que le stockage d'énergie sous forme de dihydrogène liquide est approximativement 4 fois plus demandeuse d'espace que pour un autre carburant liquide comme le diesel, tout en étant environ 2,5 fois plus léger.

énergies massiques (25°C, 1atm)	
Hydrogène	141,86 kJ/g
Méthane	55,53 kJ/g
Propane	50,36 kJ/g
Gazole	47,50 kJ/g
Diesel	44,80 kJ/g
Méthanol	19,96 kJ/g

Densité d'énergie		
	Liquide	Gaz (1atm, 15°C)
Hydrogène	8491 MJ/m3	10050 kJ/m3
Méthane	20920 MJ/m3	32560 kJ/m3
Propane	23489 MJ/m3	86670 kJ/m3
Gazole	31150 MJ/m3	-
Diesel	31435 MJ/m3	-
Méthanol	15800 MJ/m3	-

Table 3

Cette utilisation du dihydrogène comme combustible dans des véhicules ou des machines thermiques présente cependant de sérieux inconvénients, mais qui semblent en passe d'être levés. Le premier, est sa rentabilité décevante en comparaison d'autres combustibles. Le constructeur BMW semble cependant avoir trouvé une piste d'amélioration : au lieu d'utiliser un moteur à essence, un moteur diesel a été modifié, en rajoutant à la compression élevée propre à cette technologie un allumage par étincelle. Le rendement obtenu est ainsi de 42%, soit meilleur qu'un turbo-diesel, et se rapproche également des 50% de rendement de la pile à combustible (prochain paragraphe).

Note : L'inconvénient majeur des véhicules ou des appareillages fonctionnant grâce au dihydrogène réside dans le stockage de la molécule, que ce soit par sa volatilité ou son volume, celui-ci représente un défi technologique majeur, mais ce défi est le même pour toutes les utilisations envisagées du dihydrogène.

3-1-2- La pile à combustible (pile à hydrogène)

La Pile à combustible est une technologie découverte en 1838 par le scientifique allemand Christian Friedrich SCHOMBEIN, il décrivit à cette époque une pile qui générait de l'électricité à partir d'acide sulfurique et d'eau.

La technologie de pile à combustible (*Fuel Cell* en anglais) n'est pas spécifique au dihydrogène, elle peut faire référence à plusieurs combustibles différents comme le méthanol, mais ici je traiterai uniquement le cas de la pile à combustible à hydrogène. Par commodité de langage j'appellerai à partir d'ici « Pile à Combustible » ou « PAC » cette pile à hydrogène.

La Pile à Combustible est une technologie embarquable à condition d'avoir un réservoir de combustible approprié (qui pose les même problèmes que pour l'utilisation de l'H2 comme carburant simple). Elle peut être utilisée sur tout support mais elle a été majoritairement présentée à ce jour au public comme le mode de propulsion des voitures du futur. La pile à combustible devra constituer une alternative future aux actuelles batteries à Lithium-ion dans les voitures électriques de demain.

Le fonctionnement de la pile à combustible est assez simple, elle est constituée de 3 parties : l'anode, l'électrolyte et la cathode. L'ensemble des réactions chimiques se produisant dans une pile à combustible conduisent au bilan :

$$H_2(g) + O_2(g) \rightarrow H_2O + électricité + chaleur$$

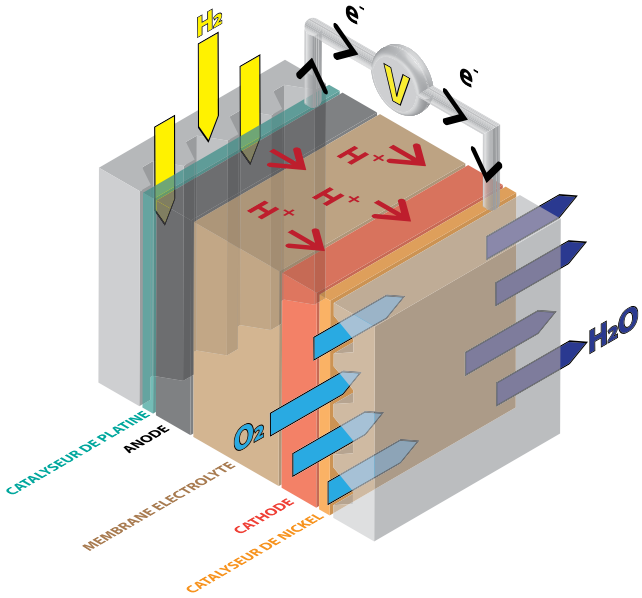


Figure 9 : Schéma de Pile à Combustible

- A l'anode se produit l'oxydation de l'hydrogène, généralement catalysée par une très fine poudre de Platine (Pt) :

$$H_2(g) \rightarrow 2H^+ + 2e^-$$

- A la cathode c'est la réduction de l'oxygène qui se produit, catalysée par du nickel ou d'autres catalyseurs à base de nanomatériaux :

$$O_2(g) + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$$

- Les protons (cations dans les autres PAC) sont attirés par la cathode et traversent l'électrolyte. Cette membrane échangeuse de cations est imperméable aux électrons qui doivent passer par un circuit électrique parallèle avant de rejoindre la cathode. C'est ce courant d'électrons qui créé l'électricité dans les PAC.

A pleine charge, une PAC peut générer jusqu'à 0,7V de tension et un courant assez faible. De meilleurs

courants peuvent être obtenus en montant plusieurs PAC en dérivation, ou de meilleurs voltages si on les monte en série.

Les industriels de l'automobile présentent régulièrement des prototypes de véhicules fonctionnant à l'aide de PAC, la technologie est totalement fonctionnelle mais se heurte à de gros soucis techniques.

On relève ainsi que la PAC nécessite une membrane polymère encore très coûteuse, mais surtout qu'elle nécessite de grande quantités de catalyseurs de Platine, métal précieux et cher, mais surtout très rare : Il faudrait environ 15 fois la production actuelle de platine pour pouvoir constituer un nouveau parc automobile équipé de PAC. L'industrialisation des PAC est ainsi inenvisageable tant que des substituts aux catalyseurs de Platine ne seront pas découverts. Comme explicité précédemment, le stockage du combustible dihydrogène est également un souci important des PAC.

3-2- Le dihydrogène vecteur énergétique

Le principal souci de la plupart des énergies renouvelables réside dans leur caractère transitoire. C'est cet aspect qui est problématique pour leur généralisation car les activités anthropiques ne peuvent dépendre des aléas naturels.

Certains scientifiques imaginent dès lors un lissage de la production énergétique issue de ces énergies renouvelables par l'intermédiaire du vecteur énergétique que constituerai le dihydrogène. A la différence de l'électricité qui est instockable par nature et doit être consommée dans l'instant où elle est produite, le stockage chimique dans une molécule de dihydrogène pourrait être une solution valable étant donné que la récupération de l'énergie stockée dans la molécule se ferait par une combustion propre (c'est à dire sans CO_2) par exemple dans une pile à combustible.

Dans un tel modèle, le dihydrogène ne serait plus considéré comme une ressource énergétique, mais bien comme un vecteur énergétique dont l'utilisation ne génèrerait que de l'eau. La conversion de l'énergie renouvelable (ou non) en H_2 se ferait au moyen d'une des méthodes décrites au prochain paragraphe (certainement l'électrolyse de l'eau).

Cette perspective intéressante d'utilisation du dihydrogène soulève également la question cruciale du stockage de la molécule.

3-3- Le stockage du dihydrogène

Comme explicité plus haut, le stockage du dihydrogène est un défi technologique en lui-même, Les principaux problèmes que l'on peut rapporter sont les phénomènes de corrosion dus à la molécule d'H2 qui tend naturellement à former des liaisons chimiques avec presque tous les autres atomes existant, ainsi que sa très petite taille qui lui permet de se faufiler dans la plupart des mailles cristalline, et donc de presque toujours pouvoir s'échapper d'un réservoir.

Bien que le stockage de l'hydrogène soit un défi pour nombre de filières industrielles, c'est encore dans les industries automobiles et pétrolières que l'on trouve les principales avancées.

À ce jour, trois grandes voies de stockage de l'hydrogène sont envisagées:

- Le stockage comprimé
- Le stockage liquide
- Le stockage moléculaire

3-3-1-1- Le stockage comprimé

C'est la forme la plus commune de stockage du dihydrogène.

Le stockage gazeux sous forme comprimée (actuellement 350 bar) permet d'atteindre une densité massique satisfaisante avec des réservoirs composites. La densité volumique de stockage reste faible: une pression de 700 bars est inévitable pour rendre la technologie compétitive.

La technologie existe et est couramment utilisée. Son inconvénient réside dans l'énergie nécessaire à la compression et dans la faible efficacité en termes d'encombrement en comparaison aux autres méthodes. Cet encombrement est une des difficultés pour l'utilisation du dihydrogène sous forme de gaz comprimé dans les applications automobiles.

Le CEA participe également à l'industrialisation de réservoirs d'hydrogène moins onéreux via le projet européen StorHy. Cette technologie vise à comprimer l'hydrogène sous 700bars dans une coque en fibre de carbone revêtue d'un polymère innovant appelé « liner » qui assure l'étanchéité, le projet ambitionne de faire passer le prix d'un réservoir de 150L de 1000€ à 300€ d'ici à 2015.

3-3-2- Le stockage liquide cryogénique

Le stockage liquide à 20 K (-253 °C) sous 10 bars permet d'atteindre des densités volumique et massique intéressantes mais nécessite des réservoirs à l'isolation thermique poussée afin de minimiser l'évaporation. La technologie existe actuellement et a une meilleure efficacité volumique que pour le gaz comprimé, mais l'encombrement conséquent des enceintes isolantes vient parfois contrebalancer cet avantage.

Le coût énergétique de la liquéfaction de l'hydrogène est encore très élevé puisqu'il représente environ de 25 à 40% de l'énergie que produira l'hydrogène en utilisation, et la déperdition en utilisation réelle est malheureusement très importante (actuellement 1,25 pour mille par heure), pénalisant fortement le stockage au-delà d'une semaine.

Cette technique de stockage est la plus communément utilisée pour les applications spatiales où, malgré le faible délai de mise en œuvre, le remplissage est continu jusqu'au dernier moment. Par ailleurs, BMW a développé pour ses futures voitures des réservoirs d'hydrogène liquide à -253°C capables de conserver l'hydrogène sans trop de pertes grâce à un réservoir constitué de deux coques d'acier séparées par du vide.

3-3-3- Le stockage en hydrures métalliques

Les atomes d'hydrogène peuvent également être stockés dans certains composés métalliques : le dihydrogène est récupéré en chauffant ou en diminuant la pression du matériau. Le stockage sur des substrats sous forme absorbée, notamment sur des hydrures métalliques, présente une densité volumique d'hydrogène très intéressante mais une densité massique faible. Cela peut être avantageux dans certains cas, mais problématique pour les applications spatiales par exemple.

Cette technique est aujourd'hui assez mal maîtrisée. Elle a l'inconvénient de demander un dihydrogène extrêmement pur afin d'éviter de détruire la capacité d'absorption des hydrures. Le chauffage pour récupérer le gaz est également un handicap énergétique. Ce type de stockage, qui continue de faire l'objet de recherches, est au stade du développement industriel et certains projets démonstrateurs sont prévus, comme par exemple avec la start-up McPHy, spin-off du groupe Air liquide, qui développe la technologie utilisant les hydrures de magnésium.

Hydrure	Pourcentage de dihydrogène contenu (en masse)
$LaNi_5H_{6,5}$	1,4 %
$ZnMn_2H_{3,6}$	1,8 %
$TiFeH_2$	1,9 %
Mg_2NiH_4	3,6 %
VH_2	3,8 %
MgH_2	7,6 %

Capacité de stockage de certains hydrures

Table 4

3-4- L'hydrogène réactif chimique

Outre les utilisations liées à l'hydrogène carburant et à son stockage, le dihydrogène est également un réactif précieux et répandu des industries chimiques et agroalimentaires. Ces 2 dernières utilisations sont ici évoquées.

3-4-1- Hydrogénation catalytique pour l'industrie chimique

Cette réaction chimique largement utilisée par les industries chimique et pharmaceutique permet de désaturer des liaisons C=C en liaisons CH-CH. L'hydrogénation a été découverte en 1897 par une chimiste français : Paul SABATIER. Il découvrit que l'addition de traces de nickel (Ni) à un mélange d'hydrocarbures gazeux permettait d'y faciliter l'addition d'hydrogène. Il fut récompensé du prix Nobel de Chimie en 1912.

Cette réaction est assez simple à réaliser une fois passé le seuil énergétique car elle s'entretient par exothermicité. La barrière énergétique initiale, due à la grande stabilité de la molécule d'H_2, se franchit en chauffant à plus de 480°C ou par catalyse. Dans la pratique la réaction se fait sous 3 atm et nécessite, en plus de la source d'hydrogène H_2, un catalyseur à base d'un métal du groupe du Platine (Platine Pt, Palladium Pd, Rhodium Rh ou Ruthénium Ru), ces métaux sont rares et chers mais permettent d'économiser grandement en chauffage de réaction.

Certains catalyseurs, ont été développés pour servir d'alternative plus économique. Ces catalyseurs peuvent cependant être moins efficaces ou plus lents, par exemple le nickel de Raney est moins cher mais s'utilise vers 60atm et 50°C. Le chimiste est souvent confronté à une problématique multiple : il doit sélectionner un catalyseur qui permette le meilleur compromis sur plusieurs conditions, parfois antagonistes :

- un bon rendement d'hydrogénation
- une température de chauffe pas trop élevée pour éviter les dépenses inutiles et surtout pour éviter de dégrader les molécules fragiles
- un minimum de temps de réaction pour éviter de chauffer trop longtemps inutilement
- un coût de catalyseur pas trop élevé
- le catalyseur doit être en conditionnement adéquat
- l'infrastructure doit pouvoir supporter les conditions de l'hydrogénation
- le conditionnement du catalyseur (phase homogène ou hétérogène) doit être en accord avec l'utilisation qui sera faite de la molécule finale.

Le mécanisme de l'hydrogénation catalytique se déroule en plusieurs étapes :

1-2 : adsorption de l'H_2 sur la surface catalytique, activation des orbitales moléculaire de l'H2 à un niveau plus réactif.

3 : approche de la liaison insaturée du dihydrogène activé

4 : interaction entre les orbitales moléculaires des 2 espèces chimiques : création de nouvelles liaisons chimiques

5 : décrochage de la surface catalytique.

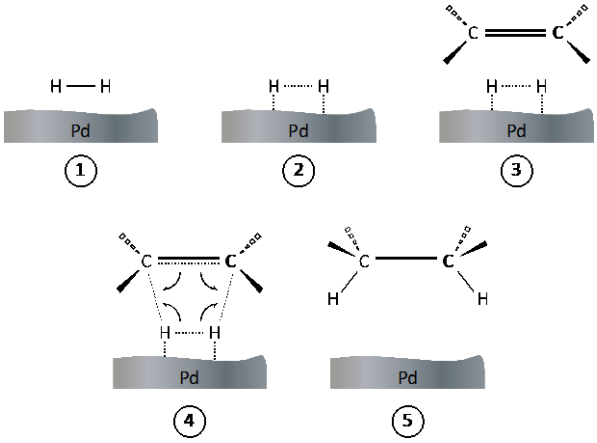


Figure 10

3-4-2- Hydrogénation catalytique pour l'industrie agroalimentaire

L'hydrogénation dans l'industrie agroalimentaire est très largement répandue. Souvent réalisée à l'aide d'un catalyseur de cuivre ou de nickel et en présence d'Hydrogène, elle se fait entre 140 et 225°C.

Elle concerne principalement les matières grasses végétales. Ces huiles contiennent généralement plusieurs liaisons c=c dans leur chaine aliphatique. Une huile qui possède trop d'insaturations *cis* a du mal à s'organiser et à cristalliser, ce qui induit un matériau plutôt fluide.

L'hydrogénation de ces huiles permet de désaturer les chaînes et donc théoriquement de faciliter l'alignement linéaire des molécules et la cristallisation de ces matières grasses à température ambiante. C'est par un tel procédé que la margarine a été inventée.

Les insaturations sont également des sites d'oxydation préférentiels des acides gras, un autre des objectifs de l'hydrogénation est de diminuer leur susceptibilité à être oxydées par l'air et donc d'augmenter leur durée de conservation.

Les nombreuses questions sanitaires liées aux matières végétales hydrogénées concernent essentiellement les matières végétales partiellement hydrogénées. En effet lorsque l'hydrogénation est incomplète ou mal réalisée, les insaturations *cis* peuvent devenir des insaturations *trans* plus stables thermodynamiquement mais très problématiques pour la santé. Les acides gras *trans*, outre leur intérêt industriel certain qui permet de fluidifier les matières grasses en perturbant leur cristallinité et donc d'améliorer l'aspect visuel de certains produits destinés à être consommés rapidement, n'ont aucun intérêt nutritif et métabolique car ils n'existent quasiment pas dans le règne végétal et très peu dans le règne animal

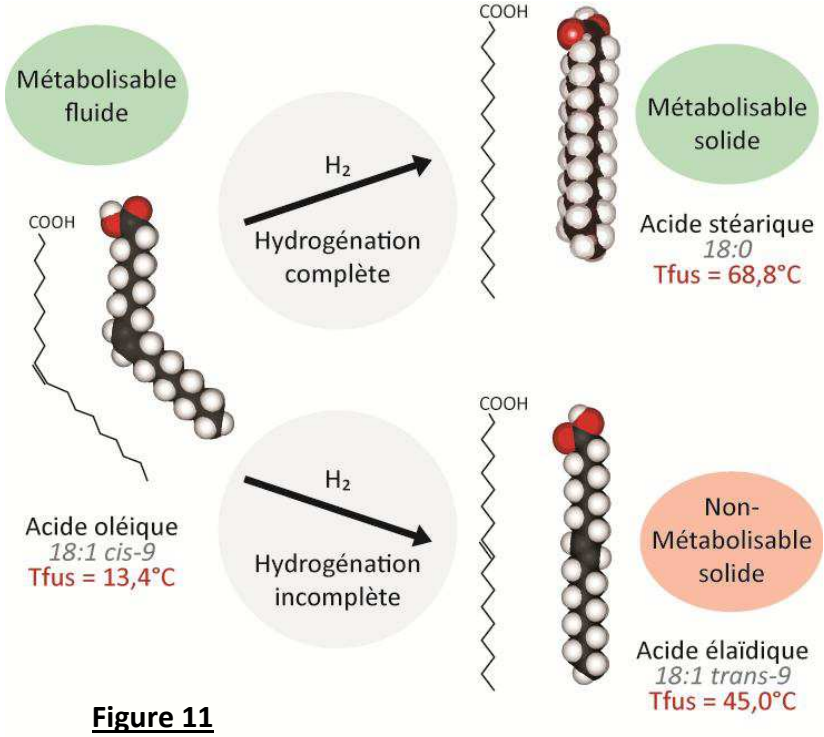


Figure 11
Hydrogénation catalytique en agroalimentaire

Bien qu'ils soient prisés par l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés, ils constituent aussi un facteur de risque non négligeable pour la santé (risques de maladies cardiovasculaires augmenté (Voir Hu Stampfer et Manson 1997)).

3-4-3- L'huile de palme : une huile controversée

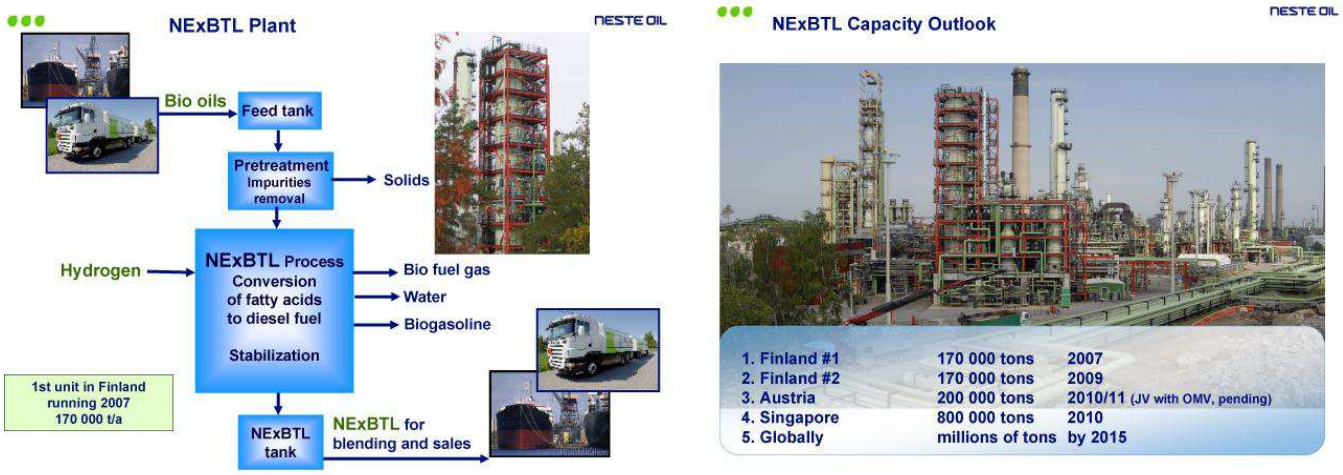
Huile de palme rouge, l'huile la plus consommée au monde

Figure 12

Cette huile est la plus consommée et utilisée actuellement dans le monde (en 2010 : 25% de l'huile consommée est de l'huile de palme, 24% de l'huile de soja, 12% de colza et 7% de tournesol), notamment en raison de son très faible coût de production mais aussi de ses propriétés intrinsèques.

Très riches en acides gras saturés et très pauvre en acides gras *cis* (2 fois moins que dans l'huile d'olive) elle permet aux industriels de se passer de l'étape d'hydrogénation de leur matière végétale et d'éviter les risques sanitaires liés aux acides gras *trans* pour obtenir cet effet recherché de meilleure tenue à température usuelle, bonne conservation et bonne résistance à la cuisson. Elle confère de plus aux aliments transformés une texture similaire à celle apportée par le beurre pour un coût bien inférieur. Raffinée elle n'a, de plus, pas de goût notable. Cependant les risques liés à la trop grande quantité d'acides gras saturés restent présents et posent de gros problèmes sanitaires.

Très récemment (2010) le groupe pétrolier finlandais Neste Oil a développé une industrie d'agrodiesels. Par leur procédé « NExBTL » ils indiquent être capables de produire à partir de l'huile de palme un agrocarburant à la combustion extrêmement propre (émissions de NOx et CO bien plus faibles que les diesels traditionnels). C'est un procédé classique de transestérification des triglycérides de l'huile de palme couplé à une ultime étape d'hydrogénation des acides gras qui permet d'éviter les défauts initiaux de l'huile (trop cristalline) en conservant, voire améliorant, les qualités de l'huile de palme en tant que carburant (bonne conservation, combustion encore plus propre). L'impact environnemental de la production de l'hydrogène qu'ils utilisent (principalement issue de la combustion pétrolière, détaillée plus loin) ni des conséquences environnementales de l'exploitation des palmeraies n'est bien évoquée. L'usine de Neste Oil implantée à Singapour utilise l'huile de palme produite en Malaisie. Elle est à ce jour la plus grande installation d'agrocarburant au monde.



Le procédé NExBTL de Neste Oil - La plus grosse usine d'agrocarburant au monde fonctionne à base d'huile de palme et d'hydrogène.

Figure 13

4- La production d'hydrogène dans le monde: le fruit de la combustion des hydrocarbures fossiles

Nous venons de le voir, le dihydrogène est une ressource de grand intérêt industriel, utilisable à la fois comme carburant, vecteur d'énergie ou réactif chimique dans de nombreux procédés. En particulier, le fait que sa combustion n'émette que de l'eau fait que la molécule est considérée depuis quelques décennies comme le carburant propre du futur. Ainsi, une fois que les verrous technologiques liés à son stockage et son utilisation, dans les PAC par exemple, seront levés, rien ne devrait s'opposer à l'ouverture d'une économie de l'hydrogène.
Pourtant, comme cela a été décrit dans le premier paragraphe, le dihydrogène n'existe pratiquement pas à l'état naturel (moins de 0,55 ppmv de l'atmosphère). D'où vient donc cet hydrogène que nous utilisons déjà régulièrement ?

La production de dihydrogène actuelle est quasi exclusivement le fruit de la combustion des hydrocarbures fossiles, principalement à partir de méthane par des procédés hautement énergivores et générateurs de dioxyde de carbone. Les principales voies de production d'H_2 sont :

- L'H_2-vaporéformage d'hydrocarbures fossiles
- L'H_2-électrolyse de l'eau

4-1- Vaporéformage d'hydrocarbures fossiles

Le reformage à la vapeur consiste à transformer les charges légères d'hydrocarbures en gaz de synthèse ou « Syngaz » (mélange d'H_2, CO, CO_2, CH_4, H_2O et autres impuretés) par réaction avec la vapeur d'eau sur un catalyseur au nickel. Cette transformation à lieu à haute température (840 à 950°C) et à pression modérée (20 à 30 bars). Elle peut être suivie par différentes opérations qui conduisent à la production d'hydrogène. Dans tous les cas, le vaporéformage peut se faire sur du gaz naturel ou sur tout autre matériaux hydrocarboné qui doit généralement être désulfuré afin d'éviter la formation d'H_2S à la place d'H_2. Pour maximiser la production d'H_2, la production de gaz de synthèse et la conversion du CO sont les deux principales réactions à mettre en œuvre.

<u>Réaction 1 :</u>

$$CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3H_2 \qquad \Delta H = 206\ kJ.mol^{-1}$$

<u>Réaction 2 :</u>

$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2 \qquad \Delta H = -41\ kJ.mol^{-1}$$

<u>Bilan des 2 réactions :</u>

$$CH_4 + 2H_2O \rightarrow CO_2 + 4H_2 \qquad \Delta H = 165\ kJ.mol^{-1}$$

La première réaction correspond au vaporéformage proprement dit et est endothermique, tandis que la seconde est légèrement exothermique. Le bilan des deux réactions reste endothermique. La suite du procédé vise à séparer les deux gaz CO_2 et H_2 ainsi qu'à éliminer les traces d'impuretés.

Le syngaz n'est pas exclusivement destiné à la production d'H_2, il est souvent utilisé dans le procédé Fischer-Tropsch afin de produire des diesels ou d'autres carburants de synthèse comme du méthanol.

Source : Colin Baudouin, Institut Français du Pétrole, Clefs CEA – n°50/51 – Hiver 2004-2005

4-2- Electrolyse de l'eau

La décomposition de la molécule d'eau à une électrode s'écrit de la manière suivante :

$$H_2O \rightarrow H_2 + \frac{1}{2}O_2 \qquad \Delta H = 285 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Diverses technologies d'électrolyseurs existent actuellement, permettant d'atteindre des rendements assez important de production d'hydrogène (jusqu'à 85%), qui mettent souvent en présence des eaux très pures additivées d'hydroxyde de potassium (typiquement 25% en masse à 80°C) ou de soude.

La principale limite de cette technologie de production d'hydrogène réside dans son coût énergétique. La combustion de l'hydrogène dégage effectivement autant d'énergie que cela en a coûté à produire ($\Delta H = -285$ kJ.mol^{-1}), mais en raison du rendement même de la production et des dépenses énergétiques annexes liées au conditionnement de l'H_2 et autres, le bilan énergétique de l'opération n'est pas favorable. Ainsi, l'électrolyse de l'eau à visée de production d'hydrogène est actuellement très minoritairement utilisée (moins de 1% de la capacité totale de production d'hydrogène en 2004), et n'est envisagée que dans certains cas où l'énergie est très bon marché (la géothermie en Islande par exemple) et/ou si une pureté élevée d'hydrogène est requise. L'hydrogène produit par électrolyse ne peut donc généralement pas être envisagé comme carburant, sauf dans certains cas où l'électrolyseur est alimenté par des panneaux photovoltaïques ou des éoliennes, mais il ne s'agit encore que d'usines pilotes. L'électrolyse de l'eau est aussi parfois utilisée pour stocker un excédent d'électricité produit par des barrages isolés, comme pour l'usine d'Assouan en Egypte.

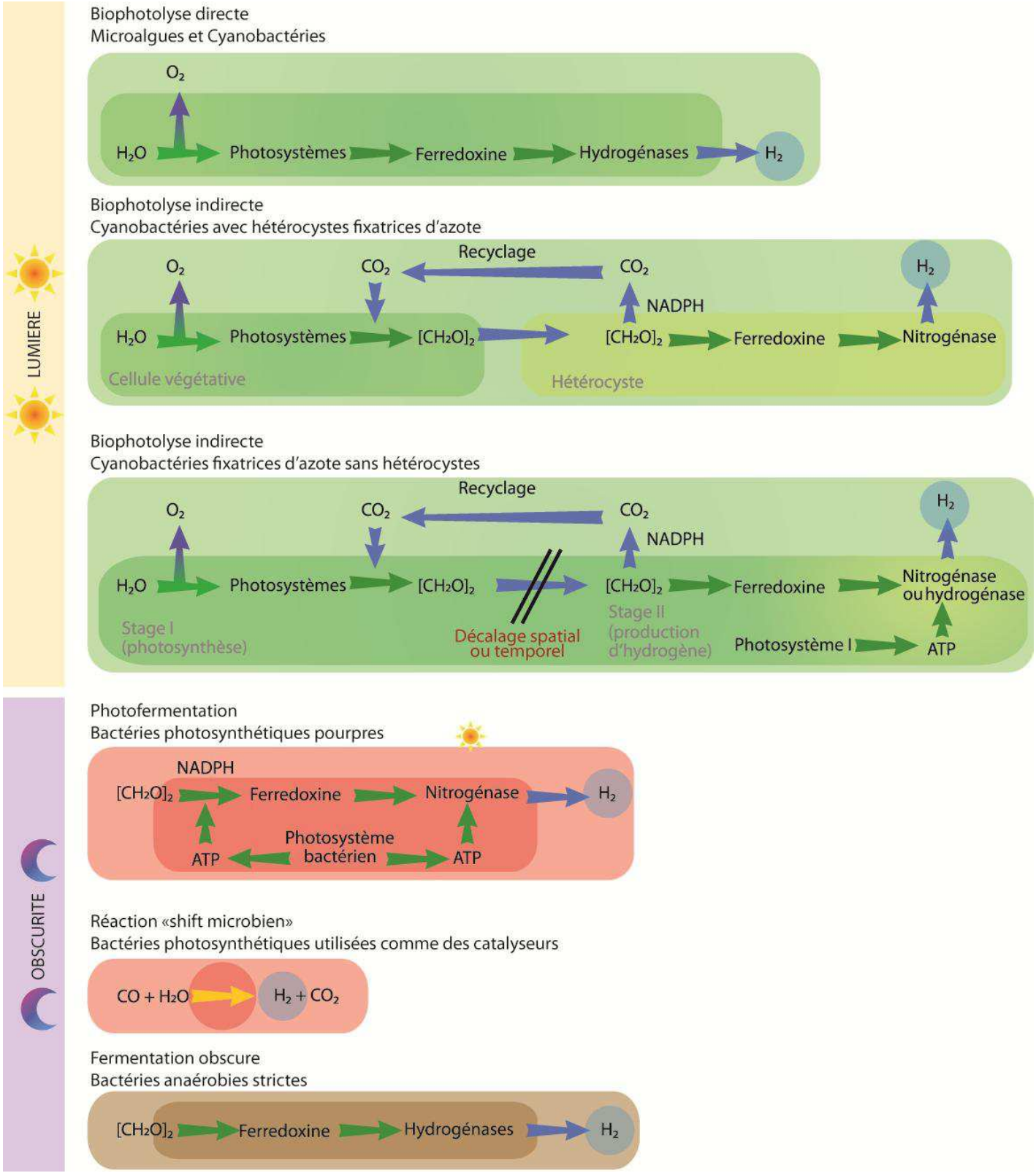
Le CEA développe actuellement certains électrolyseurs à très haute température (900 à 1000°C) couplés à des réacteurs nucléaires et qui permettraient d'atteindre de hauts rendements énergétiques.

Source : AFH$_2$ – Mémento de l'hydrogène – 2004 - Total

4-3- Intérêt d'une source de dihydrogène propre et renouvelable

L'hydrogène est déjà massivement utilisé aujourd'hui (hydrogénation pour la chimie, hydrogénation pour l'agroalimentaire, carburant) et devrait l'être encore davantage dans l'avenir (pile à combustible, hydrogénation des agrocarburants). Pourtant aucune source actuelle d'hydrogène n'est capable de proposer un approvisionnement durable et propre : pratiquement tous nécessitent un recours à une ressource fossile ou épuisable (uranium ou pétrole), et surtout, ils sont très souvent sources d'émissions de gaz à effet de serre problématiques lorsqu'on veut tenir un discours cohérent sur la propreté de l'économie du dihydrogène.

Tous les points précédemment détaillés sont révélateurs de l'intérêt et du besoin qu'il y a à développer une industrie de l'hydrogène propre, durable et respectueuse de l'environnement. Depuis plusieurs années, des espoirs sont placés sur les filières de bioproduction d'hydrogène. Nous allons le voir dans le paragraphe suivant, certaines de ces voies biologiques sont plus attrayantes que d'autres, notamment celles qui exploiteraient les organismes photosynthétiques fixateurs de CO_2. Effectivement, comparée à ce qui existe, une filière de production du dihydrogène qui ne requerrait qu'un bassin d'eau illuminé par le soleil et qui consommerait du CO_2 au lieu d'en émettre est une idée particulièrement séduisante.



Les différentes voies biologiques de production d'hydrogène d'après Benneman 1996
$[CH_2O]_2$ = Hydrates de carbones / sucres
<u>Figure 14</u>

5- La production d'hydrogène à partir du vivant

Pour comprendre l'intérêt appliqué et à long terme de la recherche sur l'hydrogène photosynthétique, objet de mes travaux, il me semble nécessaire de l'évoquer préliminairement en comparaison des autres bioprocédés de génération d'hydrogène déjà connus et dont certains sont déjà exploités industriellement, ainsi qu'avec quelques clés qui permettront de comprendre les attentes et espoirs placés dans ces filières biologiques.

La découverte d'un métabolisme impliquant de l'hydrogène chez les organismes photosynthétiques a été pour la première fois rapportée pour les microalgues vertes en 1939 (Gaffron 1939, Gaffron et Rubbin 1942, Melis 2010), et peu de temps plus tard pour les bactéries photosynthétiques (Gaffron et Kamen 1949). Ces premières descriptions mettaient en avant le fait que ces organismes étaient capables de réduire le CO_2 en utilisant du dihydrogène moléculaire.

Aujourd'hui davantage de métabolismes impliquant l'H_2 comme substrat ou comme produit final ont été décrits.

Concernant la production d'hydrogène en particulier, elle peut être imputable à différents procédés biologiques, tous impliquant des hydrogénases ou d'autres enzymes qui vont catalyser la réduction des protons (Benneman et al. 1996):

Table 5

Type de Bioproduction de dihydrogène	Organismes
Fermentation de matière organique (Fermentation obscure)	Bactéries anaérobies
Fermentation de matière organique	Cyanobactéries fixatrices d'azote
Fixation photo-fermentaire de l'azote	Bactéries pourpres
Biophotolyse de l'eau	Microalgues et cyanobactéries

5-1- Production d'hydrogène par fermentation de matière organique chez les bactéries anaérobies

Les bactéries acidogènes, comme *Clostridium* ou d'autres bactéries anaérobies facultatives, comme les *Enterobacter*, sont les plus efficaces à réaliser la digestion anaérobie de substrats organiques en dégradant un substrat de carbone organique (le plus souvent des sucres) pour générer de l'ATP et croître. En absence d'O_2 capable de capter l'excès d'électrons, ces organismes manquent d'un « siphon » à électrons et sont contraints d'utiliser les protons comme accepteurs terminaux de cet excès de pouvoir réducteur et génèrent ainsi du dihydrogène moléculaire.

Jusqu'à aujourd'hui, cette voie de fermentation était principalement réalisée en employant des sucres ou des déchets organiques comme substrat. Ces substrats ont soit des coûts très élevés (sucres) ou existent en faible quantité relativement aux besoins de la filière (déchets ménagers) ; ce qui est totalement rédhibitoire pour construire une filière de carburant qui doit produire une molécule à très bas coût et en très grande quantité.

Cependant, cette voie constitue aujourd'hui une des pistes envisagées pour valoriser la biomasse forestière en biocarburants. L'hydrogène est l'un des 3 produits pouvant résulter de la dégradation des matériaux ligno-cellulosiques avec l'éthanol et les biodiesels. Les celluloses étant particulièrement complexes à digérer par les bactéries, de nombreux projets visent à prétraiter ces matériaux par des procédés physico-chimiques et/ou biologiques afin de fournir aux bactéries des hexoses ou pentoses par exemple.

A ce jour, beaucoup d'études concernant cette voie de bioproduction d'H_2 ont été menées sur les *Enterobacter* ou sur des mélanges d'*Enterobacter* et de *Clostridium*. Bien que peu d'études concernant des souches pures de *Clostridium* aient été réalisées. Une souche de *Clostridium butyricum* capable de

pousser sur un substrat de xylose et de produire de l'H_2 à de relativement hauts rendements a été isolée (Lo et al. 2007).

Même bien maitrisée industriellement, cette voie ne pourra sans doute jamais produire des quantités d'H_2 dans des proportions nécessaires à une société basée sur ce seul approvisionnement, et ce, en raison des très forts coûts liés aux matières premières qui restent très dissuasifs (biomasses sucrières ou lignocellulosiques). Elle reste particulièrement intéressante cependant, car elle permettra de valoriser les agrodéchets inutilisés dans les filières bois et papiers par exemple, mais ces coûts de prétraitement resteront encore très dissuasifs pour envisager une augmentation d'échelle des procédés.

5-2- La biophotolyse

5-2-1- directe

Les organismes capables d'une telle opération sont ceux capables de réaliser la photosynthèse oxygénique. La photosynthèse leur permet d'extraire 2 électrons et 2 protons d'une molécule d'eau ($H_2O \rightarrow 2H^+ + 2e^- + \frac{1}{2}O_2$) afin de réaliser la réduction de la Ferrédoxine (Fed) et du $NADP^+$ et pouvoir alimenter tout le reste du métabolisme en énergie (un schéma détaillé du mécanisme sera présenté dans le chapitre suivant).

Une partie des électrons générés par le photosystème II, transférés aux ferrédoxines, passe directement aux hydrogénases et produit du dihydrogène selon la réaction théorique suivante :

$$2H^+ + 2\,Fed^- \leftrightarrow 2Fed + H_2$$

Le procédé devrait ainsi pouvoir générer 2 molécules d'H_2 pour 1 seule molécule d'O_2 mais en raison de l'inhibition par l'O_2 de toutes les réactions liées à l'hydrogène (incluant l'expression de gènes, la stabilité des ARN messagers et la catalyse enzymatique), la production effective d'H_2 par biophotolyse directe ne s'opère que sur une courte période de temps, s'étalant sur quelques minutes, après illumination (Melis et al. 2000, Ghirardi et al. 2000).

De plus la photosynthèse ne sert pas qu'à apporter des e^- aux hydrogénases. La fonction principale de la photosynthèse est d'alimenter l'ensemble du métabolisme en énergie afin de permettre la croissance des cellules (voir chapitre suivant). Envisager que 100% des électrons générés par la photosynthèse soient utilisés uniquement pour produire de l'H_2 par l'organisme serait un processus incompatible avec la croissance cellulaire.

Le frein rapidement fait à la production d'H_2 par la génération d'O_2 a pu être diminué expérimentalement en purgeant en continu le milieu avec des gaz inertes (Greenbaum 1982 & 1988) ou en dirigeant la respiration mitochondriale vers une consommation de l'oxygène photosynthétique. Dans de telles conditions, une production d'H_2 a pu être maintenue pendant quelques jours chez des algues vertes.

5-2-2- indirecte

La biophotolyse indirecte s'opère principalement chez les cyanobactéries filamenteuses fixatrices d'azote. Dans des conditions d'autotrophie, ces organismes génèrent par la photosynthèse des électrons qui sont ensuite transférés depuis les cellules végétatives vers les hétérocystes, des cellules hautement spécialisées qui connaissent un micro-environnement hypoxique favorable à la fixation de l'azote. La fixation de l'azote atmosphérique est alors médiée par la nitrogénase qui réalise la réaction suivante et dont un des sous-produits est la molécule d'H_2 :

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

Ce qu'il est intéressant de noter dans le cas de cette voie métabolique, c'est son besoin élevé en énergie : pas moins de 8 électrons de hautes énergie issus de la photosynthèse ainsi que la

consommation de 16 molécules d'ATP sont nécessaires à la fixation d'une molécule de N_2 et la production d'une seule molécule d'H_2. Ce constat fait de cette voie une voie peu propice à l'imagination d'une filière de l'hydrogène, le rendement se retrouvant intrinsèquement limité par les besoins de la nitrogénase (Eroglu et Melis 2012). Néanmoins il a été prouvé qu'une délétion de l'enzyme uptake hydrogénase HupSL, cotranscrite avec la nitrogénase, et dont le rôle est la consommation de l'H_2 synthétisé par la nitrogénase en vue d'une récupération énergétique, permettait une augmentation de la production d'H_2 par les cellules, cette dernière augmentation restant toujours limitée par les besoins énergétiques excessifs de l'enzyme.

Certaines des cyanobactéries productrices d'hydrogène ne sont pas fixatrices d'azote, et dans certaines conditions, elles peuvent produire de l'H_2 par le biais d'une autre enzyme que la nitrogénase : l'hydrogénase bidirectionnelle à [NiFe]. Dans le cas de cette dernière, la production d'H_2 est médiée par la réaction de réduction des protons par les électrons photosynthétiques dans le même compartiment cellulaire que là où se déroule la photosynthèse. Le phénomène de production d'H_2 étant naturellement inhibé par l'O_2 dans ce cas également, la biophotolyse est supposée indirecte car décalée dans le temps et/ou dans l'espace au sein même de la cellule (il n'y a a priori pas d'interaction directe entre ferrédoxine et hydrogénase bidirectionnelle. La production d'H_2 s'inhibe au bout de quelques minutes dès lors que l'O_2 s'accumule suite aux conditions photosynthétiques.

5-3- La production d'hydrogène par fermentation de matière organique chez les bactéries fixatrices d'azote

Ce scénario peut se produire dans un contexte où les cyanobactéries filamenteuses fixatrices d'azote précédemment décrites sont confrontées à un faible taux d'azote. Leurs cellules végétatives peuvent alors consommer des sucres et les transmettent aux hétérocystes qui les dégraderont afin d'en extraire du pouvoir réducteur et finalement produire du H_2 grâce à la nitrogénase (Hall et al. 1995, Melis 2000). La même réaction bilan de la nitrogénase se produit, avec les mêmes inconvénients structurels relatifs aux hauts besoins énergétiques de l'enzyme, mais cette fois combinés aux problèmes liés au nécessaire apport de matières organiques fermentescibles coûteuses.

5-4- Photofermentation

Ce scénario de production d'hydrogène en condition anaérobie se déroule chez les bactéries pourpres non sulfureuses capables, en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie, d'assimiler de petites molécules organiques (succinate, malate etc...) et de les transformer en biomasse avec génération concomitante d'H_2 et de CO. L'H_2 est produit lorsque la nitrogénase fonctionne pour l'assimilation du N_2 lors de carence azotée.

L'utilisation de bactéries pourpres est prometteuse pour la production d'hydrogène en raison de la haute efficacité de conversion des substrats, de leur fonctionnement anaérobique qui n'induit pas d'inhibition des enzymes par l'O_2, de la large fenêtre de capture de la lumière (de 400nm à 950nm) et finalement en raison de leur flexibilité à utiliser divers substrat comme source de carbone, dont de petits acides organiques. La relative facilité à manipuler certaines bactéries pourpres, dont *Rhodobacter sphaeroides*, est également un argument en faveur du développement d'une telle filière (Eroglu et Melis 2010).

Néanmoins, le nombre important d'ATP requis pour réaliser la fixation de l'azote par la nitrogénase dans ces souches est uniquement assuré par l'appareillage photosynthétique de ces phototrophes anoxygéniques (Madigan et al. 2000).

5-5- Potentiel du Biohydrogène photolytique

D'après les travaux de 2007 de Ghirardi et al., 10 millions de tonnes d'H_2 sont produites annuellement aux USA à partir du réformage de gaz naturel (voir section 1-4-2). Cela représente environ 1% de leur budget annuel. D'après ces calculs, il serait possible de remplacer totalement le gasoil consommé aux Etats-Unis par de l'hydrogène photosynthétique avec environ 13000 km^2 (5000 miles carrés) dès lors que quelques verrous technologiques seront levés, comme le taux de conversion de l'énergie lumineuse qui doit être constant ou la sensibilité à l'oxygène.

6- Les enzymes liées au métabolisme du dihydrogène

il existe deux familles principales d'enzymes capables de générer du dihydrogène: les nitrogénases et les hydrogénases. Une classe particulière d'hydrogénase faisant l'objet de cette thèse, je ne détaillerai que sommairement les caractéristiques des nitrogénases et des hydrogénases qui ne concernent pas directement mon travail.

6-1- Les nitrogénases

La production photobiologique d'hydrogène dans les hétérocystes de cyanobactéries filamenteuses ou dans les bactéries pourpres non sulfureuses est catalysée par la nitrogénase (Meyer et al. 1978). Les nitrogénases sont constituées de deux parties :une sous-unité réductase et un complexe dinitrogénase. La première sous-unité contient un centre métallique à Fe-S encodé par le gène *nifH*. Homodimère de 65 kDa, elle est responsable du transfert électronique depuis le donneur externe jusqu'au complexe dinitrogénase.

Le complexe dinitrogénase est une métallo-enzyme à centre Mo-Fe-S codée par les 2 gènes *nifD* et *nifK*. La réaction que catalyse cet hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ de 230 kDa réduit le diazote N_2 en deux molécules d'ammoniac NH_3 (Meyer et al. 1978, Allakhverdiev et al. 2009).

La nitrogénase est également responsable de la réduction simultanée de protons en dihydrogène moléculaire. Il existe 3 types de nitrogénases, classées en fonction de la nature de leur site métallique et dont dépend la stœchiométrie de l'hydrogène généré :

- Mo-nitrogénases (Molybdène): $N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$
- Fe-nitrogénases (Fer) : $N_2 + 21H^+ + 21e^- \rightarrow 2NH_3 + 7{,}5H_2$
- V-nitrogénases (Vanadium) : $N_2 + 12H^+ + 12e^- \rightarrow 2NH_3 + 3H_2$

La fonction première des nitrogénases est la génération de NH_3 à partir de N_2 dans un procédé qui inclut naturellement une cogénération d'H_2. Cependant en l'absence d'un substrat diazote, elles peuvent ne générer que du H_2.Il faut cependant noter que le fonctionnement de la nitrogénase requiert de grande quantité d'ATP, la raison en étant que les étapes de transfert électronique dans l'enzyme sont endergoniques (nécessitent un apport énergétique). La conséquence de ces étapes est une catalyse unidirectionnelle et irréversible qui entraine une génération d'hydrogène « pressurisé », ce qui constitue un atout plutôt souhaitable pour une éventuelle industrie future. A l'inverse, la présence de N_2 dans le milieu (qui constitue 80% de l'atmosphère terrestre) abaisse le rendement de production d'hydrogène, puisque dans ces conditions deux produits sont générés à partir de la même quantité d'électrons (2 NH_3 et 1 H_2). Globalement, ce fonctionnement gourmand en ATP de la nitrogénase abaisse l'efficacité énergétique en comparaison des hydrogénases à [NiFe] ou [FeFe], objets du prochain paragraphe (Eroglu et Melis 2010).

6-2- Les hydrogénases

6-2-1- Généralités

Les hydrogénases sont des métallo-enzymes clés du métabolisme de l'hydrogène car elles ont la propriété de catalyser, de façon plus ou moins réversible, la réaction de dissociation du dihydrogène :

$$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$$

Cette réaction est thermodynamiquement réversible, mais c'est le potentiel redox et les partenaires de l'enzyme qui déterminent le sens effectif de la réaction *in vivo* : En présence d'accepteur d'électrons, l'enzyme agira préférentiellement en tant que consommatrice d'H_2 (*Uptake Hydrogenase*) et en présence de donneur d'électrons (ferrédoxines réduites par exemple) elles agissent comme génératrice d'H_2. La simplicité de cette réaction conduit à la trouver à la base de beaucoup de procédés métaboliques du vivant, il existe ainsi nombre d'hydrogénases ayant des rôles très divers, traduisant l'importance cruciale de la molécule de dihydrogène pour la vie. Elles sont cependant réparties en deux classes principales, les hydrogénases à [NiFe] et les hydrogénases à [FeFe], dont les sites actifs organométalliques comportent des ligands cyanure (CN) et carboxyle (CO), ce qui est une particularité assez unique pour des enzymes, ces ligands étant d'ordinaires des toxiques.

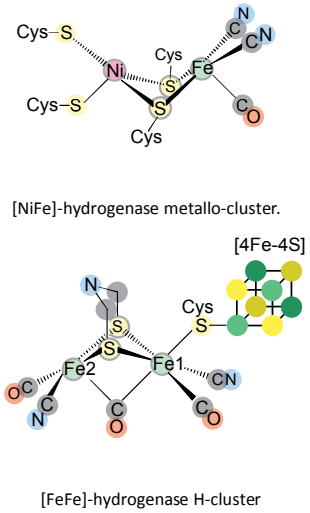


Figure 15

Les premières hydrogénases découvertes sont les hydrogénases à fer (Chen et Mortenson 1974 chez *Clostridium pasteurianum*; Adams, Mortenson et Chen 1981), on les classait alors en fonction des accepteurs ou donneurs d'électrons qu'elles utilisaient préférentiellement (comme le NAD, des cytochromes, la coenzyme F420 ou les ferrédoxines). La première hydrogénase contenant du Nickel a été trouvée dans une bactérie méthanogène : *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Graf et al. 1981, Vignais et Colbeau 2004)

Les hydrogénases contiennent plusieurs clusters Fe-S (2Fe-2S, 3Fe-4S ou 4Fe-4S), qui assurent le transport des électrons entre les différentes sous-unités de l'enzyme, et un centre actif formé de 2 atomes métalliques. Ce dernier pouvant être constitué de 2 atomes de fer (hydrogénases-[FeFe]) ou d'un atome de nickel et un atome de fer (hydrogénases [NiFe]), très rarement certaines hydrogénases-[NiFe] ont été vues comporter un atome de Sélénium additionnel (Hydrogénases [NiFeSe]). Il existe également une troisième catégorie d'hydrogénases dite « sans centres métalliques », elles ne présentent en effet pas de tels centres, mais ont récemment été décrites en interaction avec des cofacteurs comportant, eux, du Fer. Très peu de données décrivent ce 3ème groupe d'enzyme mais il semble qu'elles soient plutôt éloignées phylogénétiquement des 2 premiers groupes.

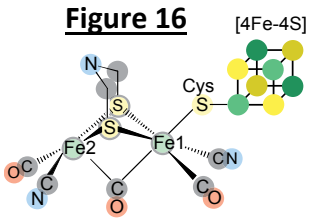
Concernant la phylogénie des 2 premiers groupes d'enzymes : les hydrogénases à [FeFe] et les hydrogénases à [NiFe], elles semblent très clairement distinctes au vu de la non-ressemblance des séquences nucléiques et polypeptidiques, mais des travaux de cristallographie aux rayons X révèlent cependant d'étonnantes similitudes dans la configuration des 2 sites actifs à [FeFe] ou [NiFe], amenant les scientifiques à décrire ces 2 classes d'hydrogénases comme un intéressant cas d'évolution

convergente de la Nature. On peut toutefois remarquer que les sous-unités contenant des centres Fe-S présentent des homologies de séquence notables avec certaines ferrédoxines solubles ou des complexes de la chaîne respiratoire; d'autres homologies existent aussi entre la sous-unité contenant le centre Ni-Fe et ces mêmes éléments de la chaîne respiratoire.

Une donnée intéressante concerne l'origine des hydrogénases à Fe-Fe des algues vertes. En effet les chloroplastes des algues vertes sont sensés provenir de l'endosymbiose de cyanobactéries avec une cellule eucaryote primitive, pourtant le métabolisme de l'hydrogène de ces algues vertes n'a jamais pu être retrouvé chez les cyanobactéries actuelles (unicellulaires ou filamenteuses), aucune hydrogénase ou enzyme associée des microalgues vertes n'a montré de similitude avec celles des cyanobactéries. Par contre, ces mêmes enzymes présentent de grandes analogies avec celles de bactéries anaérobies strictes comme *Clostridium pasteurianum* ou *Desulfovibrio desulfuricans* (Peters et al. 1998, Melis et Happe 2001) suggérant un transfert latéral de gènes entre microalgues vertes et ces dernières, davantage qu'un héritage des cyanobactéries.

D'une manière générale, il semblerait que les hydrogénases-[FeFe] soient plutôt productrices d'H_2 alors que les hydrogénases-[NiFe] soient plus aisément capables d'effectuer le réaction dans les 2 sens (Vignais et Colbeau 2004).

Figure 16



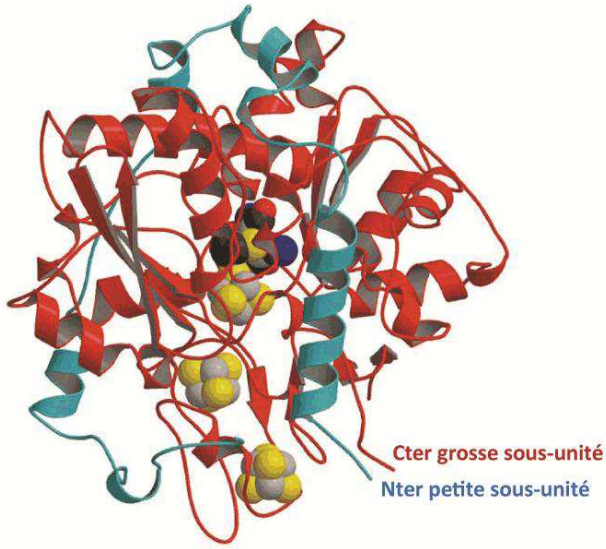
[FeFe]-hydrogenase H-cluster

6-2-2- Les hydrogénases à [FeFe] :

A la différence du groupe des hydrogénases à [NiFe], les hydrogénases à [FeFe] sont le plus souvent monomériques (Vignais et al. 2001), bien que des dimères, trimères ou tétramères existent.

Ces hydrogénases présentent une grande variété de tailles (de 45 kDa à plus de 130 kDa). Elles partagent néanmoins un domaine d'environ 350 acides aminés, appelé cluster H, qui contient le site actif. Parmi les résidus les plus conservés, on trouve les 4 cystéines qui coordonnent le site actif, plusieurs résidus déterminants de la cavité enzymatique et quelques autres probablement impliqués dans les canaux à H_2 et H^+ reliant le site actif enfouit à la surface de l'enzyme. En plus du cluster H, un domaine relativement ubiquitaire qui concerne les centres [Fe-S] peut atteindre 800 résidus aminés. De manière intéressante, les plus petites hydrogénases à [FeFe], de 45 à 48 kDa, ont été trouvées dans des microalgues vertes. Elles sont constituées d'un cluster H de 48 kDa chez *Scenedesmus obliquus*, 53 kDa chez *Megasphaera elsdenii* et 63 kDa chez *Clostridium Pasteurianum*. D'autres hydrogénases à [FeFe] de composition plus complexe comme celle de *Nyctotherus ovalis* qui atteint les 130 kDa (Akhmanova et al. 1998, Vignais et Colbeau 2004).

D'autres domaines dits « accessoires » sont également fréquemment retrouvés dans ces enzymes, il s'agit notamment de domaines N-terminaux très similaires aux ferrédoxines bactériennes à 2[4Fe-4S]. Les hydrogénases [FeFe] trouvées chez les *Clostridia* sont, à quelques exceptions près, parmi les plus grandes



Hydrogénase à [FeFe] de *Desulfovibrio desulfuricans*
La grosse sous-unité est représentée en rouge, la petite en bleu clair. Les atomes de Fe, S, O, N, et C sont représentés en (respectivement) gris, jaune, rouge, bleu et noir.

D'après Nicolet et al 1999

Figure 17

et partagent en plus du cluster H plusieurs domaines accessoires communs, notamment (en N-terminal du cluster H) : un domaine [2Fe-2S] similaire aux ferrédoxines de plantes, un repliement unique [4Fe-4S] et un domaine 2[4Fe-4S]. Les autres domaines similaires à ceux de certaines oxydoréductases ou encore ferrédoxines à [2Fe-2S] « thiorédoxine-like » de bactéries.

Les sous-unités additionnelles de ces hydrogénases à [FeFe] sont fréquemment identiques aux domaines en C-terminal du cluster H d'autres [FeFe]. Chez les *Desulfovibrio*, cette petite sous-unité contient une séquence peptidique qui permet d'exporter l'enzyme vers le périplasme. Une sous-unité additionnelle peut-être également le résultat de fusion de 2 sous-unités d'une autre hydrogénase [FeFe] proche. Généralement ces sous-unités contiennent de nombreuses cystéines et des domaines de clusters métalliques, conférant à l'enzyme un nombre inhabituel de clusters FeS. A titre d'exemple, l'hydrogénase [FeFe] trimérique de *Thermotoga maritima* possèderait 4 centres [2Fe2S] et 6 centres [4Fe4S] en plus du cluster H.

En raison de leur capacité à participer à divers métabolismes cellulaires, les hydrogénases à [FeFe] peuvent interagir avec des donneurs ou accepteurs d'électrons très variés (Vignais et Colbeau 2004). Chez les *Clostridiae*, les [FeFe] sont réduites par des ferrédoxines à 2[4Fe4S] ou par des flavodoxines qui servent de substitut aux ferrédoxines en conditions de carence en Fe mais en moins efficaces. Il semblerait que l'interaction entre les 2 partenaires ne soit cependant pas due à des forces électrostatiques, même si des sites préférentiels d'interactions entre ferrédoxines et hydrogénases ont pu être proposés. Cette interaction *in vivo* a été mise en évidence chez *Chlamydomonas reinhardtii* et chez *C.fusca*. Plusieurs laboratoires ont également testé *in vitro* différents accepteurs et donneurs d'électron avec les hydrogénases à [FeFe], notamment des ferrédoxines de plantes, qui sont des partenaires d'un très large panel d'hydrogénases, indépendamment de leur structure et de leur taille. Chez les *Desulfovibri*o les partenaires des hydrogénases à [FeFe] semblent être des cytochromes c3 qu'elles réduisent, ou parfois le NADP (pour *Desulfovibrio fructosovorans*). Il ressort de cette liste non exhaustive que les hydrogénases à [FeFe] sont assez flexibles et peuvent accepter plusieurs types de partenaires redox malgré l'apparente complexité et variété de leur structures.

Assemblage des hydrogénases à [FeFe]:

En 2001 un opéron de 8 gènes impliqués dans l'assemblage de l'hydrogénase de *Thermotoga maritima* a été identifié. Cependant encore aujourd'hui les mécanismes moléculaires restent encore largement mal connus, et les modèles très débattus. Certains chercheurs proposent que les sites actifs des [FeFe] et des [NiFe] contenant les ligands CO et CN pourraient partager certaines protéines d'assemblage, mais d'autres avancent l'argument inverse : que leur origine évolutive étant si différentes, il est peu probable qu'elles aient développé des machineries d'assemblage similaires, à celles des hydrogénases à [NiFe] (Vignais et al. 2001). Plus tard, trois gènes de maturation ont pu être identifiés, *hydE, hydF* et *hydG* (*hydE* et *hydF* sont éventuellement fusionnés, comme chez *C.reinhardtii*)(Nicolet et Fontecilla 2012).

Les trois gènes *hydE*, *hydF* et *hydG* identifiés récemment (Nicolet et Fontecilla 2012) permettent de décrire seulement une partie du processus d'assemblage. Ils proposent une hypothèse de travail pour l'assemblage et l'insertion du site actif des hydrogénases à [FeFe]:

HydF est au centre de la machinerie de synthèse Hyd et contient un site $[Fe_4S_4]$. La construction de l'élément $[Fe_2S_2]$ (2 atomes de fer reliés par 2 ligands sulfide S^{2-}) est assurée par un procédé inconnu, impliquant très probablement des molécules de cystéine modifiées par une désulfurase, l'élément $[Fe_2S_2]$ étant relié au $[Fe_4S_4]$ de HydF par un résidu histidine. HydE, qui contient un site $[Fe_4S_4]$, agit sur le $[Fe_2S_2]$ de HydF, soit en le remplaçant, soit en l'utilisant comme substrat afin de créer un élément Fe_2DTN (2 atomes de fer reliés par un ligand dithiométhylamine). Cette dernière opération nécessitant l'hydrolyse d'un GTP. HydG est également une protéine à clusters FeS et permet la synthèse et l'ajout de ligands CO et CN au complexe en formation sur HydF. Pour cela HydG doit également hydrolyser du GTP et utilise vraisemblablement la tyrosine comme substrat. La protéine HydF contenant le site à ce stade présente une activité hydrogénase (Czech et al. 2011) et le transfère finalement à HydA qui a déjà son propre cluster $[Fe_4S_4]$. HydF se retrouve régénérée afin qu'un nouveau cycle de synthèse se lance (Nicolet et Fontecilla 2012).

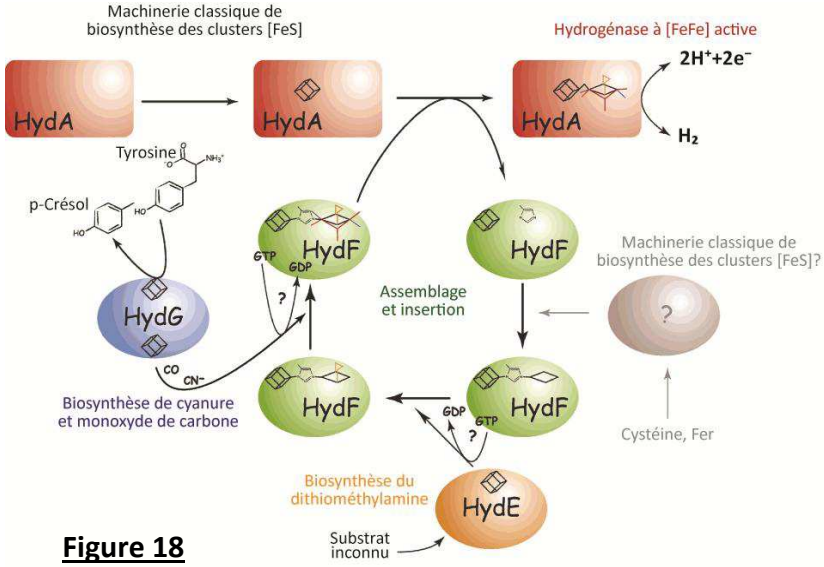


Figure 18

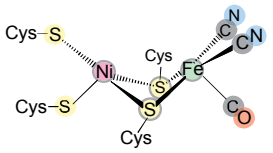
"Modèle de travail" du procédé d'assemblage des hydrogénases à [FeFe]

D'après Nicolet et Fontecilla 2012

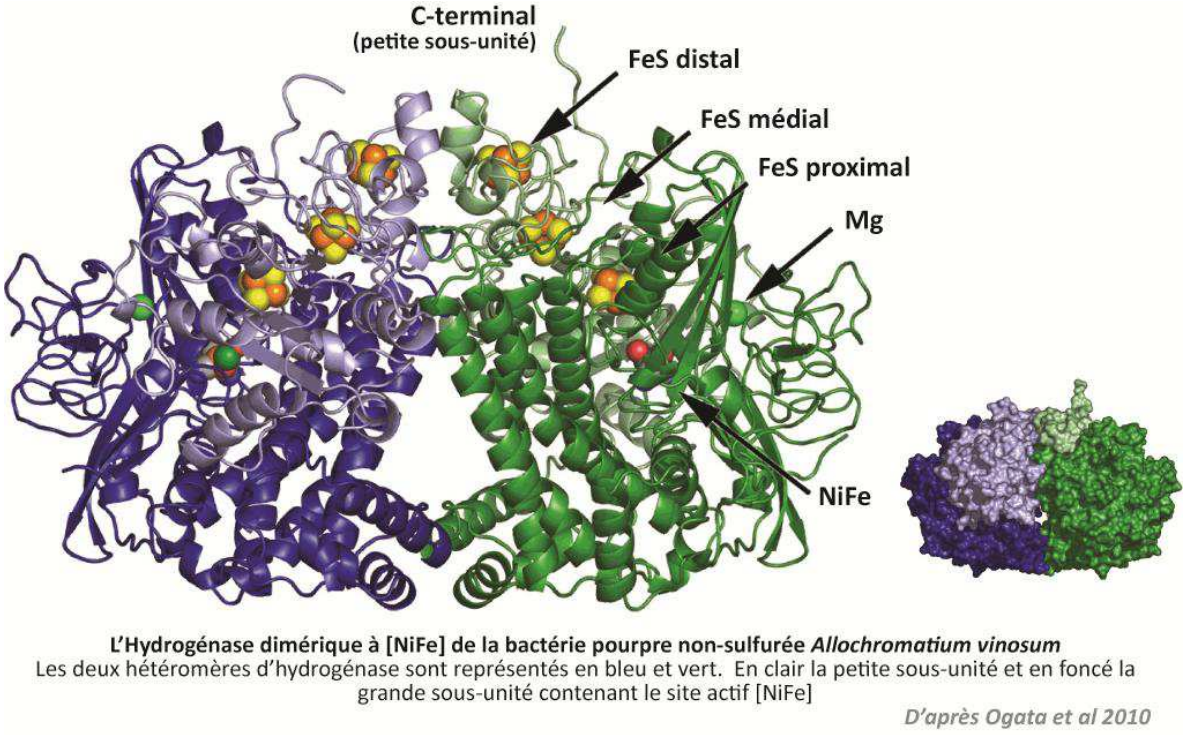
6-2-3- Les hydrogénases à [NiFe]

Les hydrogénases les mieux décrites à ce jour sont les [NiFe] des protéobactéries et des archées, comme décrit par Wu et Mandrand en 1993, puis repris dans les revues de Vignais et al. en 2001 et en 2004. Il existe 4 grands groupes d'hydrogénases à centres Ni-Fe. Elles ont toutes un noyau principal constitué de 2 sous-unités : une d'environ 60 kDa qui contient le site actif bimétallique [NiFe] profondément enfouit et coordonné par 4 cystéines, l'atome de fer étant également apparié à plusieurs ligands : 1 CO et 2 CN, et une plus petite sous-unité, d'environ 30 kDa contenant jusqu'à 3 centres Fe-S. Les clusters Fe-S assurent le transport des électrons depuis (ou jusqu'au) site actif. Un canal hydrophobe dans la grande sous-unité est supposé permettre la circulation des molécules gazeuses depuis la surface jusqu'au site actif.

Figure 19



[NiFe]-hydrogenase metallo-cluster.



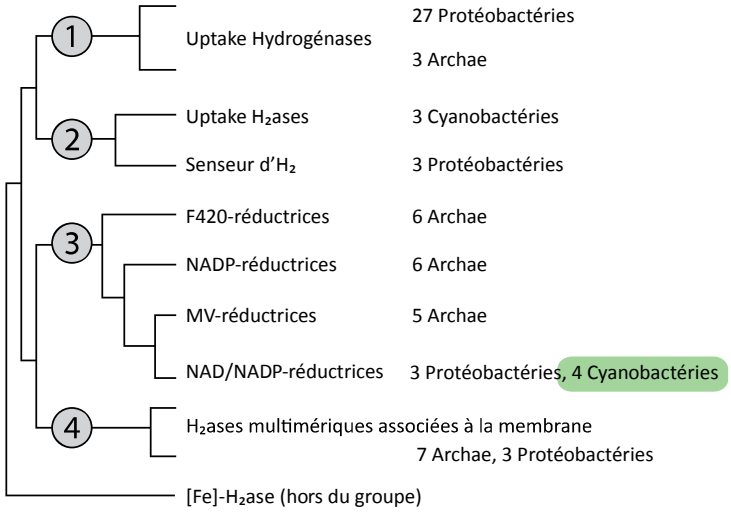
L'Hydrogénase dimérique à [NiFe] de la bactérie pourpre non-sulfurée *Allochromatium vinosum*
Les deux hétéromères d'hydrogénase sont représentés en bleu et vert. En clair la petite sous-unité et en foncé la grande sous-unité contenant le site actif [NiFe]

D'après Ogata et al 2010

Figure 20

6-2-3-1- Les différents groupes

Il est également intéressant de noter que toutes ces enzymes à [NiFe] sont issues d'une phylogénie unique et qu'elles dérivent donc, en quelques sorte, toutes d'une enzyme à [NiFe] ancestrale unique. L'analyse phylogénétique des séquences peptidiques des hydrogénases à [NiFe] permet de les classer en 4 groupes principaux qui corrèlent d'ailleurs particulièrement bien avec la classification fonctionnelle de ces mêmes enzymes. Par ailleurs il semble aussi que l'alignement des séquences des 2 sous-unités principales montre qu'elles ont également toujours évolué conjointement (Vignais et al. 2001). Les 4 groupes d'hydrogénases connus à ce jour sont décrits dans le tableau ci-dessous :



Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des hydrogénases à centre [NiFe] Construit en se basant sur les séquences complètes des 2 sous-unités des hydrogénases qui ont donné séparément le même arbre. En vert: le groupe d'hydrogénases objet de cette thèse.

Figure 21 *d'après Vignais et al 2001*

Table 6

Groupe	Caractéristiques des hydrogénases à [NiFe]	Sous-groupes	
1	Membranaires pour consommation d'H_2 respiratoire « H_2 énergie »	1a	Trimériques, respiration, cytochrome b
		1b	Bactéries sulfatoréductrices, cytochrome c
		1c	Archées, réduction du CO_2 en CH_4
2	Cytoplasmiques & hétérodimériques	2a	Uptake hydrogénase cyanobactérienne : consomme l'H_2 produit par la nitrogénase
		2b	Détection d'H_2
3	Cytoplasmiques, hétéromultimériques et <u>réversibles</u>	3a	Archées méthanogènes, trimériques, réduction du CO_2, cofacteur F420
		3b	Archées hyperthermophiles, tétramériques, réduction du soufre
		3c	Réduction du méthylviologène
		3d	Cyanobactéries, réduction du NAD
4	Membranaires respiratoires	Produisent H_2 en oxydant des groupes carbonyles	

<u>Groupe 1 :</u> Hydrogénases à [NiFe] membranaires pour consommation pendant la respiration *(Membrane-associated respiratory uptake [NiFe]-hydrogenases)* :

Ces enzymes membranaires permettent à leurs hôte de croître avec l'H_2 comme source d'énergie. Elles transfèrent généralement les électrons de l'H_2 à un cytochrome lié à des complexes protéiques de la membrane qui utilisent ce transfert d'électrons pour générer de l'énergie.

Certaines sont des enzymes trimériques, la troisième sous-unité maintenant l'hydrogénase attachée à la membrane et la raccorde au pool de quinones de la chaîne respiratoire, le cytochrome b dont elle est constituée assurant ce transfert. L'oxydation d'H_2 permet au final de réduire un accepteur d'électrons (NO_3^-, SO_4^{2-}, fumarate ou CO_2 en respiration anaérobie ou O_2 en respiration aérobie) (Vignais et al.2004). D'autres, moins bien caractérisées chez les bactéries sulfatoréductrices,

transfèrent les électrons à des cytochromes c, l'oxydation de l'H_2 créant un gradient de protons à travers la membrane qui permet de conserver de l'énergie. Le troisième sous-groupe concerne des hydrogénases d'archées capables de réduire le CO_2 en CH_4 en transférant les électrons de l'H_2 à un cytochrome b qui entraine alors une chaîne de réduction de divers coenzymes menant à la réduction de CO_2 en CH_4 (Vignais et al. 2001, Vignais et al. 2004).

Elles sont toutes caractérisées par la présence d'un peptide signal de 30 à 50 acides aminés en N-terminal de la petite sous-unité comportant le motif conservé (S/T)RRxFxK qui permet d'être reconnu par les protéines qui assurent le transfert et la translocation des protéines vers les membranes. Les hydrogénases 1 et 2 de *E.coli*, celle de *Wolinella succinogenes* et celle de *Ralstonia eutropha* utilisent ce mécanisme de translocation.

Groupe 2 : Hydrogénases à [NiFe] hétérodimériques et cytoplasmiques:

2 sous-groupes principaux le constituent : le **groupe 2a** : celui des hydrogénases cyanobactériennes qui consomment l'H_2 (*uptake hydrogenases*) produit par la nitrogénase et qui ne sont exprimées qu'en conditions de fixation d'azote, et le **groupe 2b** qui concerne les hydrogénases impliquées dans la détection d'hydrogène (H_2-sensing). Les enzymes du groupe 2a agissent de manière similaire à celles du groupe 1 : elles consomment de l'H_2 afin d'en récupérer de l'énergie. Cependant elles en diffèrent par plusieurs délétions dans la séquence de leur plus grande sous-unité, ces délétions sont partagées avec les hydrogénases du groupe 2a. Ces dernières hydrogénases n'apportent aucune énergie à la cellule mais ont plutôt une fonction de régulation et de sensing : Le H_2-sensing qu'elles assurent fonctionne relativement simplement : l'hydrogénase consomme l'H_2 et en transfère les électrons à une histidine kinase qui s'associe alors à un régulateur. Le régulateur active alors l'expression d'hydrogénases [NiFe] respiratoires qui ne deviennent fonctionnelles que suite à sa phosphorylation par la kinase précédemment activée. Elles détectent ainsi la présence d'H_2 dans l'environnement.

Ces 2 sous-groupes d'hydrogénases ne possèdent pas de peptide signal qui assure la translocation des enzymes dans les membranes. Cette localisation cytoplasmique a été confirmée pour les hydrogénases de H_2-sensing (Vignais et al. 2000, Kleihues et al. 2000, Vignais et al. 2001), cependant les hydrogénases cyanobactériennes du groupe 2a sont connues pour être liées aux membranes et certains pensent ainsi qu'elles seraient localisées sur la face cytoplasmique des membranes cytoplasmiques ou thylakoïdales (Vignais et al. 2001).

Groupe 3 : Hydrogénases à [NiFe] réversibles, hétéromultimériques et cytoplasmiques:

Ce groupe est constitué d'hydrogénases qui fonctionnent réversiblement et possédant une sous-unité qui interagit avec un cofacteur soluble comme la coenzyme F420 ou le NAD/NADP. 4 sous-groupes constituent le groupe 3.

Le **groupe 3a** fait référence aux hydrogénases trimériques de bactéries méthanogènes qui ont une sous-unité réduisant la coenzyme F420, cette réduction permettant ensuite la réduction du CO2 en CH4, réaction à la base de la croissance de ces organismes.

Le **groupe 3b** comporte des hydrogénases tétramériques qui appartiennent toutes à des hyperthermophiles (dont la croissance optimale est au-dessus de 80°C, Vignais et al. 2001), 2 sous-unités constituent la partie hydrogénase et les 2 autres servent probablement à l'interaction avec le donneur d'électrons (NADPH pour *Pyrococcus furiosus*). Ces hydrogénases sont généralement impliquées dans la réduction du soufre à la base de la croissance de ces organismes.

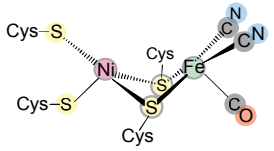
Les hydrogénases formant le **groupe 3c** sont caractérisées actuellement par leur capacité à réduire le méthylviologène.

Le **groupe 3d** concerne les hydrogénases bidirectionnelles qui utilisent le NAD. La première a été identifiée chez *Ralstonia eutropha*. Ces enzymes sont généralement bidirectionnelles, dans le sens qu'elles sont capables d'assurer l'oxydation d'H_2 et la réduction des protons, et sont souvent tétramériques, constituées de 2 parties : une partie hydrogénase contenant le centre [NiFe] codée par les gènes *hoxY* et *hoxH*, et d'un second module assurant la fonction diaphorase : réduction du NAD/NADP codée par *hoxF* et *hoxU* (*hoxEFU* chez *Synechocystis*). Chez les cyanobactéries, la première a été identifiée dans les hétérocystes d'*Anabaena variabilis* ATCC 29413 (Schmitz et al. 1995). Celle de *Synechocystis* sp. PCC 6803 a été décrite pour la première fois par Appel et Schultz en 1996. Concernant leur rôle potentiel, il a été rapporté dans la littérature qu'elle pourrait servir de substitut au complexe I de la respiration absent chez les cyanobactéries. Cependant toutes les cyanobactéries ne possèdent pas de gènes *hox* (voir prochain chapitre) et cette hypothèse a été remise en question. Plus tard un rôle de valve pour éliminer les électrons surnuméraires produits par la photosynthèse a été proposé chez *Synechocystis* (Appel et al. 2000, Cournac et al. 2004). Ces hydrogénases pourraient être liées faiblement aux membranes (directement ou indirectement), soit aux thylakoïdes de *Synechocystis* (Appel et al. 2000) ou *d'Anabaena variabilis* ATCC 29413 (Serebryakova et al. 1996) soit aux membranes cytoplasmiques de *Anacystis nidulans* (Papen et al. 1986), beaucoup d'autres ayant été retrouvées dans les fractions membranaires.

Groupe 4 : Hydrogénases à [NiFe] respiratoires associées aux membranes et génératrices d'H_2:

Les hydrogénases de ce groupe sont généralement liées aux membranes et possèdent une sous-unité caractéristique de très petite taille. Leur fonction serait d'associer l'oxydation d'un groupe carbonyle (provenant de formate, acétate ou CO) à la réduction des protons d'H_2 ; l'opération entrainant une récupération d'énergie déclenchée par une force proton motrice à travers la membrane. Elles possèdent une forte homologie avec les sous-unités transmembranaires impliquées dans le pompage de proton du complexe I de la Respiration. Ces enzymes sont parfois appelées « Hydrogénases convertisseuses d'énergie » avec l'acronyme *Ech* (« Energy-converting hydrogenases ») comme chez *Methanosarcima mazei* où elles interagissent avec des ferrédoxines (Welte et al. 2009).

Figure 22



[NiFe]-hydrogenase metallo-cluster.

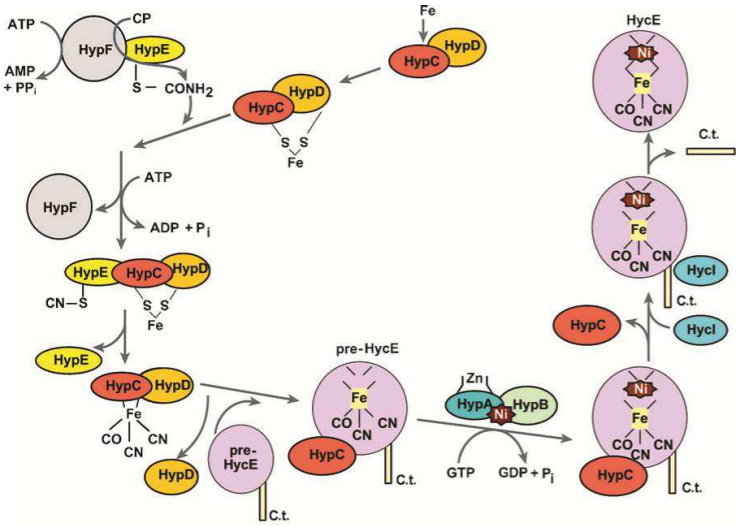
6-2-3-2- Assemblage des hydrogénases à [NiFe]

La grande variété de fonctions et de localisation subcellulaire des hydrogénases à [NiFe] n'a pas entrainé une diversité tout aussi grande des machineries d'assemblage et de formation du site actif de ces enzymes. Ces derniers partenaires ont pu être identifiés en raison de la fréquente organisation en cluster des gènes d'assemblage et de maturation.

Pour découvrir cette machinerie d'assemblage du site actif des hydrogénases [NiFe] chez *E.coli*, les chercheurs ont criblé par mutagénèse aléatoire du chromosome jusqu'à trouver des régions affectant l'activité hydrogénase. Ils découvrirent ainsi un cluster de 5 gènes responsables de cet assemblage : *hypABCDE* (pour « genes affecting hydrogenases pleiotropically ») ainsi qu'un autre gène localisé ailleurs : *hypF.* La nomenclature concernant ces gènes d'assemblage a été conservée pour la plupart des organismes présentant des homologies (à l'exception de *Azotobacter chroococcum* : *hupABYCDE*). Un autre acteur capital de la maturation est une protéase qui clive la grande sous-unité de l'hydrogénase. Elle est codée par *hycI* chez *E.coli*, et *hoxW* chez *Synechocystis* sp. PCC6803 et *Synechococcus* sp.PCC7942.

Une description rapide du processus admis pour l'assemblage du site [NiFe] de l'hydrogénase chez *E.coli* est décrit ci-après:

Figure 23



Réseau de maturation des hydrogénases à [NiFe]
CP est carbamoyl phosphate, C.t. est le Cterminal du précurseur de la grande sous-unité HycE (équivalent HoxH).

D'après Ghiradi et al 2007

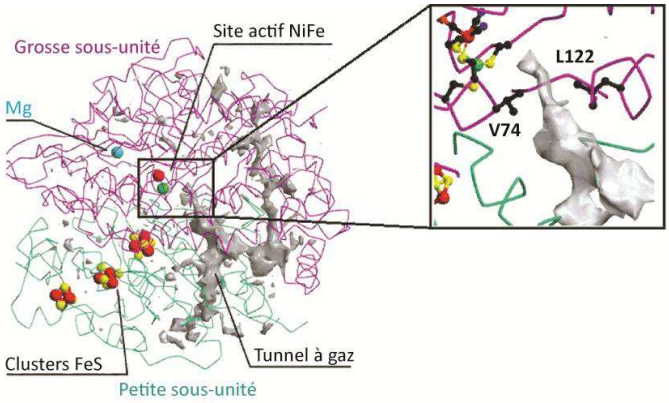
Le dimère HypC/HypD accepte le ligand Fe, simultanément, HypF, à partir d'une molécule de carbamoyl phosphate et de l'hydrolyse d'un ATP, catalyse la formation d'un ligand thyocyanate sur la protéine HypE en interagissant avec elle. Deux protéines HypE donnent ensuite leurs ligands CN au dimère Fe-HypC/HypD pour finalement former une structure $(CO)(CN)_2$Fe-HypC/HypD. Le centre métallique partiellement assemblé est alors transféré aux cystéines de la sous-unité catalytique HycE (HoxH chez *Synechocystis*) qui est dans une conformation « ouverte » permettant l'insertion du site métallique précurseur. L'insertion du nickel au site actif, est ensuite médiée par le complexe HypB/HypA. Ceci implique une étape d'hydrolyse de GTP par HypB (à noter que HypA fonctionne grâce à du Zinc). Dès que les 2 métaux ont été coordonnés à la grosse sous-unité de l'hydrogénase, l'extrémité C-terminale du polypeptide devient accessible à la protéase HycI (HoxW chez *Synechocystis*) qui peut alors la cliver afin que la sous-unité HycE (HoxH) atteigne sa forme finale, mature et active (Ghirardi et al. 2007).

Le clivage de la grosse sous-unité de l'hydrogénase ne se produit qu'après l'assemblage correct du centre [NiFe] par les gènes *hyp*, assemblage comprenant aussi l'appariement du Fe avec les ligands CN et CO (Maier et al. 1996). La délétion du gène *hypF* chez *E.coli* entraine une absence de clivage de son hydrogénase (Paschos et al. 2002).

6-2-3-3- Résistance à l'oxygène des hydrogénases à [NiFe]

L'utilisation d'organismes photosynthétiques contenant des hydrogénases (comme des cyanobactéries ou des microalgues vertes) pourrait permettre de convertir l'énergie solaire en hydrogène en utilisant l'eau comme donneur d'électrons. Cependant, la plupart des hydrogénases est inactivée par le dioxygène, ce qui restreint drastiquement leur utilisation durant la photosynthèse. L'amélioration de la tolérance à l'oxygène de ces enzymes est déterminante au développement de tels procédés biotechnologiques (Liebgott et al. 2010).

Figure 24



Structure de l'hydrogénase à [NiFe] de *D.fructosovorans*
Le canal à gaz est représenté en gris. La position de la valine 74, qui, mutée, améliore la résistance à l'oxygène, est indiquée dans l'encadré.

D'après Liebgott et al 2010

Parmi les trois groupes connus d'hydrogénases ([NiFe], [FeFe], [Fe]), seules les hydrogénases à [NiFe] ne sont pas inactivées par l'oxygène de manière irréversible, mais sont susceptibles de récupérer la totalité de leur activité après réduction. Parmi celles-ci, certaines sont capables de catalyser la consommation ou la production d'H_2 même en présence d'oxygène, elles sont de fait particulièrement étudiées afin de comprendre les mécanismes de tolérance à l'oxygène.

Bien qu'encore à éclaircir, il semble que l'inactivation du site NiFe soit causée par sa réaction avec l'O_2 qui conduit à deux espèces oxydées « NiA » et « NiB », présentant un ligand oxygéné entre le

Ni et le Fe et donc incapables d'assurer la fonction hydrogénase. Par retour en anaérobie, les états NiA et NiB peuvent être réduits afin de retourner à une enzyme fonctionnelle, mais NiB de manière beaucoup plus rapide que NiA. Il semblerait que les hydrogénases qualifiées de tolérantes à l'O_2 soit en fait de celles dont l'oxydation produit le moins d'espèces NiA (Liebgott et al. 2012).

Très récemment, une série de mutations ciblées sur la valine 74 de l'hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans* a permis d'identifier une mutation particulière (valine en histidine) rendant cette enzyme 1000 fois plus rapide à se réactiver en anaérobie. Les raisons de cette réactivation très rapide, comparable à celle de l'hydrogénase tolérante à l'oxygène d'*Aquifex aeolicus*, seraient que la mutation modifie légèrement le canal des gaz, perturbant ainsi l'action de l'O_2 sur le site [NiFe] et diminuant grandement la portion d'espèce NiA créée (Abou Hamdan et al. 2012).

Parallèlement, il vient d'être déterminé que les enzymes tolérantes à l'O_2 possédaient un cluster [Fe_4S_3] jusqu'alors inconnu, à proximité du site [NiFe] et qui permettrait de maintenir le site actif réduit et d'empêcher la formation de l'espèce NiA en créant un cycle de réduction local favorable(Fritsch et al. 2011).

Les travaux sur la résistance à l'O_2 des hydrogénases sont donc à poursuivre et bien que plusieurs résultats intéressants aient déjà pu être obtenus par diverses équipes, ils ne font pas l'objet de ma thèse.

CHAPITRE 3

Les Cyanobactéries, *Synechocystis* sp. PCC6803, La Photosynthèse et l'hydrogénase bidirectionnelle

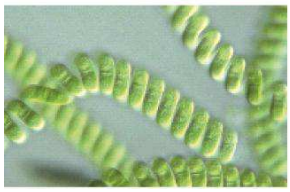
*Ce **troisième chapitre** resserre le cadre du sujet. Y sont traitées plusieurs caractéristiques des cyanobactéries en général, de Synechocystis sp. PCC6803 en particulier, ainsi que des principaux acteurs de la photosynthèse oxygénique. Ensuite, seront évoquées les connaissances actuelles concernant l'hydrogénase bidirectionnelle, chez les cyanobactéries et Synechocystis, le tout en traitant de son rôle probable chez ces organismes, de ses caractéristiques intrinsèques, de sa maturation et de quelques bref éléments de sa régulation transcriptionnelle.*

1- Les Cyanobactéries

1-1- Que sont-elles ?

Figure 25

Spirulina platensis



Les cyanobactéries, anciennement appelées « algues bleues », sont des microorganismes procaryotes photosynthétiques, constituent un des groupes les plus varié et diverse des bactéries. Une multitudes de morphologies et de physiologies différentes en sont notamment caractéristiques et elles sont en grande partie responsables de l'orientation qu'a suivi la Vie terrestre depuis 3 milliards d'années. Il est généralement admis qu'elles sont à l'origine de l'atmosphère oxygénique et qu'elles jouent encore à l'heure actuelle un rôle important dans le cycle géochimique de la planète.

Photobioréacteurs industriels

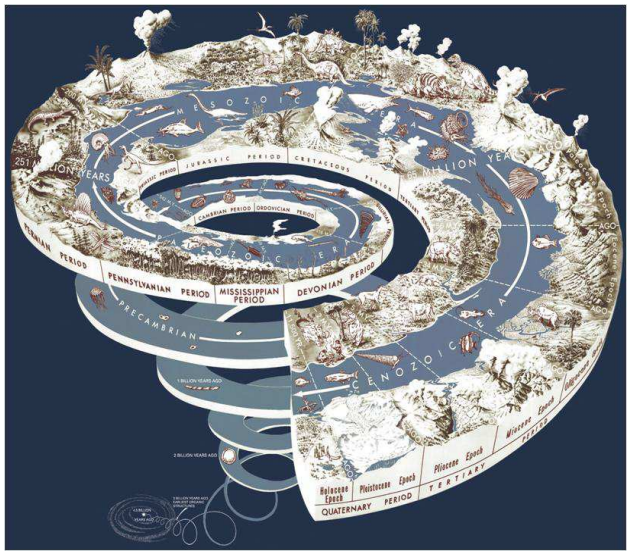
Figure 26

En plus de leur rôle capital dans les écosystèmes actuel et passé, elles présentent aujourd'hui un très fort intérêt biotechnologique pour l'Homme et son avenir, notamment en ce qui concerne la production de molécules d'intérêt par voie renouvelable, et en particulier pour des biocarburants, des molécules à haute valeur ajoutée ou des compliments alimentaires.

Chacun de ces points sera détaillé plus en profondeur dans les paragraphes à suivre.

1-2- Apparition et impact géologique des cyanobactéries

Figure 27



La formation de l'Univers remonterait à plus de 13,7 milliards d'années (13,7 Ga), la formation de la Terre daterait, elle, de peu après la formation du système solaire, c'est à dire environ 4,6 Ga, par accrétion des poussières interstellaires puis des planétoïdes.

La Terre des débuts n'était pas propice à la vie, trop chaude, trop magmatique. Peu à peu elle s'est refroidie et l'eau contenue dans l'atmosphère a pu commencer à se condenser et à précipiter, entrainant la formation des océans vers -4,2 Ga. C'est l'existence de cette eau liquide qui permit l'apparition de la Vie sur notre planète, vers -3,8 à -3,5 Ga ; probablement à proximité de sources chaudes où de petites molécules organiques purent commencer à s'assembler et s'organiser en macrostructures auto-réplicatives qui sont plus tard devenues le « vivant ».

Les cyanobactéries seraient apparues approximativement il y a entre 3 et 3,5 milliards d'années (Schopf et al. 2011), elles inventèrent la photosynthèse, une révolution biologique constituée du seul procédé chimique terrestre capable d'utiliser de l'énergie « extraplanétaire » pour fabriquer de nouvelles molécules : l'énergie du Soleil.

Schématiquement, les photons solaires excitent les pigments du photosystème, l'énergie alors captée est utilisée pour cliver la molécule d'eau en dioxygène, protons et électrons :

$$H_2O \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

Les électrons ainsi générés sont ensuite utilisés par les différents métabolismes de la cellule pour alimenter tous ses métabolismes vitaux en pouvoir réducteur et participer à la fabrication de toutes les molécules lui permettant de survivre, croître et se multiplier. Parmi ces divers métabolismes, on peut notamment relever le cycle de Calvin-Benson (du nom de Melvin Calvin qui reçut en 1961 le prix Nobel de Chimie pour sa découverte de l'assimilation du carbone par les plantes). Ce cycle permet aux organismes photosynthétiques de fixer le CO_2 atmosphérique et de le transformer en macromolécules saccharidiques. Le bilan total de la réaction est :

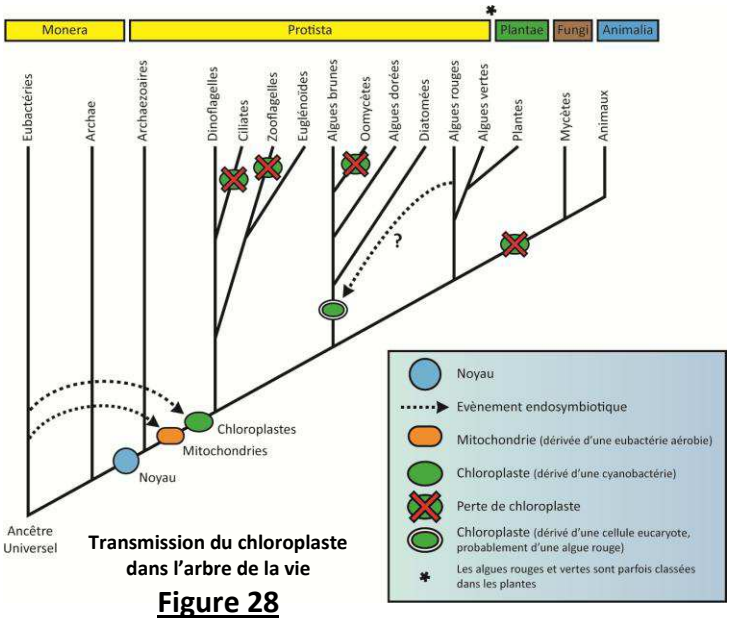
$$6\,CO_2 + 24\,NADPH + 18\,ATP \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O + 24\,NADP^+ + 18\,ADP + 18\,Pi$$

Cette réaction qui créée des liaisons C-C est possible grâce à l'énergie apportée par les molécules de NADPH et d'ATP qui sont le résultat direct de la photosynthèse. C'est, de plus, par ce procédé que les cyanobactéries auraient consommé une partie du CO_2 de l'atmosphère de l'époque (une autre grande partie ayant précipité dans les océans en raison des pluies). Le CO constituait probablement plus de 5% de l'atmosphère et entretenait un effet de serre permanent. Ces organismes eurent ainsi un impact colossal à l'échelle globale, avec entre autres effets capitaux:

- Une diminution du taux de CO_2 atmosphérique, entrainant une nouvelle diminution de la température terrestre moyenne, et des effets directement liés à ces changements sur la Biosphère qui dû s'y adapter.

- L'apparition d'une atmosphère oxygénique très oxydante (20% d'O_2) à laquelle les organismes existant alors durent également apprendre à s'adapter. Cette nouvelle atmosphère déclencha l'apparition de la vie aérobique, qui base son existence sur la consommation de la molécule de dioxygène par le procédé de respiration (Schopf et al. 2011) et se trouve ainsi sous la dépendance directe de la vie photosynthétique.

- La transmission verticale et horizontale de la « technologie » photosynthétique à d'autres organismes (voir Fig.27). Cet héritage, qui se poursuit encore aujourd'hui, a mené à l'apparition du règne végétal tel que nous le connaissons. Il est ainsi admis que le chloroplaste réalisant la photosynthèse dans les plantes est le résultat de l'endosymbiose d'une cyanobactérie avec une autre cellule eucaryote (Bhattacharya et al. 2007). Tous les organismes photosynthétiques actuels sont ainsi les héritiers de près ou de loin des photosystèmes inventés par les cyanobactéries.



Transmission du chloroplaste dans l'arbre de la vie

Figure 28

- Une augmentation massive de la biomasse planétaire. Les molécules créées par les cyanobactéries et leurs héritières, et qu'elles ont pu créer grâce à l'énergie solaire, se sont retrouvées dans la biomasse de tous les organismes situés plus haut dans la chaîne alimentaire. Cela a ainsi largement contribué à une augmentation du « pool » global de la biomasse.

Au final, l'autotrophie inventée par les cyanobactéries permit de construire un nouvel écosystème, basé sur des lois fondamentalement différentes de l'écosystème antérieur et auto-entretenu presque sans accrocs depuis lors. Ce nouvel écosystème voit sa composition atmosphérique, le pool d'organismes autotrophes (photosynthétiques) et le pool d'organismes hétérotrophes globalement en équilibre depuis 3 milliards d'années, bien qu'en perpétuelle évolution interne en application des lois de l'évolution retranscrites par Charles Darwin.

1-3- Les cyanobactéries aujourd'hui

On vient de le voir, l'héritage des cyanobactéries est énorme. Cependant leur rôle ne s'est pas arrêté il y a 3 milliards d'années, elles sont toujours présentes dans notre environnement et y jouent toujours un rôle primordial.

Elles sont présentes dans la plupart des écosystèmes et biotopes terrestres. En font partie les environnements aqueux (eaux douces, saumâtres et marines, sources chaudes) et une grande partie des environnements terrestres (incluant les déserts chauds ou polaires) (Shi & Falkowski 2008). Elles vivent parfois aussi en symbiose avec d'autres organismes, des plus simples/petits comme dans les biofilms bactériens où l'on peut témoigner d'une coopération inter-espèces entre bactéries anaérobies et cyanobactéries, aux plus complexes, comme avec des plantes supérieures (angyospermes et gymnospermes) : certains travaux récents ont montré que les cyanobactéries constituaient les principaux épiphytes (organismes vivant sur d'autres plantes) fixateurs d'azote dans les forêts tropicales et mangroves du Costa Rica (Rigonato et al. 2012, Furnkranz et al. 2008) et constitueraient

ainsi le principal vecteur de l'azote moléculaire dans l'écologie tropicale. L'apport d'azote dans les océans leur serait également en grande partie imputable.

Elles convertissent l'énergie solaire en biomasse hautement énergétique, avec une efficacité supérieure aux plantes (3-9% pour les cyanobactéries contre 0,25-3% pour les plantes, Ducat, Way et Silver 2011), et demeurent ainsi un des premiers maillons de la chaîne alimentaire et, de par le fait, la première barrière à l'entrée des toxiques dans cette chaîne.

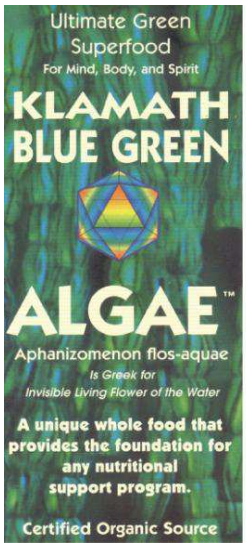
Elles participent également à une partie majeure de la production photosynthétique d'oxygène actuelle. Même si elles ne sont plus les seules à réaliser ce processus (les plantes, algues et tous les autres organismes photosynthétiques y participant aussi), leur rôle reste de premier plan sur cet aspect.

Macroflore épiphytaire dans une jungle

Figure 29

1-4- Intérêt biotechnologique

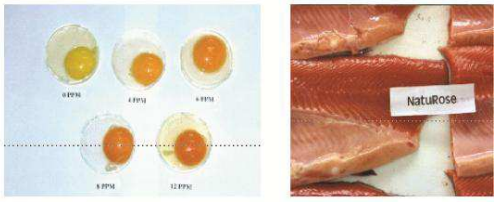
Outre leur rôle indispensable, via la chaîne alimentaire, les cyanobactéries ont aussi présenté pendant longtemps un intérêt plus direct: les mayas et certains peuples d'Afrique et d'Asie utilisaient classiquement certaines cyanobactéries, notamment des spirulines, et en faisaient la base de leur alimentation. Aujourd'hui encore, l'utilisation des cyanobactéries est répandue dans les pays asiatiques et même occidentaux où on peut les trouver dans des compléments alimentaires. De nombreux projets humanitaires visent de plus à installer des fermes à cyanobactéries dans des pays en situation de crise alimentaire afin d'apprendre aux locaux à produire cette source de protéines, vitamines et antioxydants, directement par eux-mêmes.



Les cyanobactéries peuvent servir de compléments alimentaires pour l'homme

Les cyanobactéries peuvent servir de compléments pour la pisciculture

Les cyanobactéries contiennent des molécules intéressantes pour la cosmétique



Les cyanobactéries contiennent des caroténoïdes utilisables comme colorants

Figure 30

En plus de leur fort intérêt alimentaire qui en font des cultures de choix pour l'avenir tant pour l'homme que pour ses productions animales, comme la pisciculture par exemple, les cyanobactéries produisent naturellement bon nombre de composés naturels à forte valeur ajoutée. On peut ainsi relever beaucoup de molécules d'intérêt thérapeutique ou sanitaire, comme des molécules

anticancéreuses, des métabolites secondaires, de nombreux antioxydants (caroténoïdes) ou des précurseurs médicamenteux potentiels. Elles produisent également naturellement diverses molécules à moindre valeur ajoutée mais d'intérêt sociétal tout aussi valorisable : elles produisent ainsi des polyhydroxy alcanoates (PHA) et en particulier des billes de polyhydroxybutyrate (PHB). Ces billes récoltées pourraient devenir une source naturelle de bioplastique stratégique pour l'avenir. Les cyanobactéries peuvent également être des sources de biocarburant pertinentes : biodiesels et bioéthanol peuvent ainsi être produits chez certaines d'entre elles, de même que du biohydrogène par plusieurs voies métaboliques différentes qui ont été détaillées dans le précédent chapitre (Cassier-Chauvat et Chauvat 2002).

Robustes et compétitives, les cyanobactéries présentent d'autres atouts biotechnologiques industriels forts : la plupart des technologies développées pour les cultures d'algues (micro et macro), comme les photobioréacteurs et les raceways, peuvent être directement utilisées pour cultiver des cyanobactéries modifiées ou non. Elles présentent, de plus, l'avantage notable de pouvoir dominer leur écosystème naturel et d'être moins sensibles aux contaminations extérieures. Elles sont en effet capables d'alcaliniser leur environnement jusqu'à des pH de 10 ce qui a pour effet d'éliminer certains compétiteurs, garantissant ainsi une plus grande flexibilité d'exploitation que certaines algues vertes fragiles en culture extérieure. Leurs exopolysaccharides naturels et les biofilms qu'elles peuvent former entre elles permettent également d'envisager des procédés de productions où les cyanobactéries seraient immobilisées sur des surfaces hétérogènes (billes ou surfaces) et ainsi faciliter certaines filières de culture. La question de l'exploitation de souches modifiées en raceway extérieur n'est bien évidemment pas encore d'actualité sous les latitudes françaises et étrangères, mais l'utilisation de telles souches en photobioréacteurs fermés et isolés est totalement envisageable.

Microréacteur de laboratoire

Photobioréacteurs industriels

Un raceway pilote de laboratoire (INRA de Montpellier)

Raceways industriels (production d'asthaxanthine à partir de spirulines à Hawaii)

Figure 31

Outre la diversité métabolique des souches cyanobactériennes, certaines d'entre elles peuvent être manipulées génétiquement. *Synechocystis* sp. PCC6803 est en effet un des premiers procaryotes à avoir eu son génome entièrement séquencé (Kaneko et al. 1996). Depuis lors ce sont environ 50 génomes cyanobactériens complets qui sont connus ainsi qu'une vingtaine d'autres encore en cours d'achèvement. La consultation en ligne de ces bases de données se fait librement sur des sites internet comme Cyanobase (genome.kazusa.org.jp/cyanobase/) ou MBGD (mbgd.genome.ad.jp). De nombreuses stratégies génétiques ont ainsi pu être développées pour manipuler, étudier et comprendre le métabolisme cyanobactérien.

1-5- Classification des cyanobactéries

1-5-1- Classification phylogénétique des cyanobactéries.

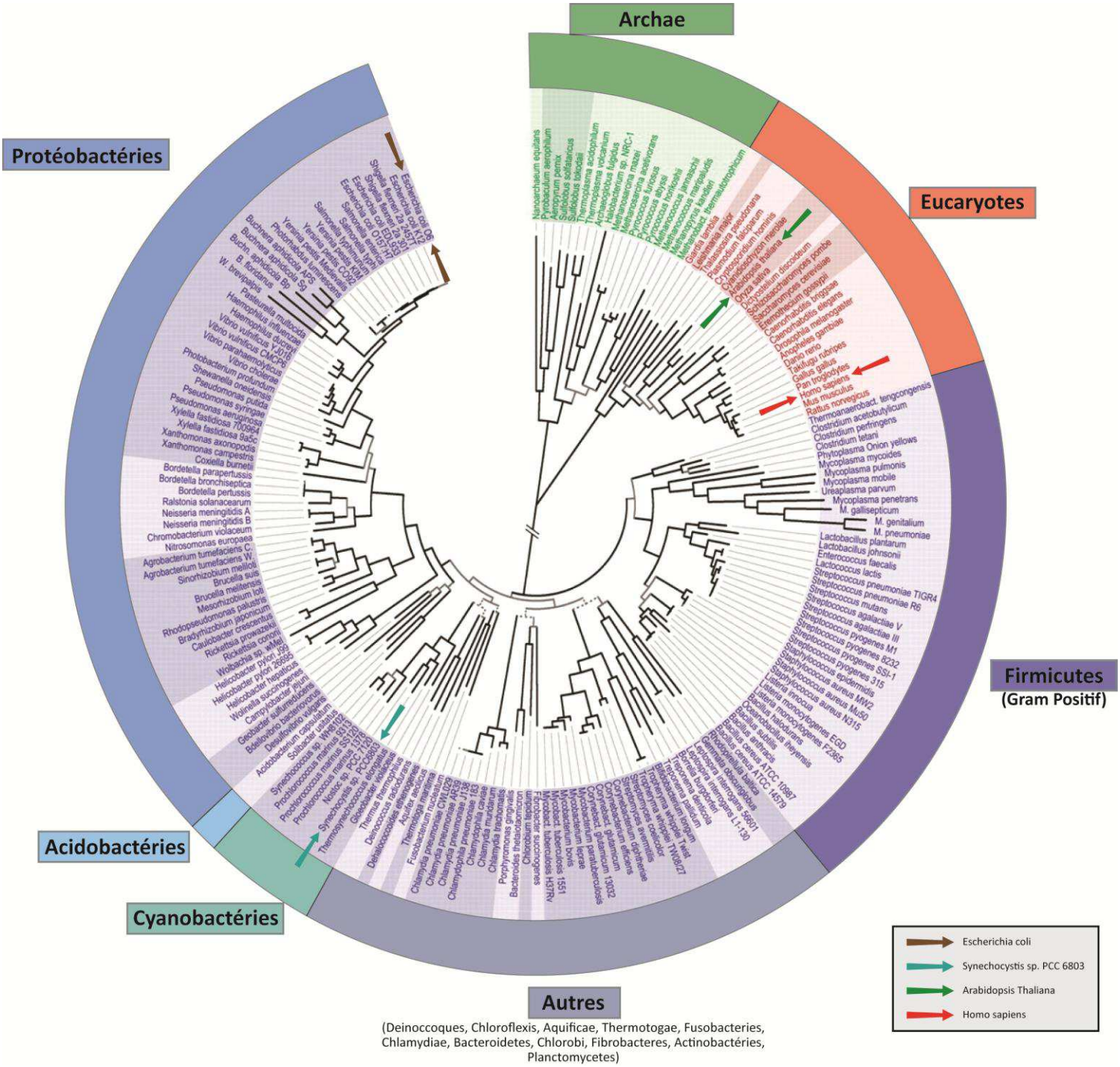
Parmi les dernières façon de classer le vivant aujourd'hui, on trouve cette classification de Ciccareli et al. 2006. Cet arbre de la Vie a été effectuée sur la base de l'étude d'une trentaine de gènes

orthologues existants dans 191 espèces au génome séquencé. Parmi les paramètres pris en compte, on peut ainsi y relever l'exclusion systématique de tous les gènes issus de transferts horizontaux plutôt que verticaux. Ces derniers travaux ont ainsi permis de confirmer des résultats depuis longtemps admis, ou de résoudre des classifications jusque-là encore très débattues. L'existence d'ancêtre commun à toutes les bactéries Gram positives a ainsi pu être encore une fois rapportée.

Concernant les cyanobactéries, on relève notamment dans cette nouvelle classification un rapprochement phylogénétique des embranchements entre les cyanobactéries, les hyperthermophiles et les Deinoccoques ; ainsi qu'un rapprochement des super embranchements entre les Protéobactéries et le nouveau groupe précédent (cyanobactéries, déinoccoques et hyperthermophiles).

Figure 32

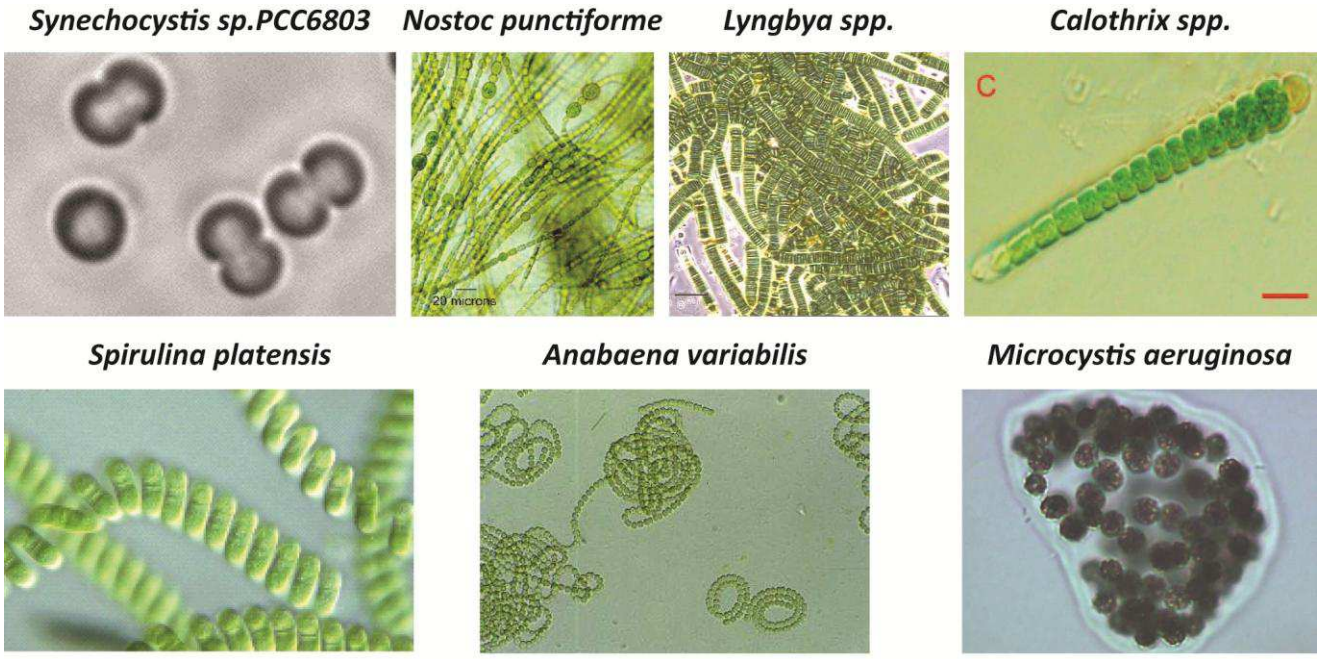
L'arbre phylogénétique de la vie



1-6- Taxonomie des cyanobactéries.

Les cyanobactéries présentent une très grande diversité morphologique, et constituent, en raison de leur extraordinaire ancienneté et flexibilité, un des plus larges et divers groupes bactérien actuels (Shi et Falkowski 2008).

Certaines sont unicellulaires, de formes sphériques ou en bâtonnets. D'autres sont pluricellulaires et forment des filament de parfois plus d'un mètre de long, certaines sont encore capables de différencier spécifiquement certaines de leurs cellules afin de les spécialiser à des rôles spécifiques, comme les *Nostoc* qui peuvent spécialiser certaines de leurs cellules en hétérocystes qui réalisent la fixation de l'azote atmosphérique.



Diversité morphologique des cyanobactéries
Les images sont issues de cyanosite (http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/)
à l'exception de *Synechocystis* sp. PCC6803 dont la photographie a été prise par le laboratoire.

Figure 33

Une première classification taxonomique a été proposée dans la Annual Review of Microbiology par Stanier et Cohen-Bazire en 1977. Ils proposaient alors une classification en 6 sections principales :

Table 7

I	***Chroococcales***	**Cyanobactéries unicellulaires à coques ou bâtonnets**
II	*Pleurocapsales*	Cyanobactéries unicellulaires qui s'agrègent par des parois externes partagées
III	*Oscillatoriales*	Cyanobactéries filamenteuses qui ne forment pas d'hétérocystes
IV	*Nostocales*	Cyanobactéries filamenteuses à hétérocystes formant des filaments de largeur égale
V	*Rivulariales*	Cyanobactéries filamenteuses à hétérocystes formant des filaments de largeur variable
VI	*Stigonematales*	Cyanobactéries filamenteuses à hétérocystes formant des filaments branchés.

Mais plusieurs organismes ne trouvaient alors toujours pas de sous-groupe où se classer (www-cyanosite.bio.purdue.edu).

Peu de temps après une autre taxonomie de référence légèrement différente est apparue, basée sur les travaux de Rippka et al. 1979 (toujours sous la supervision de Roger Stanier). Cette deuxième classification comportait cette fois 5 sections :

Table 8

Section I	***3 sous-groupes***	**Cyanobactéries unicellulaires qui se multiplient par fission binaire et bourgeonnement.**
Section II	*2 sous-groupes*	Cyanobactéries unicellulaires qui se multiplient par fissions multiples.
Section III	*2 sous-groupes*	Cyanobactéries filamenteuses sans hétérocystes qui se divisent sur un seul plan.
Section IV	*2 sous-groupes*	Cyanobactéries filamenteuses avec hétérocystes qui se divisent sur un seul plan.
Section V	*1 sous-groupe*	Cyanobactéries filamenteuses avec hétérocystes qui se divisent sur plusieurs plans.

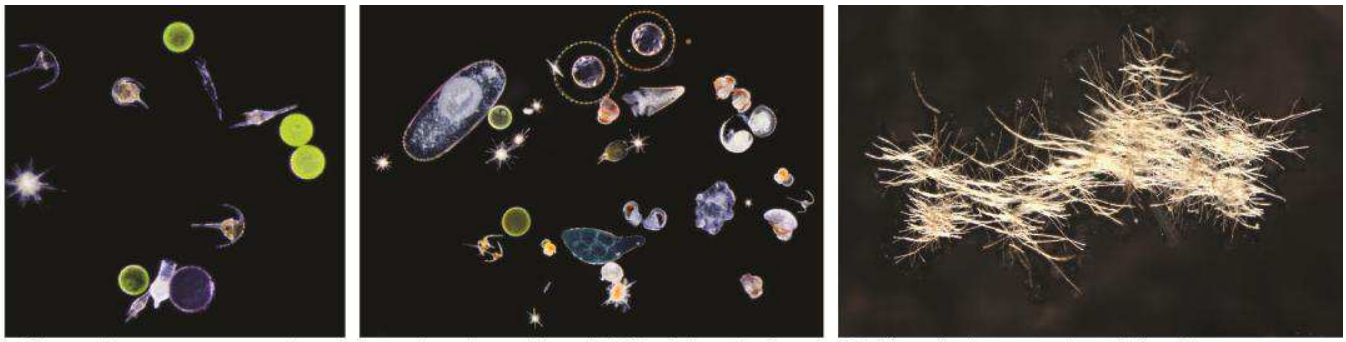
Plus récemment encore, et grâce aux travaux de Carl Woese en phylogénétique, on a commencé à classer phylogénétiquement les différentes cyanobactéries en fonction de la séquence de leur ARN ribosomal 16S. En effet cet ARN très largement conservé entre les bactéries, archées et organismes supérieurs, est désormais largement utilisé pour classer des cyanobactéries nouvellement isolées dans la nature et donne des résultats très fréquemment en accord avec les 2 classifications présentées plus tôt (Kothari et al. 2012). Mais avec uniquement 70 génomes séquencés, les méthodes de classification phylogénétique de plus en plus pointues qui apparaissent sont encore limitées et cohabitent ainsi toujours avec les termes issus de la première taxonomie qui sont encore largement utilisés et répandus dans les différentes publications scientifiques ou sur les bases de données génétiques en ligne.

On retiendra que quasiment aucune classification ne fait aujourd'hui consensus dans la communauté scientifique et qu'il apparait encore quotidiennement de nouvelles espèces ou de nouveaux genres de cyanobactéries, parfois très classiques, ou parfois plus exotiques comme dans le cas de certaines cyanobactéries symbiotiques qui s'associent avec des organismes pour compléter certaines des carences des deux organismes.

Par ailleurs nous pouvons à ce point précis évoquer l'expédition Tara Océans partie le 5 septembre 2009 et pendant 2 ans et demi récolter des échantillons planctoniques autour du monde. Cette expédition devrait résulter en la découvertes de centaines de nouvelles espèces phytoplanctoniques, et, évidemment une grande partie d'entre elles seront cyanobactériennes. L'objectif de cette expédition est avant tout de démarrer un inventaire à grande échelle des espèces marines existante et dans un second temps d'espérer trouver un intérêt biotechnologiques aux espèces qui seront découvertes.

L'équipe scientifique et les laboratoires français et étrangers associés espèrent pouvoir déployer un site internet, gratuit et libre d'accès, inventoriant l'ensemble des espèces découvertes par l'expédition à l'horizon 2014.

Figure 34



Phytoplancton et zooplancton collecté par l'expédition Tara Océans entre 2009 et 2012

Un feutris de cyanobactéries filamenteuses collecté par l'expédition Tara Océans entre 2009 et 2012

1-7- Quelques caractéristiques des cyanobactéries

De manière intéressante, on peut relever que certains critères de discrimination des cyanobactéries, assez surprenants de prime abord, sont parfois utilisés.

Un de ceux-ci concerne les taux de nucléotides G et C contenus dans leur ADN. Parmi les 4 nucléotides A, T, G et C, les 2 derniers s'apparient en effet avec 3 liaisons hydrogènes contre 2 pour A et T, défaire un appariement entre G et C est ainsi plus difficile que pour A et T. Ce taux global de GC dans le chromosome a ainsi pu être mis en corrélation, dans certains cas, avec l'environnement naturel de la cyanobactérie : en effet, plus l'organisme vivra dans un milieu chaud, plus elle aura besoin d'un ADN fortement apparié pour rester stable, ainsi on rencontre des taux de GC bien plus élevés chez les cyanobactéries thermophiles que chez celles vivant dans les mers froides. Ce critère est ainsi parfois utilisé en complément pour caractériser des organismes cyanobactériens.

De même, parmi les autres caractéristiques utilisables pour caractériser les cyanobactéries, on peut aussi relever la longueur de leur génome. Ainsi il semble qu'une tendance générale des cyanobactéries marines de haute mer est d'avoir un génome court (UCYN-A : 1,44Mb) et à faible ploïdie (1 à 2 copie du chromosome) là où des organismes confrontés à des environnements changeant constamment nécessitent plus de flexibilité et donc plus de matériel génétique pour survivre (*Nostoc punctiforme* ATCC29133 : 9,05Mb) et souvent plus de copies de ce même chromosome (entre 3 et 16 copie pour *Synechococcus* PCC7942). Il reste cependant des exceptions à ces observations empiriques qui restent encore largement inexpliquées à ce jour (la cyanobactérie marine *Acaryochloris marina* MBIC1101 possède ainsi 8462 gènes sur 8,4 Mb dont 25% des gènes sur 4 plasmides).

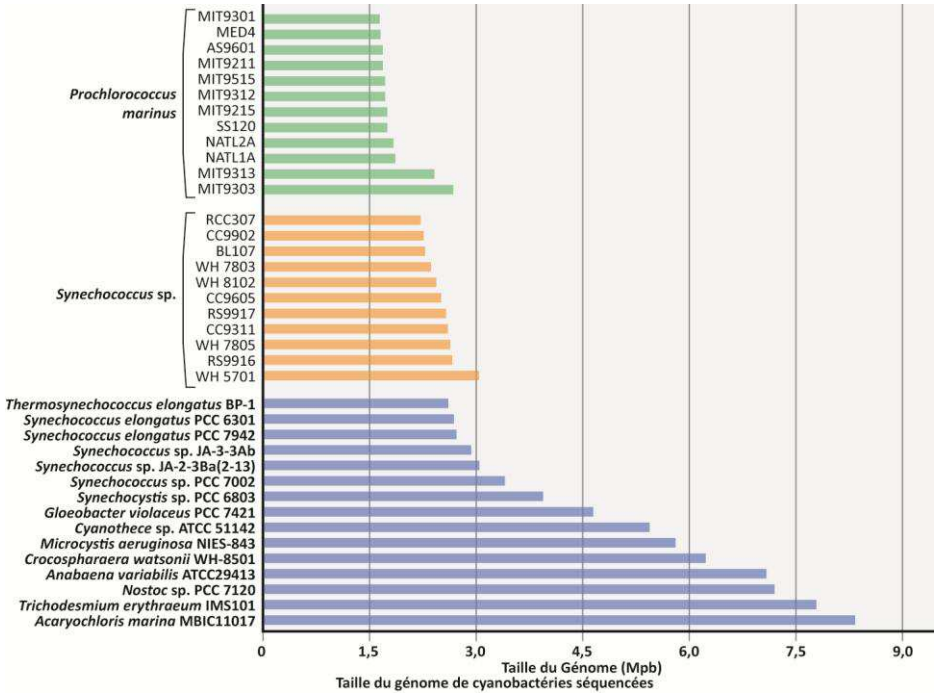
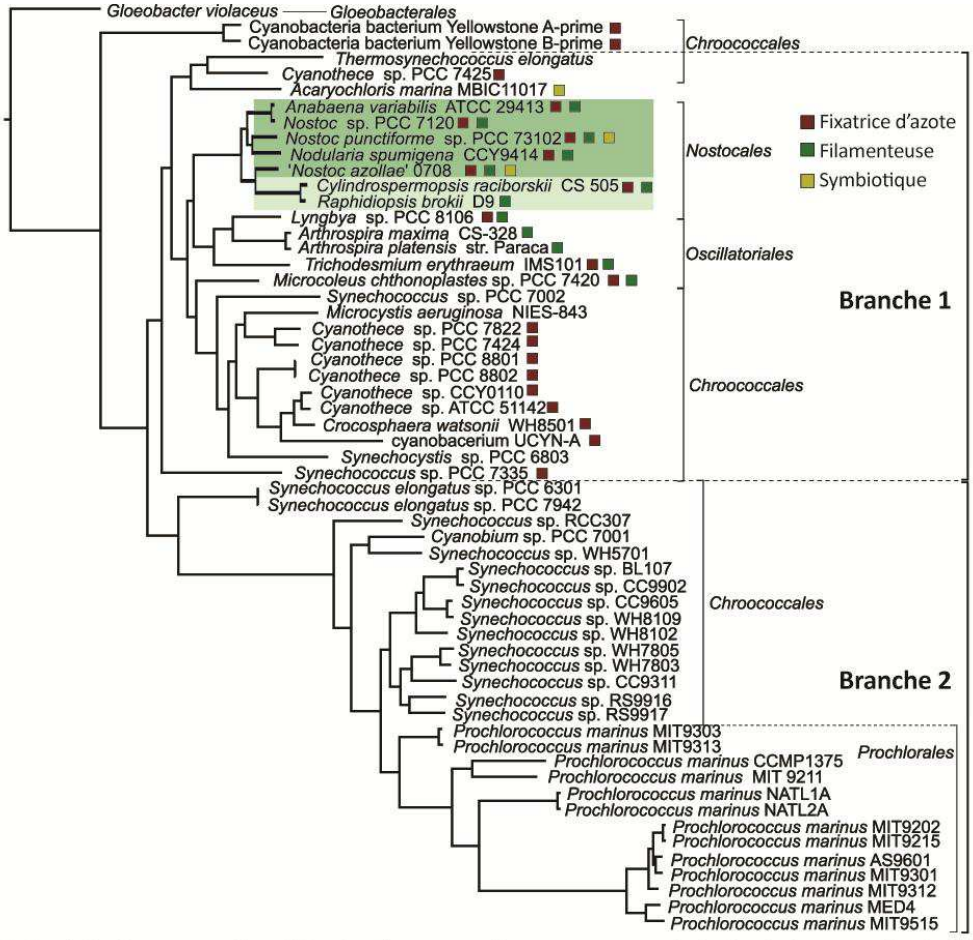


Figure 35

Cette diversité morphologique et génique est largement caractéristique du groupe des cyanobactéries, il est sans doute une conséquence de l'ancienneté de ces organismes qui ont pu évoluer dans le plus grand et varié des groupes phylogénétiques, mais cela restera certainement encore longtemps une énigme. Récemment, l'équipe suédoise de Birgitta Bergman, dans l'article Larsson et al. 2011, a travaillé à comprendre l'évolution des génomes des cyanobactéries afin de mieux cerner les raisons d'apparitions de phénotypes comme la fixation d'azote ou le caractère filamenteux ou symbiotique de certaines souches. Par leur travaux bioinformatiques sur 58 génomes cyanobactériens, ils ont mis en avant l'existence de 2 branches principales d'évolutions des génomes, l'une contenant les souches ayant appris à s'adapter à des environnements de niche et à développer les caractères spécifiques des cyanobactéries comme la fixation de l'azote et les hétérocystes en augmentant la taille de leur génome et dupliquant des gènes, et l'autre branche comportant exclusivement des cyanobactéries unicellulaires plus simples qui aurait plutôt eu tendance à simplifier leur génome (voir Fig.35). Une autre conclusion intéressante de ces travaux était la mise en évidence de l'existence de gènes exclusivement spécifiques aux cyanobactéries, représentant entre 4 et 6% du total des gènes et parmi lesquels 2 familles de protéines seulement sont partagées par tous les 58 organismes : ces familles concernent un gène qui échappe à ce jour à toute annotation fonctionnelle mais au voisinage génique particulièrement conservé (serait relié à une ARN-polymérase), et une autre famille de petits gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels de la famille des AbrBs (nous y reviendrons plus loin).

Si ces quelques caractéristiques connues des chromosomes cyanobactériens peuvent parfois servir, très peu d'informations sont en revanche disponibles concernant le nombre de copies des différents plasmides que peuvent contenir les cyanobactéries et il est difficile d'extrapoler un rôle putatif général à ces morceaux de génome. Il semblerait, toutefois, que ce nombre puisse être relativement élevé et que les transferts horizontaux de plasmides (inter-espèces ; par le biais de cyanophages ou non) soient relativement faciles. Cette faculté des cyanobactéries pourrait expliquer en partie leur grande plasticité et facilité d'adaptation à de nouveaux environnements (Narainsamy et al. 2012).



Phylogénie de 58 cyanobactéries basée sur un alignement concaténé d'orthologues sélectionnés. 285 orthologues ont été considérés pour l'étude. Les cyanobactéries avec hétérocystes totalement développés sont indiquées en vert foncé, et celles avec des hétérocystes terminaux ou non-développés sont indiqués en vert clair. Les phénotypes spécifiques sont montrés par les carrés colorés.

Figure 36

D'après Larsson et al 2011

1-8- Culture de cyanobactéries

Afin de maintenir des collections d'un grand nombre de cyanobactéries les biologistes ont décrits différents milieux de culture universels. Ceux-ci sont ainsi adaptés à l'entretien de bon nombre de souches mais ne réflètent pas forcément le milieu optimal de croissance de chaque souche :

Les cyanobactéries d'eau douce, de sol ou de source thermale et quelques cyanobactéries marines qui tolèrent de faibles forces ioniques sont cultivées dans le milieu BG-11 (Stanier & Cohen-Bazire 1977, Rippka et al. 1979). Parmi ces cyanobactéries on relèvera une exception notable : les souches fixatrices d'azote en aérobie (incluant les cyanobactéries à hétérocystes et celles du genre unicellulaire *Gloeothece*) qui sont cultivées dans du BG-11_0, ce milieu est similaire au BG-11 mais ne contient pas de $NaNO_3$. Il a, en effet, été relevé que des croissances dans le BG-11 standard de ces souches pouvaient mener à sélectionner des mutants qui perdent leur capacité à fixer l'azote aérobiquement, qui forment des hétérocystes anormaux ou qui deviennent, plus rarement, dépourvues d'hétérocystes. (Rippka et al. 1979)

La plupart des cyanobactéries marines ne peuvent pousser dans le BG-11, ni même dans du BG-11 supplémenté avec 3% de NaCl. Stanier & Cohen-Bazire ont montré en 1977 que ces cyanobactéries avaient des besoins très marqués en Na^+, Cl^-, Mg^{2+} et Ca^{2+}. Ainsi la plupart de ces souches dites « marines » sont maintenues dans un milieu MN qui est une base d'eau de mer naturelle supplémentée avec les minéraux du BG-11 à mi-quantité. Certaines souches marines poussent cependant faiblement même en MN et sont ainsi maintenues dans un milieu d'eau de mer synthétique : ASN-III

Certaines cyanobactéries peuvent également avoir un besoin strict en vitamine-B12, on les maintient en général dans le milieu adéquat additionné de 10 $\mu g.L^{-1}$ de vitamine-B12

Pour les cultures en phase solide, les milieux doivent être préparés avec 1% final de BactoAgar de Difco. La plupart des cyanobactéries poussent convenablement et tolèrent bien l'agar sur de longues périodes, c'est une des raisons qui incite à conserver les souches sur boîte de pétri plutôt qu'en liquide lorsque l'on doit les conserver sur de longues périodes car elles survivent généralement plus longtemps ainsi qu'en culture liquide (Rippka et al. 1979).

Concernant la température de croissance, il est généralement conseillé de les cultiver à 25°C même si les optima de croissance sont spécifiques à chaque souche. Pour les souches thermales, on conseille plutôt 37°C qui est proche de la température minimale qu'elles tolèrent. Beaucoup de cyanobactéries meurent rapidement si elles sont conservées entre 0°C et 4°C et ne peuvent donc pas être conservées au réfrigérateur. Cependant certaines souches, comme *Synechocystis* sp. PCC 6803, peuvent être congelées sur de très longues périodes en azote liquide pourvu qu'elles soient en présence de 5% w/v du gel protectant Diméthylsulfoxide (DMSO).

De nombreuses cyanobactéries étant photosensibles (particulièrement celles contenant de la phycoérythrine) il est aussi recommandé de ne pas les cultiver à de trop hautes intensités lumineuses. Pour les cultures de conservation, 500 lux devraient ainsi être un maximum. Pour *Synechocystis* sp. PCC 6803 les cultures de travail se font généralement entre 500 et 5000lux.

De nombreux aspect concernant la conservation des cyanobactéries sont traités dans les travaux de Stanier et al. 1971.

2- *Synechocystis* sp. PCC6803

Cette cyanobactérie a été isolée d'un lac d'eau douce nord-américain en 1968 proche de l'université de Berkeley (l'article original ne précisant pas l'endroit exact). Classifiée dans le groupe arbitraire typologique IIA en raison de son caractère sphérique (Stanier et al. 1971) puis reclassée dans le genre (genus) Aphanocapsa, elle a été ensuite nommée Synechocystis sp. PCC6803.

Historiquement, Synechocystis PCC6803, a été le modèle cyanobactérien d'analyse de la photosynthèse (Rochaix, 1992; Debus et al., 1988; Dzelzkalns et Bogorad, 1988) et reste à ce jour la cyanobactérie la mieux caractérisée.

Le fait qu'elle soit unicellulaire, sa faculté d'être naturellement génétiquement transformable (Rippka et al. 1979) et sa capacité à pouvoir pousser en hétérotrophie en ont fait un organisme modèle de choix. La photosynthèse et divers autres métabolismes présents dans tout le vivant, comme par exemple la lutte contre le stress oxydant, les dommages à l'ADN ou la division cellulaire, sont autant d'exemples de domaines pouvant être modélisés et étudiés chez Synechocystis sp. PCC6803.

2-1- Physiologie de *Synechocystis* sp. PCC6803

Synechocystis est unicellulaire, classée dans les Chroococcales, euryhaline (tolère différentes salinités, Richardson et al., 1983) et également mixotrophe (peut pousser sur glucose en faible lumière, Rochaix 1992, Dismukes et al. 2001), elle ne réalise cependant pas la fixation de l'azote. Elle est capable de s'organiser en biofilms en synthétisant des exopolysaccharides qui relient les cellules entre elles. Elle est par ailleurs motile et capable de respirer en réduisant l'oxygène en empruntant une voie similaire aux mitochondries.

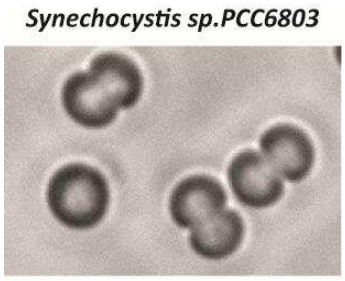


Figure 37

Elle est aussi capable de supporter un pH très alcalin qui permet par la même occasion de limiter la contamination microbienne des cultures (Summerield et Sherman 2008)

Elle possède à peu près autant de chlorophylles que de phycocyanines et pousse très bien dans un milieu minéral (BG11, voir matériel et méthodes) à 25°C ou 30°C, et la revue de Rippka et al. 1979 la décrit comme tolérant des température de croissance allant jusqu'à 39°C sur plusieurs jours. Son optimum de croissance est de 34°C.

Motile (phototactisme positif), *Synechocystis* est capable de se déplacer de façon à bénéficier d'un éclairement optimal.

D'un point de vue biotechnologique elle est capable de produire des bioplastiques (notamment des polyhydroxybutyrates ou PHB), de l'hydrogène via son hydrogénase bidirectionnelle, et elle présente également de nombreuses molécules d'intérêt (molécules antioxydantes, anticancéreuses etc...) (Cassier-Chauvat et Chauvat 2002).

Génétique de *Synechocystis*

Comme déjà évoqué plus tôt, *Synechocystis* a été le 3ème organisme procaryote dont le génome a été séquencé (après *Haemophilus influenza* et *Mycoplasma genitalium*), et le premier organisme photosynthétique (Kaneko et al. 1996). Son chromosome fait 3 573 470 paires de bases de long pour 3317 gènes et est consultable librement sur le site internet cyanobase (http://genome.microbedb.jp/cyanobase). Ce petit chromosome circulaire est polyploïde (Labarre et al. 1989) et chaque cellule contient une dizaine de copies du chromosome en phase exponentielle de croissance (dont chaque copie semble exprimée).

Le génome comporte également plusieurs plasmides de 2,3 à 120 kpb, représentant 10% du génome et portant le total de celui-ci à 3725 gènes sur presque 4 Mbases.

Synechocystis est un organisme facilement manipulable génétiquement, il est en effet naturellement transformable lors de la transition entre les phases exponentielle et stationnaire de croissance (Shestakov et Khyen, 1970). La recombinaison homologue, très efficace, permet de déléter les gènes (Grigorieva et Shestakov 1982; Pakrasi et al. 1988 ; Labarre et al. 1989) et il accepte facilement la conjugaison avec un plasmide réplicatif comme le pFC1 construit au laboratoire (Mermet-Bouvier et Chauvat 1994). D'autres outils permettent l'analyse in vivo de l'expression et la fonction de n'importe quel gène ainsi que la localisation subcellulaire des protéines correspondantes (Marraccini et al. 1993; Poncelet et al. 1998; Mazouni et al. 2003; Mazouni et al. 2004).

Figure 38

	Name	Size (bp)	Genes
	Chromosome	3,573,471	3,317
	pSYSM	119,895	132
	pSYSX	106,004	110
	pSYSA	103,307	106
	pSYSG	44,343	49
	pCC5.2	5,214	6
	pCA2.4	2,378	2
	pCB2.4	2,345	3
	Total	3,956,957	3,725

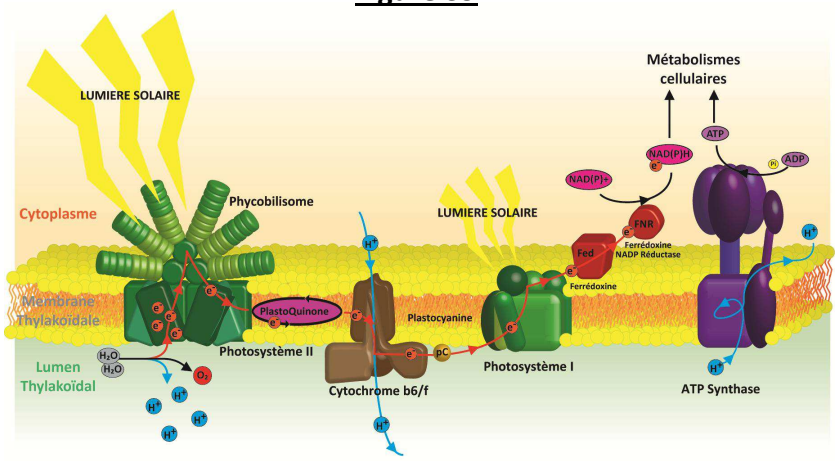
Chromosomes et plasmides de *Synechocystis* sp. PCC6803
(http://genome.microbedb.jp/cyanobase/)

3- La photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries et *Synechocystis*

Comme expliqué plus tôt, les cyanobactéries seraient à l'origine des chloroplastes des plantes, et ainsi, en tant qu'organisme photosynthétique modèle, procaryote et unicellulaire, *Synechocystis* a servi de modèle pour comprendre les mécanismes moléculaires de la photosynthèse.

C'est principalement sa qualité de bactérie mixotrophe, lui permettant de pousser malgré des mutations de l'appareil photosynthétique qui seraient létales aux plantes supérieures, qui a permis la compréhension fondamentale de la photosynthèse que nous avons aujourd'hui.

Figure 39



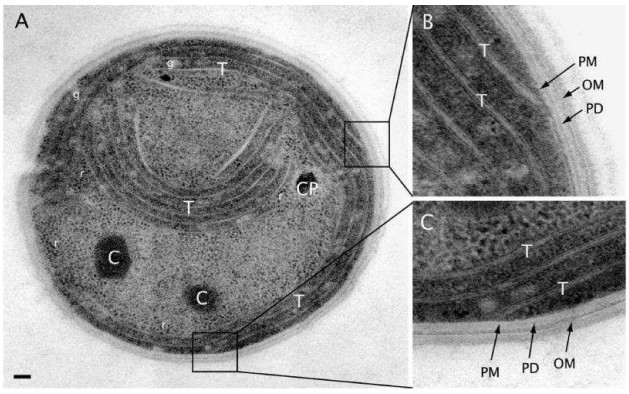
La chaîne de Transfert d'électrons et la photophosphorylation autour du processus de photosynthèse chez les cyanobactéries

L'appareil photosynthétique est composé de 2 complexes moléculaires membranaires: les photosystèmes I et II (PSI et PSII). Un de ces deux macrocomplexes enzymatiques, le PSII, permet de catalyser la lyse de la molécule d'eau et de générer un gradient de protons et d'électrons au sein du thylakoïde afin d'en tirer de l'énergie, et le deuxième complexe, le PSI, capte la lumière solaire afin de réduire les ferrédoxines et al.imenter la cellule en énergie.

Ci-après une description non exhaustive des multiples acteurs de la photosynthèse et des rôles de chacun, suivie d'un bilan synthétique résumant les mécanismes principaux par lesquels les organismes autotrophes se procurent de l'énergie.

3-1- Le thylakoïde

Figure 40



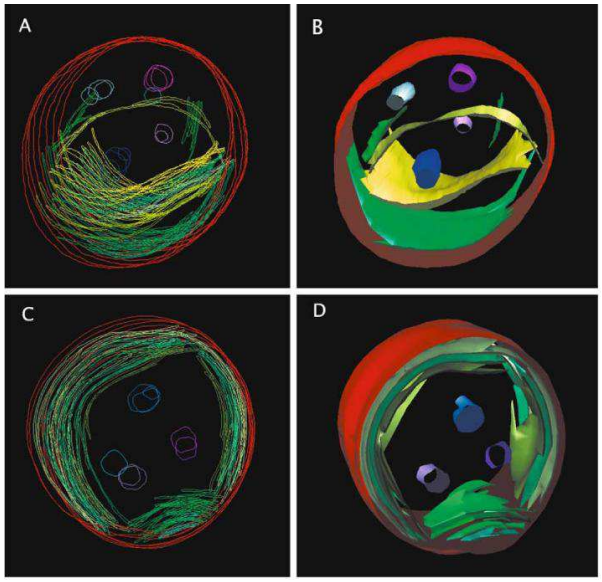
Micrographie électronique d'une section fine d'une cellule de *Synechocystis* sp. PCC6803
B et C sont des agrandissements des zones en A et montrent la forte proximité entre les membranes thylakoïdales (T) et la membrane plasmique (PM). Légende: C = carboxysome ; CP = granule de cyanophycin ; g = granule de glycogène; r = ribosomes ; PM = membrane plasmique ; OM = membrane externe (outer membrane) ; PD = couche peptidoglycane ; T = membrane thylakoïdale ; la barre mesure 100nm

D'après Pakrasi et al 2006

Cet ensemble de membranes est situé à l'intérieur même des cyanobactéries. L'espace intérieur défini par la membrane thylakoïdale s'appelle lumen alors que l'espace extérieur est constitué du cytoplasme (pour les cyanobactéries) ou « stroma » (pour les chloroplastes).

Les différents acteurs de la photosynthèse sont liés à cette membrane. Ainsi le photosystème I est l'acteur le plus souvent « à l'obscurité » de tous. Le photosystème II se trouve lui toujours du côté cytoplasme du thylakoïde, pour recevoir un maximum de lumière. Le complexe cytochrome *b6/f* se trouve partout dans le thylakoïde, l'ATP synthase se trouve plutôt à proximité des zones d'empilement de thylakoïdes appelées « grana ».

Les protéines permettant le processus photosynthétique constituent une part importante (environ 30%) de l'ensemble des protéines des organismes photosynthétiques.



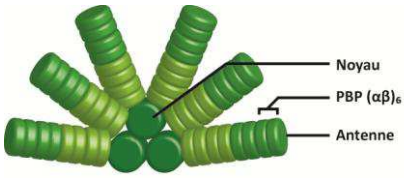
Reconstruction tridimensionnelle d'une cellule de *Synechocystis* sp. PCC6803 : Les membranes thylakoïdales sont situées à l'intérieur de la cellule et à proximité de la membrane externe.
Le modèle 3D est généré grâce à un logiciel qui superpose plusieurs coupes ultrafines d'une même cellule puis en extrapole une image en relief. B (resp. D) est l'extrapolation en 3D des contours superposés visibles en A (resp. C).
Rouge: Membrane plasmique ; Vert/Jaune membranes thylakoïdales ; Bleu/Violet : carboxysomes

D'après Pakrasi et al 2006

Figure 41

3-2- Les phycobilisomes

Les phycobilisomes sont les antennes collectrices d'énergie lumineuse du PSII chez les cyanobactéries. Ce complexe se trouve du côté cytoplasmique de la membrane thylakoïdale et est constitué à 80% de phycobiliprotéines (PBP) arrangées en antennes collectrices, maintenues ensembles par des linkers.



Phycobilisome

Figure 42

Les PBP constituent les sous-unités des antennes collectrices et sont une association d'un chromophore, appelé phycobiline, et de la protéine elle-même. On compte fréquemment plus de 100 sous-unités PBP par phycobilisome. Il existe 4 types de phycobilines principales, certaines espèces pouvant parfois présenter des exceptions, notamment la phycoérythrocyanine qui n'est pas présente chez tous les organismes dont *Synechocystis*. Ces phycobilines sont localisées le long du complexe en fonction de leurs différents potentiels énergétiques. Le bon agencement des PBP, reliés entre eux par des linkers protéiques, permet d'assurer un transfert énergétique avec un rendement quantique de plus de 95% le long de l'antenne (Gao et al. 2011):

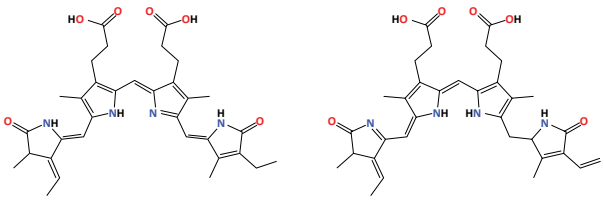
Table 9

Phycobiline	Abréviation	Longueur d'onde d'absorption	Localisation dans le complexe
Allophycocyanine	APC	620nm - 651nm - 670nm	Noyau du complexe
Phycocyanine	PC	555nm - 620nm	Antennes périphériques
Phycoérythrine	PE	498nm - 546nm - 566nm	Extrémités des antennes
Phycoérythrocyanine	PEC	570nm - 595nm	Extrémités des antennes

(Bryant et al. 1982)

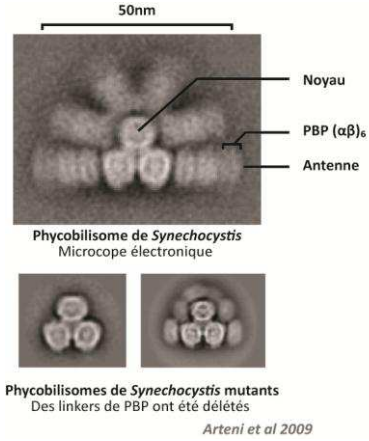
Figure 43

Phycocyanobiline **Phycoerythrobiline**



Les phycobilines sont des pigments colorés. Schématiquement, il s'agit de tétrapyrolles linéaires plus ou moins modifiées. Elles sont moléculairement proches des chlorophylles qui contiennent un tétrapyrolle cyclique, mais la cyclisation n'étant pas opérée, elles peuvent absorber des longueurs d'onde lumineuses bien plus basses que ne le peuvent les chlorophylles. Certains scientifiques s'accordent à dire que ce système collecteur d'énergie présenterait un avantage évolutif pour les cyanobactéries qui sont ainsi capables de réaliser la photosynthèse sans entrer en compétition trop directement avec les autres organismes collecteurs de lumières, mais également car cela leur permet d'atteindre des niches écologiques différentes : à des profondeurs plus importantes, les lumières de longueur d'onde plus faibles sont moins absorbées par les colonnes d'eau et les cyanobactéries pourraient ainsi collecter la lumière même à ces profondeurs plus défavorables.

Figure 44



La structure modélisée d'une antenne peut être représentée comme le montre la figure 44 : les antennes de PBP sont rattachées à un des 3 noyaux, ou « cœurs », du phycobilisome qui reçoit les électrons collectés par les pigments photosynthétiques des PBPs. Ensuite le trimère de noyaux transmet ces électrons au Photosystème II qui prend le relais.

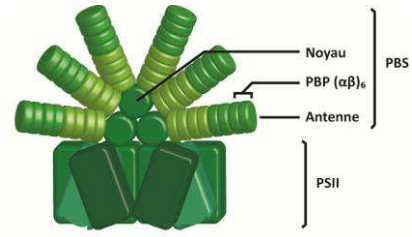
Récemment une image en microscopie électronique a été prise des phycobilisomes de *Synechocystis* et valide le modèle jusque-là proposé, ainsi que l'importance des linkers dans l'assemblage des antennes (Arteni et al. 2009).

3-3- Le photosystème II

Figure 45

Photosystème II

Le PSII reçoit directement des électrons de la part des phycobilisomes ou bien depuis son propre système d'antennes collectrices, sensibles à des longueurs d'ondes différentes des PBP du PBS grâce à ses propres pigments photosynthétiques : les chlorophylles. Il utilise cette énergie pour finalement oxyder la molécule d'eau (il s'agit du « Water Oxydizing Complex » WOC ou parfois qualifié dans l'autre sens : « Oxygen Evolving Center » OEC) par la réaction suivante:



Le complexe Photosystème II - Phycobilisome

Figure 46

$$2\,H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$$

Cette réaction est la plus thermodynamiquement difficile à réaliser par le vivant et demande ainsi un énorme apport énergétique pour se faire.

Chlorophylle *a*

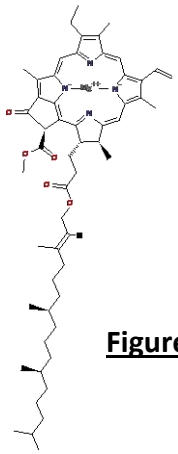


Figure 47

A ce jour un seul complexe de PSII a pu être cristallisé pour une diffraction aux rayons X et il provient d'une cyanobactérie thermophile : *Thermosynechococcus elongatus* (Ferreira et al. 2004). Le complexe dimérique mesure ainsi 105 Å de haut (dont 45 Å transmembranaires), pour 205 Å de long et 110 Å de large. Chaque monomère contient 19 sous-unités, 36 chlorophylles, 7 caroténoïdes *trans* (probablement des β-carotènes) et un site actif OEC. Ce site actif contient un motif Mn_3CaO_4, de forme semblable à un cubane, et lié à un 4ème atome de Mn par un pont mono-µ-oxo (Ferreira et al. 2004).

β-carotène

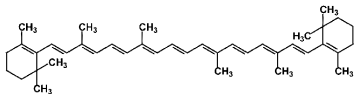
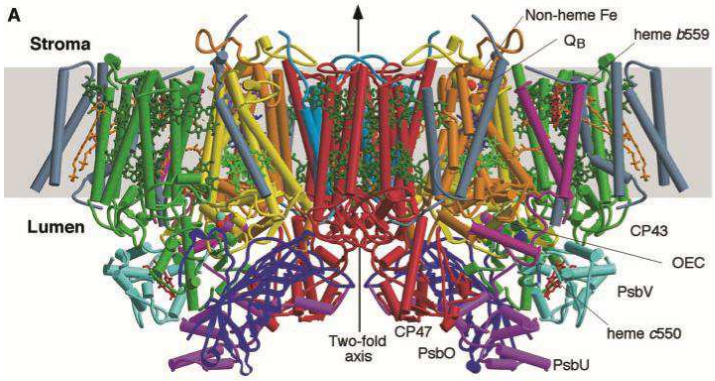
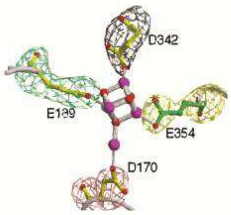


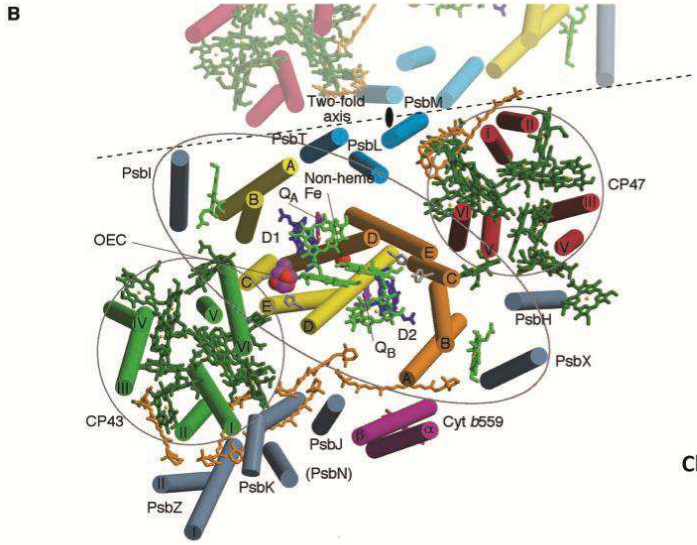
Figure 48

Les travaux anglo-japonais confirment de plus que pour réaliser la photolyse de la molécule d'eau, une cascade de sites métalliques et de cofacteurs est utilisée dans le PSII afin d'amener le pouvoir réducteur depuis les antennes CP43 et CP47, ou le PBS, jusqu'au site actif du PSII. Les résultats permettent également de visualiser la grande quantité de chlorophylles (plus d'une trentaine) et de caroténoïdes inclus dans le supercomplexe, ainsi que les nombreux cofacteurs non métalliques qui participent à la réaction et à l'acheminement très rapide des électrons au sein de l'enzyme.

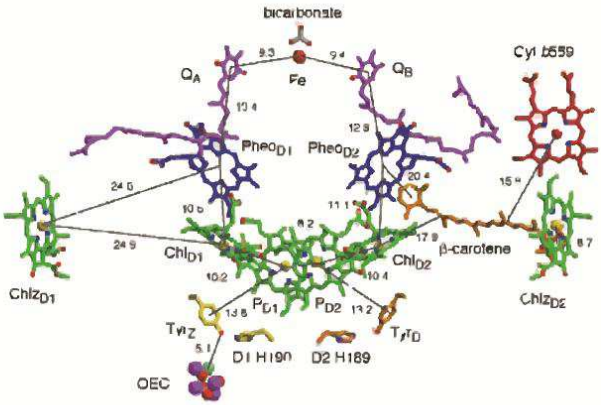




Site actif «OEC»
Mn3CaO4-Mn «cubane-like»



Un monomère de PSII avec ses pigments et cofacteurs



Chaîne de transfert d'électrons depuis les CP43 et CP47 jusqu'aux sites actifs
Les plastoquinones QA et QB sont représentées en violet

Ferreira et al 2004

Figure 49

Schématiquement, la lumière excite les chlorophylles du PSII, particulièrement sur les seules sous-unités contenant des pigments photosensibles : les 2 sous-unités CP43 et CP47 qui sont parcourues respectivement de 14 et 16 chlorophylles, initiant un transfert de l'énergie collectée d'un côté de la membrane vers l'autre. Le transfert énergétique se fait de proche en proche en faisant passer les électrons par divers cofacteurs et caroténoïdes jusqu'au site métallique. Parallèlement, le site métallique fixe une molécule d'eau sur un seul de ses ions Mn^{2+} (celui à l'extérieur de la structure cubane), puis, alimenté en électrons par la cascade décrite plus tôt, un intermédiaire contenant une espèce Mn(IV) ou Mn(V) hautement réactive et électrophile se forme, permettant dans la foulée la formation du dioxygène. Dans le même temps que cette oxydation de la molécule d'eau, le site actif transfère le pouvoir réducteur récupéré à des plastoquinones qui se détachent du complexe et sont transférées au milieu transmembranaire pour rejoindre le complexe cytochrome *b6/f*.

Les protons sont directement relâchés dans le lumen thylakoïdal et l'O_2 va diffuser rapidement vers le milieu extracellulaire, bien que dans certains cas il puisse subir des suroxydations conduisant aux espèces réactives de l'oxygène, les ROS, traitées plus en détails au chapitre 5 mais qui peuvent être responsables de graves dommages cellulaires.

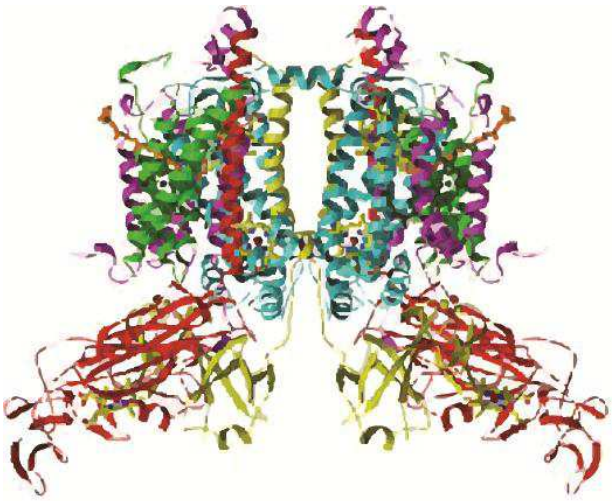
Figure 50

Cytochrome b6/f

3-4- Le complexe cytochrome *b6/f*

Ce complexe protéique transmembranaire est une pompe à protons. Il reçoit les électrons depuis le pool de plastoquinone et les utilise pour introduire de nouveaux protons depuis le cytoplasme jusque dans le lumen thylakoïdal, augmentant encore davantage le gradient de protons des 2 côtés de la membrane, processus déjà entamé par l'activité du photosystème II. Les électrons sont ensuite récupérés par les petites protéines à cuivre plastocyanine qui les transfèrent au Photosystème I.

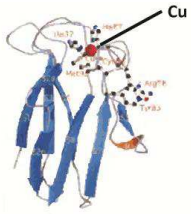
Le cytochrome *b6/f* contient quelques pigments photosynthétique : des chlorophylles et des caroténoïdes.



cytochrome b6/f de Nostoc sp. PCC7120

Baniulis et al 2009

Figure 51



Plastocyanine de *Synechococcus* sp. PCC7942

Inoue et al 1999

Figure 52

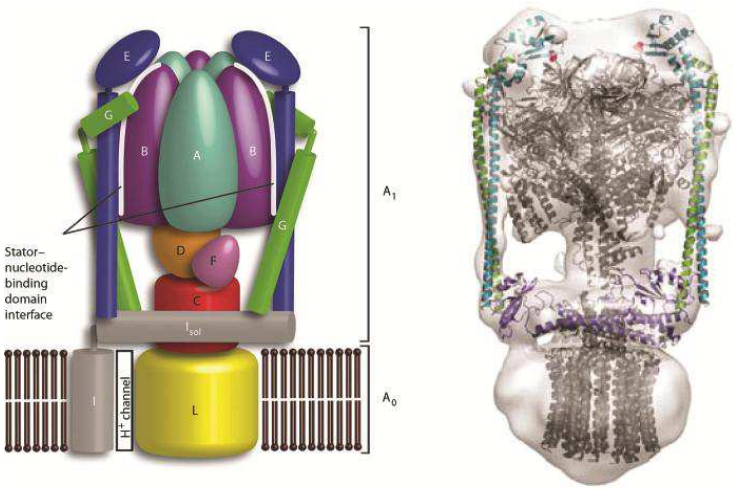
3-5- L'ATP synthase

ATP synthase

Son rôle est de générer de l'ATP, source d'énergie pour de nombreuses enzymes de la cellule, à partir d'ADP et de phosphate (Pi), et des protons créés dans le lumen thylakoïdal par le PSII et le complexe cytochrome *b6/f*.

Le passage des protons dans le « rotor » du complexe enzymatique entraîne une série de changement conformationnels qui entraînent la phosphorylation catalytique de l'ADP au niveau du stator de l'ATP synthase.

L'ATP est directement synthétisé dans le cytoplasme de la cellule et est prêt à être utilisé par tous les métabolismes vitaux de l'organisme



ATP-Synthase de *Thermus thermophilus*

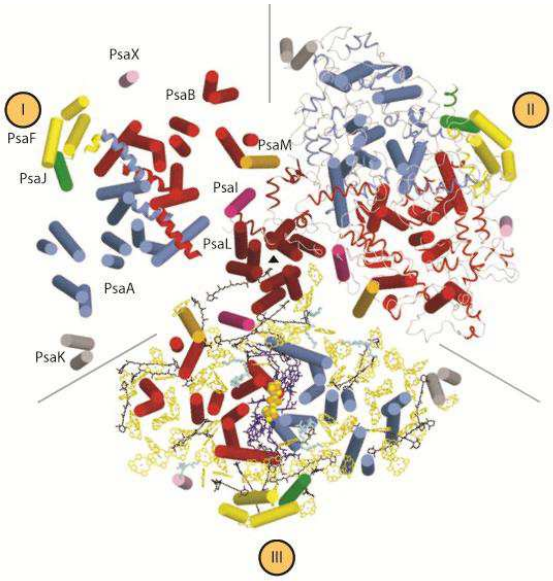
Lee et al 2010

Figure 54

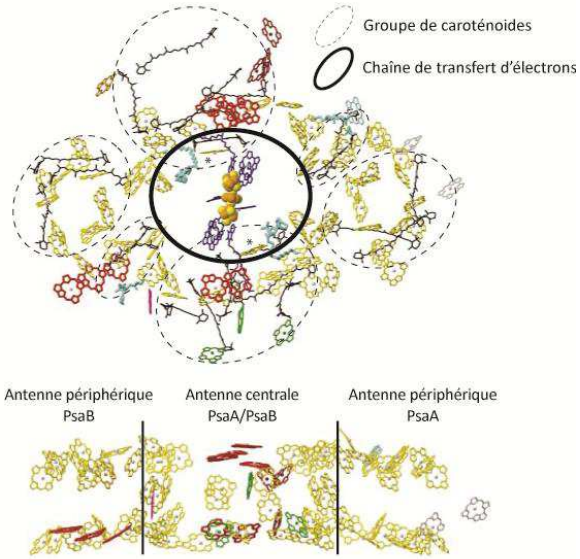
Figure 55

3-6- Le photosystème I

Le photosystème I est le deuxième type de complexe protéique des organismes photosynthétiques capable de collecter la lumière. En comparaison du PSII il y a davantage de PSI au sein des cellules (entre 3 et 5,5 fois plus, Rakhimberdieva et al. 2001).



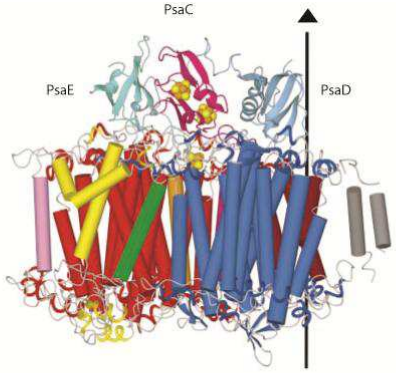
Le trimère de PSI en vue de dessus, côté cytoplasmique
Chaque monomère présente différents éléments structuraux (le triangle noir montre l'axe de symétrie C3). **Monomère I**: les cylindres sont les zones transmembranaires des sous-unités; les plus nombreux, en bleu et rouge, représentent ceux des plus grosses sous-unités, PsaA et PsaB (respectivement). **Monomère II:** sous-unités du PSI en vue ruban complète. **Monomère III:** ensemble des cofacteurs du PSI: en jaune sont les 90 Chl*a* (sans le subsituant du cycle), en noir les 20 caroténoïdes, en turquoise les lipides. Les cofacteurs de la chaîne de transfert d'électron (Chl*a* et quinones) sont représentés en bleu foncé au centre du monomère, avec les 3 centres Fe_4S_4 (sphères jaunes et oranges). Les 3 sous-unité CDE ont été ommises dans les 3 monomères par soucis de clarté.



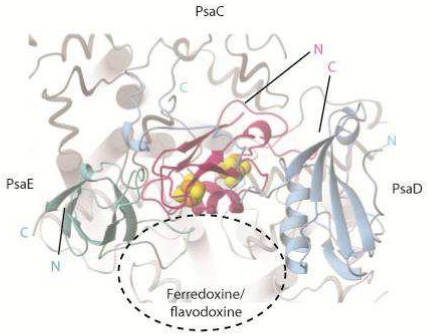
Vue des cofacteurs du monomère III
A: La chaîne de transport d'électrons se situe au centre du monomère. Les chlorophylles (jaunes, subsituants cycliques non représentés) et les caroténoïdes (noirs) parcourent l'ensemble du monomère et capte la lumière. **B:** Rotation de 90° horizontale de la vue A. Les pigments sont tous situés moins de 18A les uns des autres.

Figure 56

Le PSI peut exister *in vivo* sous forme monomère ou trimère (organisé comme un trèfle). La forme trimère du PSI de la cyanobactérie thermophile *Thermosynechococcus elongatus* a été cristallisée en 2001 par une équipe allemande (Jordan et al. 2001). Chaque monomère est composé de 12 sous-unités protéiques différentes qui coordonnent 127 cofacteurs différents dont 96 chlorophylles, 2 phylloquinones, 3 centre Fe_4S_4, 22 caroténoïdes et 4 lipides. Le PSI capte l'énergie lumineuse avec un large système d'antennes internes et guide les électrons collectés jusqu'au centre réactionnel par une cascade de cofacteurs avec une grande efficacité. Le cluster Fe-S de bout de chaîne transfère ensuite son électron à une ferrédoxine (ou une flavodoxine dans certains cas) du côté cytoplasmique du thylakoïde. Chez *Synechocystis*, la trimérisation du PSI se ferait par le biais d'un ion Ca^{2+} à l'interface entre les monomères de PSI (Jordan et al. 2001).



Vu de côté d'un monomère de PSI.
Les cylindres représentent les hélices-α transmembranaires (en bleu et rouge celles des PsaA et B). Les 3 sous-unités cytoplasmiques PsaC (en rose), contenant les 3 clusters Fe_4S_4 (sphères jaunes et oranges), et PsaD et PsaE (en turquoise) permettent de continuer le transfert d'électrons jusqu'à la ferredoxine/flavodoxine dont le site putatif d'appontage est délimité entre PsaD et PsaE.



Vu de dessus d'un monomère de PSI: PsaCDE .
Les 2 sous-unités PsaD et PsaE permettent le pontage vers la ferredoxine et PsaC assure le transport électronique avec les deux centres FeS

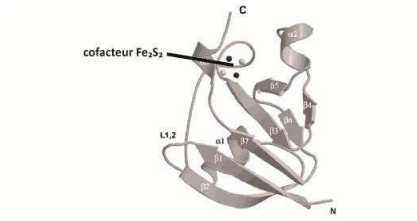
Figure 57

D'après Jordan et al 2001

D'un point de vue moléculaire, le photosystème I est un assemblage protéique complexe qui possède son propre système d'antennes collectrices de lumière, elles aussi se basant sur le pouvoir collecteur des chlorophylles. Il a cependant été découvert dans certains cas, notamment lorsque l'organisme entre en carence en Fer, un système complémentaire de collecte de la lumière qui lui permet de s'adapter et d'économiser le métal, il s'agit de la protéine IsiA.

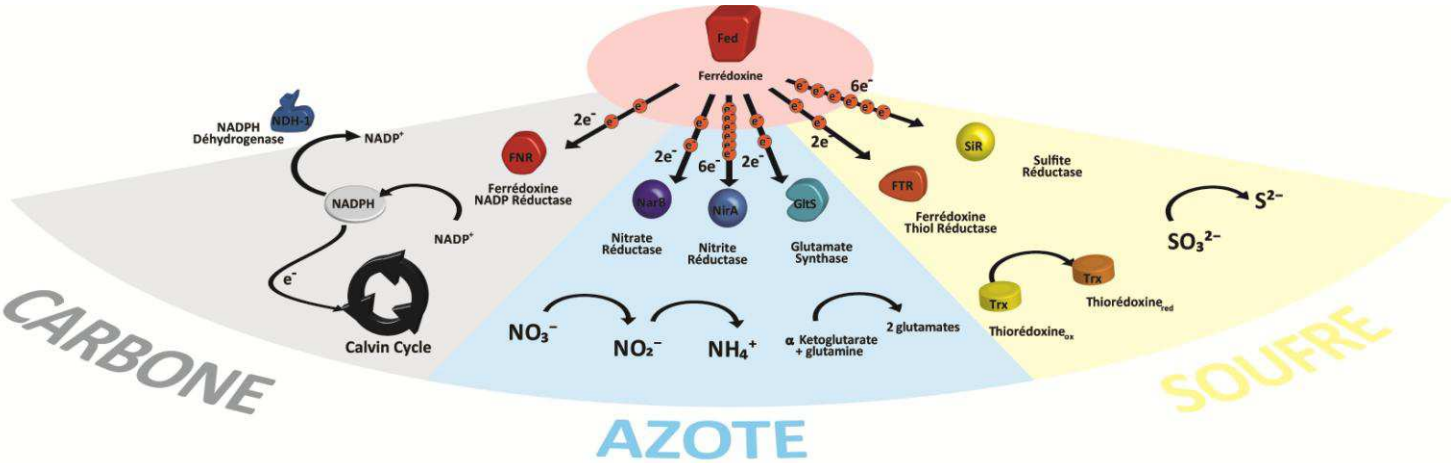
3-7- Ferrédoxine/Flavodoxine et FNR

Les électrons issus de la photosynthèse sont utilisés pour la réduction de la ferrédoxine, il s'agit d'une petite protéine comportant un site [Fe_2S_2], situé directement à la surface de la protéine et permettant des oxydations/réductions rapides. Puis elle distribue les électrons photosynthétiques à différentes voies métaboliques, dont l'assimilation de l'azote, et en passant parfois par différents intermédiaires comme la ferrédoxine NADPH Réductase (FNR), qui alimente le métabolisme du carbone, ou la ferrédoxine thiorédoxine réductase (FTR), liée à l'homéostasie du soufre.



Ferredoxine cyanobacterienne de *Mastigocladus laminosus*
sphères grises et noires: cofacteur Fe_2S_2
Fish et al 2005

Figure 58



La ferrédoxine alimente en électron l'ensemble des voies métaboliques
Figure 59

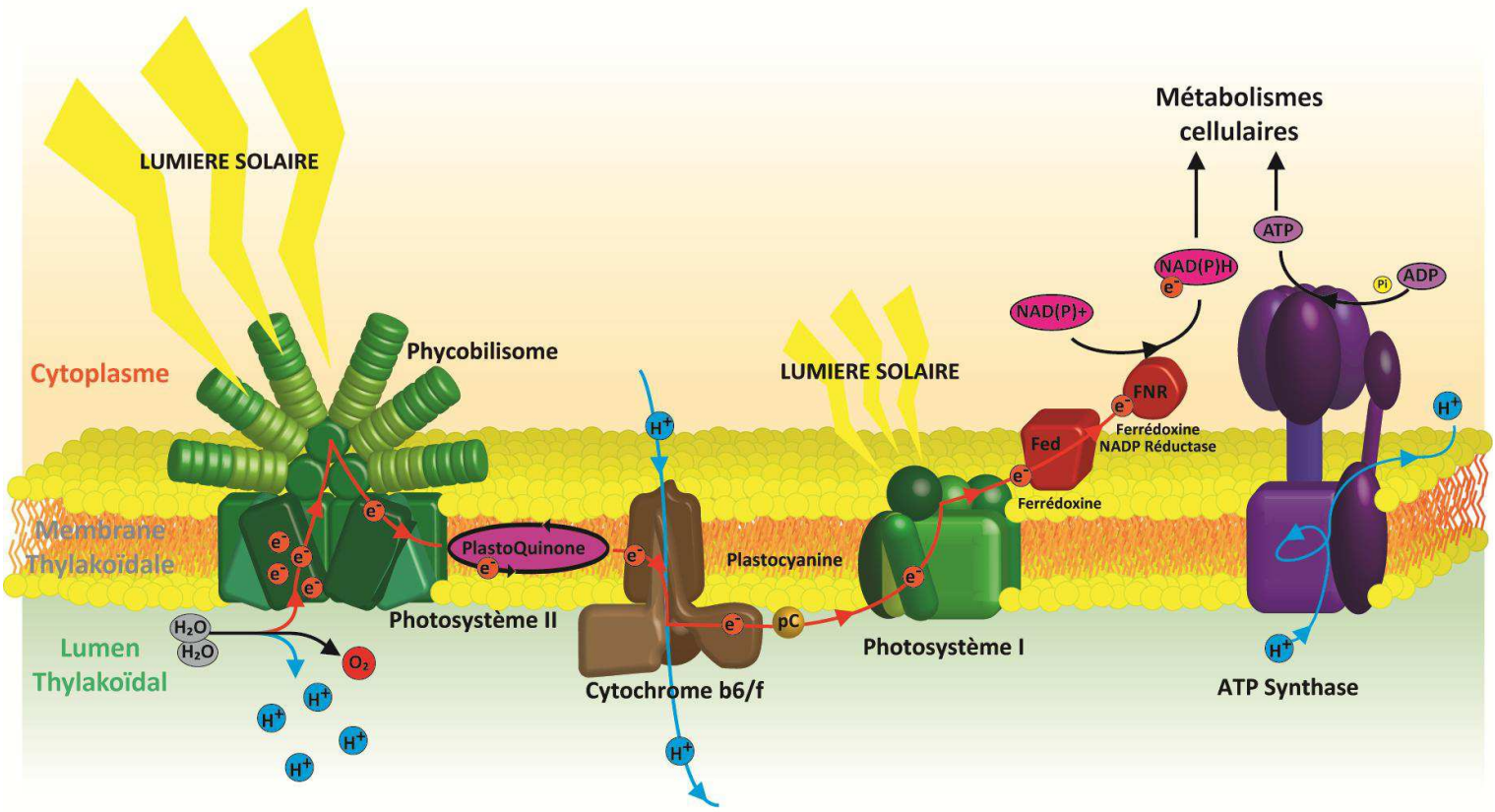
Synechocystis sp. PCC6803 possède 9 gènes codant pour des ferrédoxines, a priori, de fonctions différentes, mais encore non claires. Les ferrédoxines constituent un carrefour capital après la photosynthèse, c'est par elles que les différents métabolismes cellulaires sont alimentés en énergie.

3-8- La chaîne de transfert d'électrons

La machinerie photosynthétique est un ensemble de 4 super-enzymes complexes, parcourues d'une grande quantité de cofacteurs métalliques et non-métalliques et qui communiquent électrochimiquement entre eux grâce à de petites molécules (plastoquinones) ou de petites protéines également métalliques (plastocyanines) qui font la navette. L'objectif de cette machinerie complexe est l'alimentation énergétique de l'organisme par la production d'ATP et de NADPH.

La lumière solaire traverse la membrane externe des cellules pour atteindre les thylakoïdes. Les photons atteignent alors le phycobilisome, ils excitent les électrons des pigments photosynthétiques des phycobiliprotéines et transfèrent cette énergie jusqu'au noyau du PBS et finalement jusqu'au photosystème II. Cela permet le cassage de 2 molécules d'eau sur le site actif du PSII et la formation d'une molécule d'oxygène, de 4 protons et 4 électrons :

$$2\,H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$$



La chaîne de Transfert d'électrons et la photophosphorylation autour du processus de photosynthèse chez les cyanobactéries

Certains de ces électrons sont utilisés pour régénérer les pigments photosynthétiques et les autres quittent le PSII par le biais des plastoquinones. Les plastoquinones réduites passent ensuite les électrons au complexe cytochrome *b6/f*, une pompe à protons figée dans la membrane. Le passage des électrons au travers de ce complexe est couplé au pompage de protons du cytoplasme vers le lumen des thylakoïdes et continue d'augmenter le gradient de protons entre les 2 côtés de la membrane. Ce gradient de protons de plus en plus fort ne peut ensuite être évacué que par l'ATP synthase qui utilise le passage de protons depuis le lumen vers le cytoplasme pour phosphoryler un ADP en ATP (photophosphorylation).

Lorsque la lumière est transférée au PSI, les électrons sont transférés directement aux ferrédoxines, qui les transfèrent alors au système NADP réductase qui va réduire le NAD(P)+ en NAD(P)H directement dans le cytoplasme.

Les électrons venant du PSII ne peuvent être transmis au PSI que par l'action d'un autre intermédiaire moléculaire en sortie du cytochrome *b6/f* : les plastocyanines. Ces électrons suivent ensuite le circuit PSI-ferrédoxine-FNR-NADPH et al.imentent à leur tour la cellule en pouvoir réducteur.

Figure 60

3-9- *Synechocystis* et l'hydrogène

Comme nous venons de le voir, la photosynthèse alimente toute la cellule en pouvoir réducteur. Ce pouvoir réducteur peut, ou non, être utilisé directement sous sa forme électronique par interaction directe avec les ferrédoxines ou par l'intermédiaire du NAD(P)H.

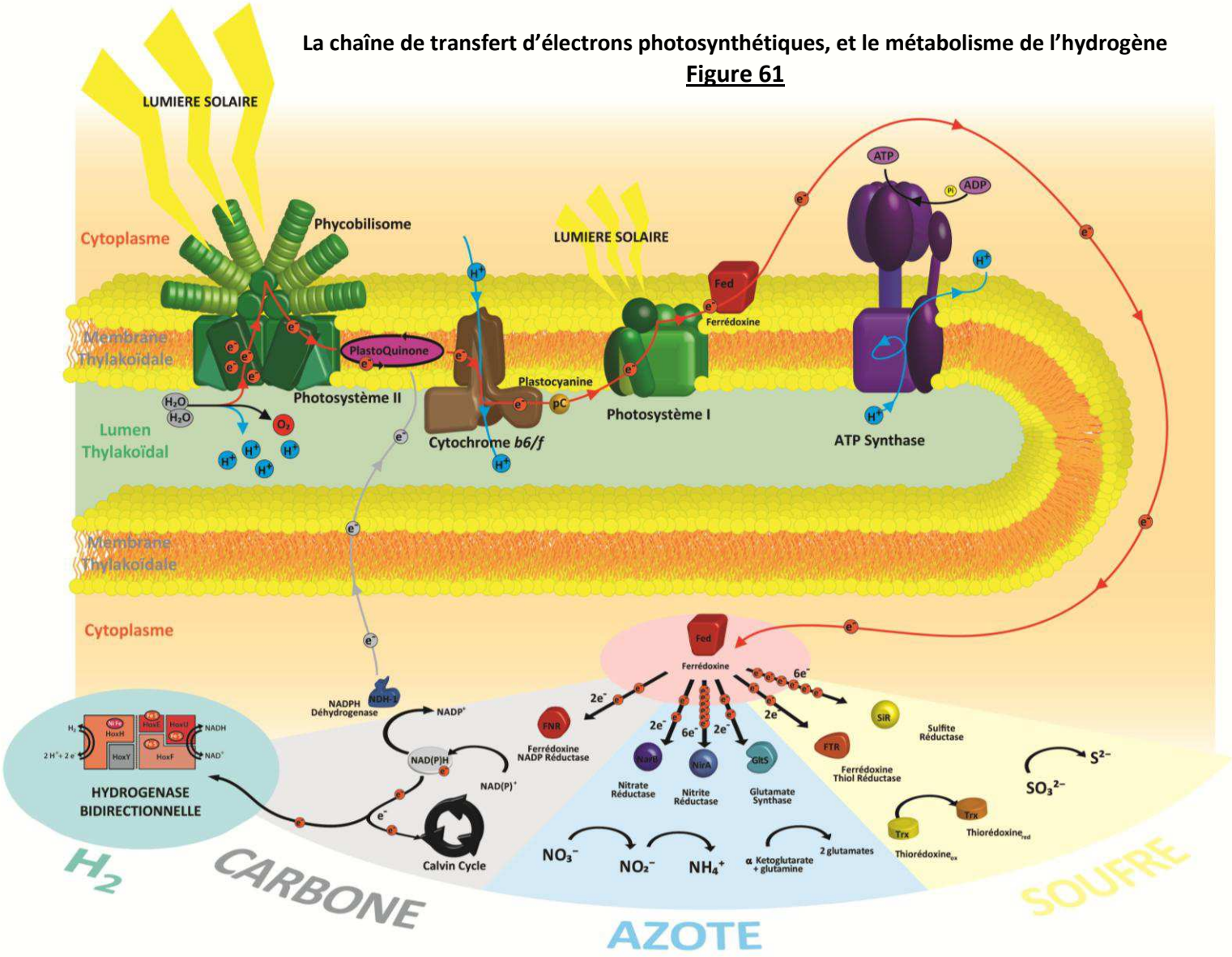
Synechocystis fait partie des quelques cyanobactéries à posséder une hydrogénase bidirectionnelle fonctionnant avec du NAD(P)H, et est donc capable de catalyser une production d'hydrogène sous certaines conditions bien spécifiques et détaillées plus loin.

A première vue, il semble donc que l'hydrogénase de *Synechocystis* s'imbrique en « compétition » avec les voies métaboliques fonctionnant avec le NADPH ou utilisant des accepteurs terminaux d'électrons photosynthétiques. Ainsi le cycle de Calvin, l'assimilation de l'azote et l'homéostasie du soufre sont en compétition avec la production d'hydrogène. La NADH déshydrogénase constitue aussi une forme de compétition puisque son rôle est de permettre au pool de plastoquinones de se maintenir à un niveau rédox acceptable en utilisant le NADPH à cette fin. (En ce sens, il a en effet été prouvé qu'une délétion de NDH1 permettait une production d'hydrogène soutenue pendant 30 minutes en présence de glucose (Cournac et al. 2004).

Il existe peu de connaissances sur le rôle de l'hydrogène dans le métabolisme cyanobactérien et le rôle de l'enzyme et les mécanismes de production ou de consommation d'H_2 sont encore très flous. Cette question sera traitée plus en détails dans le paragraphe suivant.

La chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques, et le métabolisme de l'hydrogène

Figure 61



4- L'hydrogénase bidirectionnelle HoxEFUYH de *Synechocystis*

L'objet de ma thèse est l'étude de la régulation de l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle HoxEFUYH chez *Synechocystis* sp. PCC6803. Cette hydrogénase-[NiFe] appartient au groupe 3d décrit plus tôt dans le chapitre 2 paragraphe 6 et est codée par un opéron de 8 gènes dont 3 sont de fonctions encore inconnues.

Parmi les cyanobactéries, il existe (Chapitre 2 paragraphe 6), deux types d'hydrogénases. Les « uptake » hydrogénases chez les cyanobactéries fixatrices d'azote, ou hydrogénases qui consomment l'H_2 produit par la nitrogénase qui utilise 16 ATP par molécule d'H_2 produite. En l'absence de cette hydrogénase, on obtient une production plus stable de dihydrogène, mais la réaction que catalyse la nitrogénase ne se produit que dans les seules cellules spécialisées, les hétérocystes. La biomasse hétérocysteuse détachée à cette « production d'hydrogène » est donc très faible et hautement demandeuse d'énergie. Par ailleurs les souches filamenteuses produisant de hauts niveaux d'hydrogène par voie nitrogénase, comme certaines *Nodularia*, sont parfois hautement toxiques (Allahverdiyeva et al. 2009). Tous ces éléments font que cette voie n'est pas actuellement la plus intéressante biotechnologiquement.

Le type d'hydrogénase qui est l'objet de ma thèse est le second : celui de l'hydrogénase bidirectionnelle, Hox, pour *Hydrogène oxydation,* capable de catalyser réversiblement la réaction $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$ moyennant la consommation d'un NAD(P)H. Ce type d'hydrogénase a été décrit dans la section 3d des familles d'hydrogénases à Ni-Fe et il est généralement admis qu'elle fonctionnerait dans des voies de bioproduction d'hydrogène de type biophotolyse directe ou indirecte (plus vraisemblablement indirecte car l'hydrogénase est sensible à la production d'oxygène, a priori incompatible avec le schéma de la biophotolyse directe).

Ci-après une présentation plus complète mais toujours non-exhaustive de l'enzyme et de ses particularités

4-1- L'enzyme

La première évocation d'une enzyme partageant des homologies avec une déshydrogénase d'*E.coli* chez *Synechocystis* sp. PCC6803 date de 1996 (Appel et Schulz). Ils traitèrent de l'existence d'une hydrogénase à nickel réduisant le NAD(P) et dont les 2 sous-unités HoxY et HoxH sont apparemment organisées en opéron avec 6 autres gènes les précédant (de fonctions connues ou inconnues, voir détails plus loin).

A l'image des autres enzymes de même fonction connues chez d'autres organismes, l'hydrogénase bidirectionnelle des cyanobactéries fut de prime abord imaginée comme composée de seulement 4 sous-unités, dont HoxFU constituerait la partie diaphorase et HoxYH la partie hydrogénase. Cependant en 2002, les travaux de Schmitz et al. rapportèrent que chez *Synechocystis*, une cinquième sous-unité HoxE copurifiait avec l'hydrogénase active, rattachée à sa partie diaphorase. Suite à ces travaux, d'autres hydrogénases bidirectionnelles furent identifiées avec plus de 4 sous-unités, chez des organismes relativement éloignés comme les bactéries pourpres sulfatoréductrices *Thiocapsa roseopersicina* et al.*lochromatium vinosum* qui possèdent ainsi une hydrogénase bidirectionnelle similaire à celles des cyanobactéries (Rakheli et al. 2004, Long et al. 2007), ou encore *Ralstonia eutropha* qui possède 2 sous-unités HoxI en complément de HoxFUYH.

Table 10

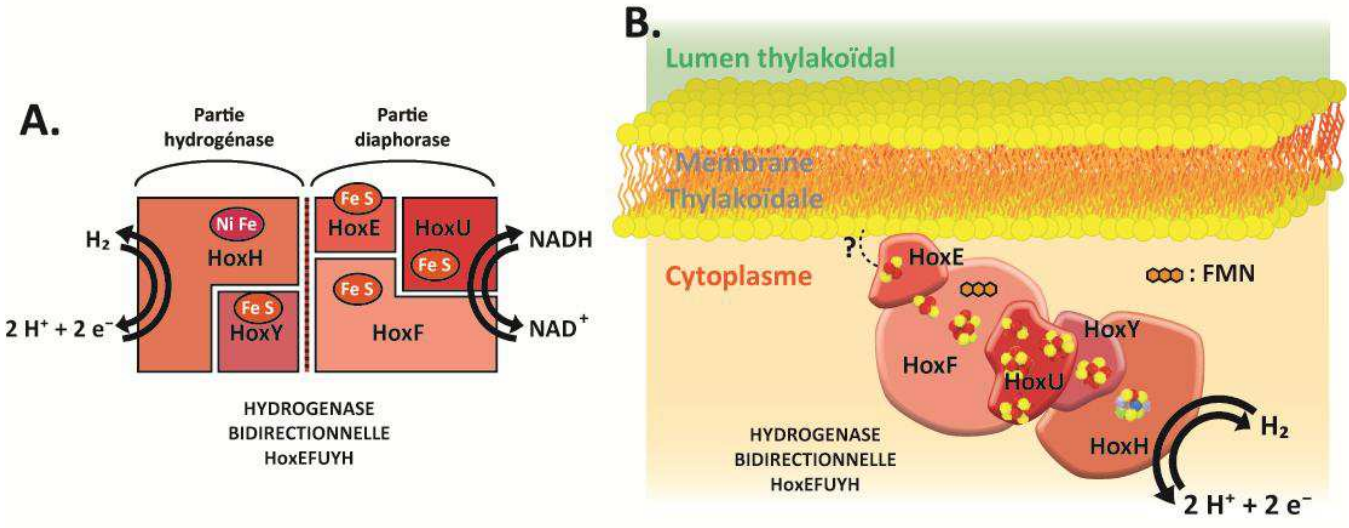
Premières évocations d'une hydrogénase bidirectionnelle chez les cyanobactéries		
Unicellulaires	***Synechocystis sp. PCC 6803***	**Appel et Schulz 1996**
	Gloeocapsa alpicola CALU 743	Sheremetieva et al. 2002
Filamenteuses sans hétérocystes	*Lyngbya majuscula*	Schutz et al. 2004, Leitao et al. 2005
	Arthrospira et *Spirulina* spp.	Zhang et al. 2005a, b
Filamenteuses à hétérocystes	*Nostoc* spp.	Tamagnini et al. 2000, Schutz et al. 2004
		D'après Tamagnini et al. 2007

Ainsi aujourd'hui on sait que l'enzyme HoxEFUYH est une métalloenzyme constituée de 5 sous-unités formant deux parties de fonctions distinctes : une partie diaphorase catalysant la transformation de NAD(P)H en NAD(P)+ et une partie hydrogénase catalysant la réaction $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$. La principale particularité de cette enzyme est d'être réversible, c'est à dire soit de pouvoir produire ou consommer la molécule de dihydrogène de manière *a priori* symétrique en fonction du micro environnement auquel elle est exposée. La partie diaphorase est constituée des 3 sous-unités codées par les gènes *hoxE*, *hoxF* et *hoxU* alors que la partie hydrogénase est constituée des 2 sous-unités codées par *hoxY* et *hoxH* ; HoxH étant la sous-unité siège de la réaction $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$. La deuxième particularité de l'hydrogénase de *Synechocystis* sp. PCC6803 est d'être également non irréversiblement inactivée par l'oxygène

Cette enzyme hétéropentamérique possède de nombreux cofacteurs métalliques permettant le transfert d'électrons et les catalyses chimiques. Ainsi HoxH comporte plusieurs cystéines servant à lier le site actif [Ni-Fe] de l'enzyme, et les 4 autres sous-unités HoxE, HoxF, HoxU et HoxY contiennent divers clusters [Fe-S] également identifiés grâce aux motifs cystéines qu'ils contiennent (Ghirardi et al. 2007). La petite sous-unité HoxY, contiendrait ainsi un site [4Fe-4S]. Les 2 sous-unités HoxF et HoxU forment la partie catalytique de la moitié diaphorase et présenteraient respectivement des motifs pour contenir un site [2Fe-2S] et un site [4Fe-4S]. Bien que l'enzyme ne présente pas de domaine transmembranaire, elle a été plusieurs fois identifiée dans les fractions membranaires et donc considérée comme « faiblement attachée aux membranes ». HoxE serait impliqué dans cet attachement aux membranes, ainsi que dans le transfert d'électrons, puisqu'il présente également un motif pour un site [2Fe-2S] (Ghirardi et al. 2007). De plus, chez *Synechocystis*, HoxEFUYH existerait sous forme de dimère *in vivo* $(HoxEFUYH)_2$ (Schmitz et al. 2002).

Sous-unité	Motifs conservés	Fonction de la sous-unité
HoxE	[2Fe-2S]	Sous-unité d'attachement aux membranes, transfert d'électrons, respiration ?
HoxF	[2Fe-2S], [4Fe-4S], fixation NAD+, fixation flavine mononucléotide (FMN)	Grande sous-unité de la partie diaphorase, transfert d'électrons, respiration ?
HoxU	[2Fe-2S], 3[4Fe-4S]	Petite sous-unité de la partie diaphorase, transfert d'électrons, respiration ?
HoxY	[4Fe-4S]	Petite sous-unité de la partie hydrogénase-[NiFe], transfert d'électrons ?
HoxH	[Ni-Fe]	Grande sous-unité de la partie hydrogénase-[NiFe], site catalytique
		D'après Carrieri et al. 2011

Table 11



Deux vues schématiques de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp. PCC6803
A: Les deux parties de l'hydrogénases. Les clusters FeS et le centre NiFe sont représentés dans leurs sous-unités correspondantes (sans tenir compte du nombre) *D'après Lindblad et al.2008*
B: Autre vue de l'hydrogénase en interaction avec le thylakoïde. Les sites métalliques sont représentés. La sous-unité HoxE est en interaction avec les membranes par un moyen inconnu, la sous-unité HoxF contient 2 sites FeS et un cofacteur FMN (hexagones oranges). La sous unité HoxH ne contient que le site métallique [NiFe]. Code couleur des sphères: jaune = soufre, rouge = fer, bleu = Ni, mauve = oxygène, vert =azote.

Figure 62

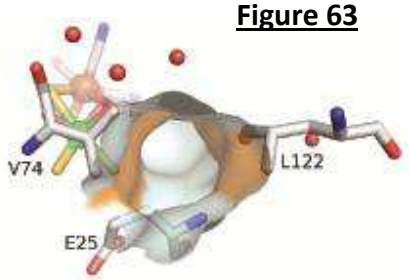
D'après Carrieri et al 2011

Résistance à l'oxygène

Comme il a été évoqué précédemment, les hydrogénases sont des enzymes particulièrement sensibles aux effets du dioxygène qui les inactive durablement.

Chez *Synechocystis* sp. PCC6803 toutefois, et à la différence des hydrogénases de *Chlamydomonas reinhardtii*, l'hydrogénase bidirectionnelle HoxEFUYH n'est pas irréversiblement inactivée par le dioxygène. Cette caractéristique est très intéressante car la sensibilité à l'O_2 de cette enzyme présente actuellement un vrai challenge technologique pour le développement de souches industriellement intéressantes.

Figure 63



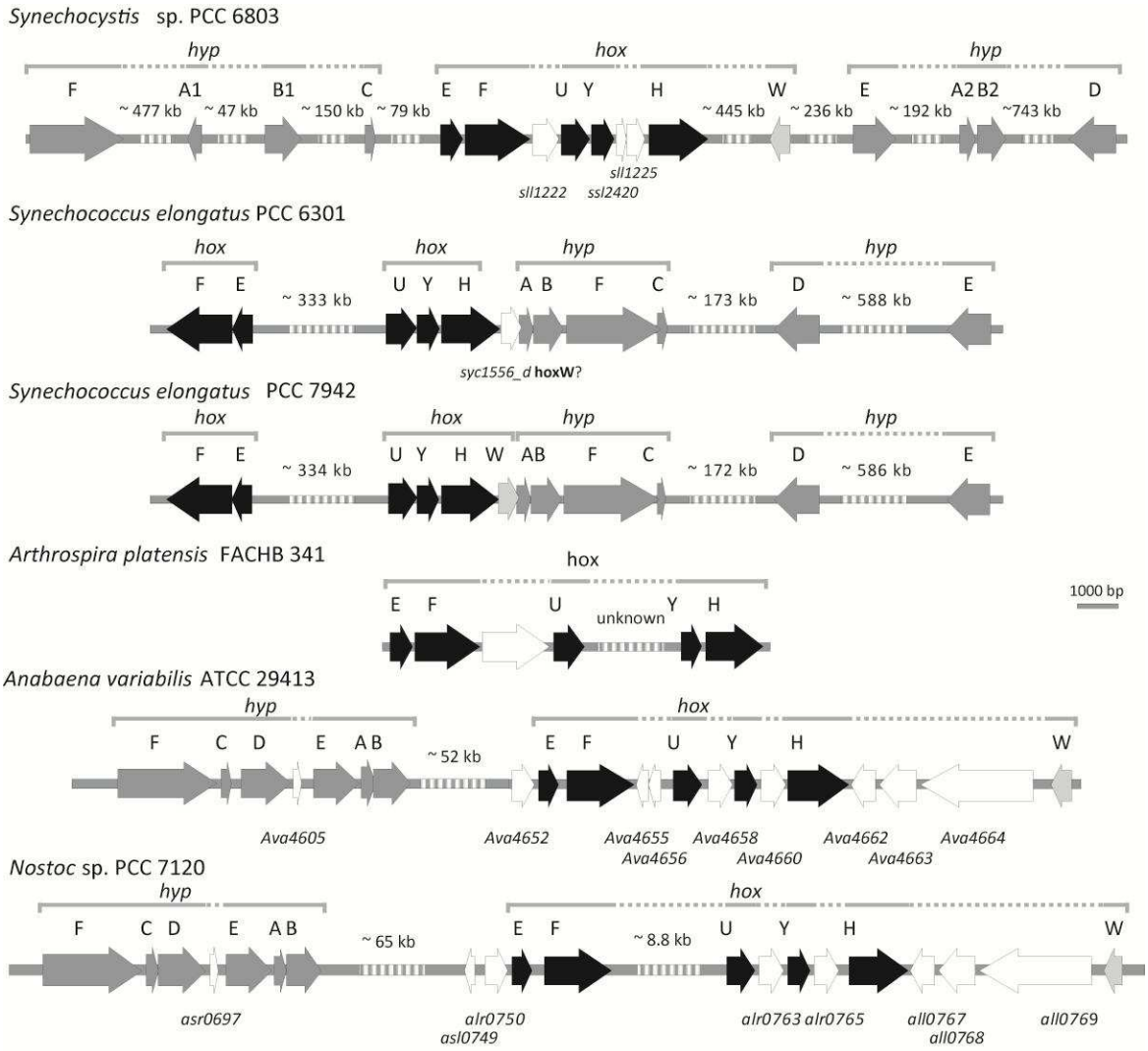
Entrée du canal des gaz de la sous-unité HoxH de *Desulfovibrio fructosovorans*

Plusieurs équipes cherchent à comprendre par quels mécanismes certaines hydrogénases sont plus résistantes que d'autres à l'oxydation tandis que d'autres cherchent à améliorer la résistance de ces souches par évolution dirigée de l'enzyme (problématique se heurtant de plus à la difficulté de développer un crible à haut débit efficace). Il semblerait qu'un canal permettant la circulation des gaz au sein de la sous-unité HoxH ait été identifié et pourrait être le biais par lequel l'oxygène vient inactiver le site actif à Ni-Fe. Les principales pistes suivies à l'heure actuelle pour diminuer artificiellement la sensibilité à l'oxygène de l'enzyme visent à rechercher à boucher ce canal et le rendre davantage imperméable à l'oxygène. Quelques détails supplémentaires sur les mécanismes de l'inactivation et de la réactivation rapide de l'enzyme ont été discuté au chapitre précédent.

4-2- Région génomique de *hox*

Le cluster codant pour l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* PCC6803 a été identifié en 1996. A l'époque, les 2 gènes *hoxY* et *hoxH* ont clairement été identifiés comme portant la fonction hydrogénase dans l'opéron, *hoxF* et *hoxU* participant à la réduction du NAD(P) et le rôle des 4 autres gènes de l'opéron étant inconnu. En 2002 le rôle de HoxE comme 3ème sous-unité de la partie diaphorase de l'enzyme a été révélé (Schmitz et al. 2002). Aujourd'hui, la fonction de trois gènes reste encore à éclaircir.

Cette organisation n'est pas conservée chez toutes les cyanobactéries comme le rapporte l'étude de Tamagnini et al. (2002 et 2007), ce serait même plutôt une exception. Ainsi dans plusieurs cas les 5 gènes *hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY* et *hoxH* sont séparés en deux clusters sur le génome qui ne correspondent souvent pas aux deux parties supposées « autonomes » de l'enzyme. Ainsi 2 gènes sur 3 de la partie diaphorase sont quasi systématiquement à la suite l'un de l'autre (*hoxE* et *hoxF*), alors que le troisième gène *hoxU* est souvent présent en amont des gènes *hoxY* et *hoxH* de la partie hydrogénase. C'est par exemple le cas chez *Synechococcus* sp. PCC7942 où *hoxEF* est éloigné de *hoxUYH*, ce dernier transcrit comportant de plus *hoxW* directement à sa suite (mais éventuellement soumis à un promoteur indépendant de *hoxUYH*) et chez *Synechococcus* sp. PCC6301, où *hoxEF* forment un seul transcrit et *hoxUYH* en forme un second avec *hoxW*, *hypA* et *hypB* (Sjoholm et al. 2007, Bothe et al. 2008.

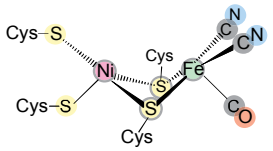


Organisation génomique des complexes hox et hyp de quelques cyanobactéries

D'après Tamagnini et al 2007 et cyanobase

Figure 64

Figure 65



[NiFe]-hydrogenase metallo-cluster.

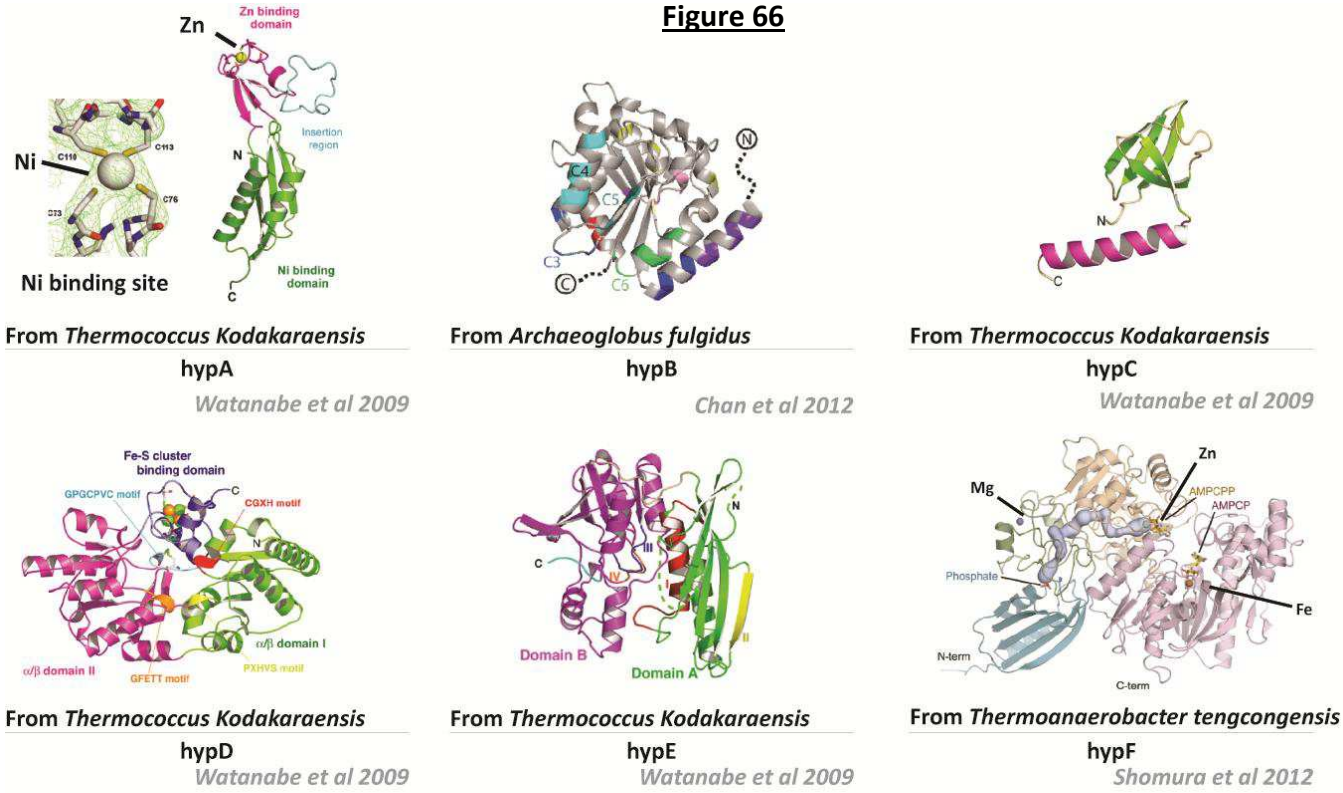
4-3- Assemblage du site [Ni-Fe]

Comme je l'ai évoqué lors de l'introduction générale concernant les hydrogénases à [Ni-Fe], le site catalytique de HoxEFUYH est assemblé grâce aux complexes HypABCDEF. Le détail du processus de maturation n'a pas été décrit chez *Synechocystis* et c'est encore une extrapolation de ce qui est connu chez d'autres organismes possédant des hydrogénases à [Ni-Fe], en particulier *E.coli*.

Pour le détail du processus connu, se référer au paragraphe 1-6-4-2 du chapitre précédent.

La figure suivante illustre les 6 protéines HypABCDEF, dont plusieurs contiennent des centres métalliques.

Figure 66



Le complexe HypABCDEF

HypA coordonne un atome de Zn et un atome de Ni.
HypB contient un site de fixation pour métal qui aide HypA à transférer le Ni à HoxH.
HypC est une petite molécule chaperon qui interagit avec HoxH et HypD pour faciliter l'insertion du site métallique.
HypD contient un site [4Fe-4S] et d'autres cystéines permettant la complexation du site actife [Ni-Fe] à construire.
HypE subit une cyanation par HypF de sa cystéine, puis transfère ce ligand CN au futur Fe du site [NiFe] complexé sur HypC-HypD.
HypF fabrique les ligands CN et CO du Fe à partir de carbamoyl phosphate. Il contient un atome de Mg, un de Fe et un de Zn.

En 2006, l'équipe d'Hoffman et al. a entrepris une étude du complexe *hyp* de *Synechocystis* sp. PCC6803. Il s'avère que chez cette cyanobactérie 8 gènes ont été identifiés, les gènes *hypCDEF* de *E.coli* n'ont qu'un seul homologue cyanobactérien, tandis que *hypA* et *hypB* en ont deux chacun : *hypA1*, *hypA2, hypB1* et *hypB2*. Dans leur étude, ils ont délété séparément chacun des 8 gènes chez *Synechocystis* et ont pu observer la disparition de l'activité hydrogénase lors de la délétion des 6 gènes *hypA1*, *hypB1*, hypC, *hypD*, *hypE* et *hypf* ; la délétion de *hypA2* et *hypB2* n'ayant en rien modifié l'activité hydrogénase sauvage. Ils concluent que les 6 premiers gènes sont effectivement ceux impliqués dans la maturation de l'hydrogénase de *Synechocystis* et que les deux gènes *hypA2* et *hypB2* pourraient être impliqués dans la maturation du site métallique d'une autre enzyme, une arginase, dont le gène est située juste en amont de ces derniers (Hoffman et al. 2006).

Ces travaux ont également permis d'identifier l'homologue de la protéase *hycI* de *E.coli* qui clive l'extrémité C-terminale de HoxH lorsque le site NiFe est en place. Chez *Synechocystis* il s'agirait de HoxW (*slr1876*), dont la délétion de l'organisme annule également toute activité hydrogénase (Hoffman et al. 2006)

4-4- Transcription de l'opéron *hoxEFUYH*

4-4-1- L'ARN messager

Chez *Synechocystis* PCC6803, un seul transcrit polycistronique (de taille indéterminée) en conditions standards de croissance a été décrit jusqu'à présent. Diverse études depuis 2005 tendent à prouver ce fait :

- Les travaux de Oliveira et Lindblad en 2005 ont permis de montrer qu'il existait un transcrit couvrant toute la zone de *hoxE* à *hoxH*. Ils ont réalisé une RT-PCR avec un ADN amorce partant de la fin du gène *hoxH*, le produit qu'ils ont obtenu a été analysé par PCR et les 5 gènes *hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY* et *hoxH* ont pu être amplifiés à partir du produit de la RT-PCR (confirmé par northern blot). Ce résultat démontre l'existence d'un ARN messager couvrant l'ensemble du cluster, mais n'exclut cependant pas la possibilité de plusieurs amplicats de RT-PCR possible à partir de leur amorce, et dont un seulement couvrirait la totalité l'opéron.

Un seul start de transcription à l'opéron en amont de *hoxE*, exactement 168 paires de bases en amont de l'ATG de *hoxE*, a été mis en évidence dans leur travaux.

Ils concluent sur l'existence d'un ARN messager couvrant les 8 gènes, mais n'excluent pas que d'autres ARN puissent exister sans qu'ils aient pu le détecter. L'ensemble de leur manipulations ont été effectuées en conditions standard de croissance avec bullage d'air.

- Les travaux d'une autre équipe (Gutekunst et al. 2005), montrent des résultats similaires:

Un seul start de transcription, au même emplacement (168 paires de bases en amont de l'ATG de *hoxE*), à partir d'une amorce interne au gène *hoxE*, et d'ARN issus d'une culture de *Synechocystis* cultivée en conditions de photoautotrophie (conditions standards).

En utilisant la possibilité d'amplifier par RT-PCR des fragments d'ADN qui, de proche en proche, recouvrent l'ensemble du cluster; et en utilisant également le fait que remplacer la zone 5' non traduite en amont de *hoxE* par une cassette de résistance à un antibiotique comportant un terminateur de transcription permet d'abolir toute activité hydrogénase du mutant résultant, ils concluent qu'un seul ARN messager ne peut exister, et à partir du seul start de transcription qu'ils ont identifié, dans les conditions standard de croissance.

- Plus récemment, Mitschke et al. 2010 ont réalisé une cartographie à grande échelle de tous les sites d'initiation de transcription des gènes de *Synechocystis*. Ils trouvent également un seul site d'initiation de la transcription 168 paires de base en amont de l'ATG de *hoxE*, cette fois pour l'ensemble de l'opéron *hoxEFUYH*, confirmant les travaux des 2 équipes précédentes. Cependant on notera encore une fois que l'étude a été effectuée sur des ARN purifiés d'une souche cultivée en conditions standard de croissance.

Les conclusions des 3 équipes sont ainsi concordantes mais non suffisantes pour exclure totalement la possibilité d'une expression conditionnelle d'ARN messager interne uniquement sous certaines conditions qu'ils n'ont pas imaginer tester. Par exemple, étudier les conditions où l'activité hydrogénase augmente pourrait indiquer un autre résultat.

Pour les arguments qui plaideraient en faveur de l'existence de transcrits additionnels, on peut relever que chez d'autres organismes proches, l'opéron *hoxEFUYH* n'est que rarement organisé en un seul cluster comme chez *Synechocystis* (voir paraphe précédent). Par exemple, chez *Nostoc* sp. PCC 7120 (Sjoholm et al. 2007, Tamagnini et al. 2007) une région génomique contient les gènes *alr0750*, *hoxE* et *hoxF* arrangés en un premier opéron et 8,8 kilobases, et plus loin on trouve les autres gènes: *hoxU*, *alr0763*, *hoxY*, *alr0765* et *hoxH*. Les auteurs rapportent qu'il existerait au moins trois transcrits différents pour cette structure clustérisée : un transcrit couvrant les 5 gènes (*hoxU*, *alr0763*, *hoxY*, *alr0765* et *hoxH*), un transcrit couvrant les 3 premiers et enfin un autre couvrant les 2 derniers (Sjoholm et al. 2007), ils rapportent cependant que le transcrit majoritaire dans les conditions qu'ils ont testées serait le plus grand. Il est intéressant de noter que chez *Nostoc* sp. PCC7120 les gènes codant pour la partie diaphorase sont éparpillés dans le génome : les gènes *hoxE* et *hoxF* sont effectivement séparés de *hoxU* et ne sont pas corégulés. A l'inverse on remarque chez cet organisme que les gènes *hypABCDEF* qui participent à l'assemblage du site [Ni-Fe] sont clustérisés et non éparpillés sur le génome comme c'est le cas chez *Synechocystis*.

Le paragraphe suivant illustre également quelques exemples de transcription asymétrique des 2 parties de HoxEFUYH dans certaines conditions de culture, remettant éventuellement en question l'idée d'un seul et unique transcrit.

4-4-2- Le niveau de transcription

A la différence des hydrogénases bactériennes, l'enzyme Hox des cyanobactéries s'exprime à la fois en conditions aérobies et anaérobies (Appel et al. 2000 ; Gutekunst et al. 2005), c'est assez surprenant quand on sait que Hox est inhibée par l'oxygène. Quoi qu'il en soit, davantage de transcrits ont été mesurés en conditions de microaérobie ou d'anaérobie chez *Synechocystis* sp PCC6803 et *Nostoc* sp. PCC 7120 (Tamagnini et al. 2002, Kiss et al. 2009, Sjoholm et al. 2007) : La quantité de transcrits *hoxEFUYH* étant multipliée par 5-6 dans le cas d'une microaérobie lumineuse, et *hoxEF* augmentant encore jusqu'à 10-12 fois plus en microaérobie sombre ou microaérobie couplée d'une inhibition chimique du transfert d'électrons au niveau du cytochrome *b6/f (Kiss et al. 2009).*

Le niveau de transcrits semble également conditionné par la source d'azote dont dispose les cellules, ainsi *Nostoc muscorum* CCAP1453/12 transcrit constitutivement les gènes *hox*, par contre, chez *Anabaena variabilis*, la croissance en conditions de fixation de l'azote induit une augmentation de la transcription de *hoxYH* à la fois dans les hétérocystes et ses cellules végétatives (Boisson et al. 2000) ; il semblerait donc que dans ces conditions l'hydrogénase serve plutôt à la consommation de l'hydrogène.

De manière intéressante, il a été aussi démontré que l'abondance des transcrits *hox* à la fois de *Synechocystis* sp. PCC6803 et de *Synechococcus elongatus* suivent un rythme circadien, avec une augmentation à la lumière et une diminution à l'obscurité. De plus, une augmentation de la quantité des ARN a été observée en condition de forte lumière (Kiss et al. 2009). Simultanément, ils ont montré une diminution des transcrits *hox* lorsque le cycle de Calvin était inhibé par le glycolaldéhyde et une réaugmentation par inhibition additionnelle de la photosynthèse (avec du DCMU ou du DBMIB), suggérant un rôle de Hox dans la régulation des niveaux redox lors de la photosynthèse et de la fixation du carbone afin d'éviter les sur-réductions des transporteurs redox. La même équipe a aussi démontré que lorsque *Synechocystis* sp. PCC6803 était incubée dans l'obscurité, ou lorsque le transport d'électron était inhibé, les transcrits *hoxEF* augmentent davantage que les transcrits *hoxUYH.*

Comme suggéré dans la revue de Carrieri et al. 2011, si des transcrits différents s'accumulent différemment lorsque les conditions environnementales varient alors que le cluster est a priori exprimé comme un opéron polycistronique, cela peut être dû à des variations de stabilité de l'ARN messager.

En 2010, l'équipe de Mitschke et al. a également mis en évidence le rôle de deux ARN non-codants qui réguleraient fortement l'expression de Hox : un premier ARN fortement induit en conditions obscures situé en amont de *hoxE*, et un second ARN en aval de *hoxH*, lui fortement induit en conditions lumineuses. Un troisième ARN non codant plus petit existerait aussi et chevaucherait celui en amont de *hoxE*. Nous le verrons plus loin en guise d'informations complémentaires, mais l'accumulation de ces 2 ARNs non codants sont également dépendants du régulateur transcriptionnel AbrB2.

4-4-3- Une régulation traductionnelle?

L'ARNm *hox* pourrait subir une régulation traductionnelle, mais à ce jour aucune étude n'a été menée sur ce sujet. Ainsi, Il y a en effet de longs espaces entre chacune des 8 ORFS de l'opéron qui pourraient être cible de RNAses ou de différentes protéines qui inhiberaient ou favoriseraient la traduction.

A ce jour, les études ont porté uniquement sur le niveau de transcrits *hox* et parfois sur l'activité hydrogénase finale. Aucune n'a étudié l'accumulation des protéines Hox. Rien n'indique que le niveau de transcrits soit directement proportionnel à la quantité d'enzyme active dans la cellule, et dans le cas de l'hydrogénase bidirectionnelle, la quantité des chaperonnes Hyp est un élément déterminant de l'assemblage de la protéine Hox non mature. Parallèlement à cette régulation au niveau de l'assemblage, une régulation traductionnelle pourrait compenser des accumulations de transcrits afin de maintenir un meilleur contrôle sur le niveau d'hydrogénase dans la cellule, et inversement, une dégradation plus ou moins rapide des peptides pourrait se produire en fonction des conditions environnementales sans que nous en soupçonnions à ce jour l'importance.

Un schéma résumant ces différentes notions de niveaux de régulation sera apportée au prochain chapitre.

4-4-4- Les facteurs impliqués dans la transcription de l'opéron *hox*

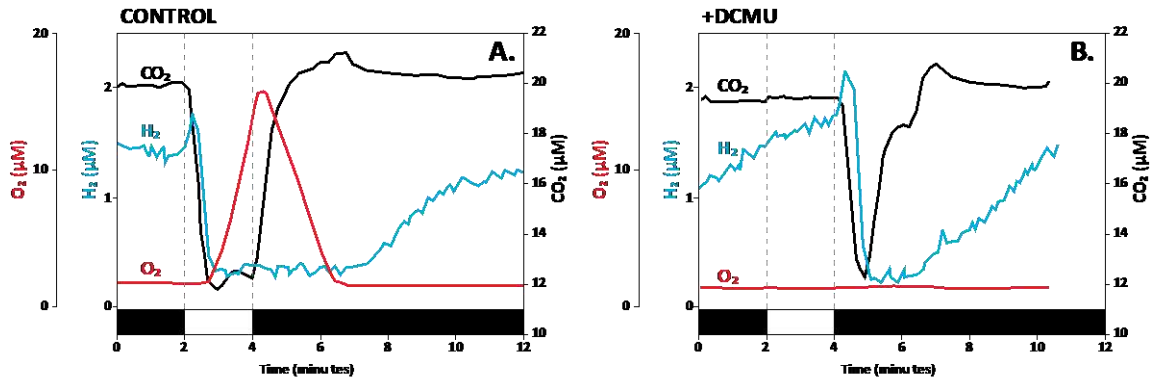
A ce jour, deux régulateurs transcriptionnels ont été décrits comme interagissant avec la région amont de *hoxE*. Ces deux facteurs transcriptionnels, LexA et AbrB1, ont été décrits comme influant positivement sur l'activité hydrogénase (Gutekunst et al. 2005, Oliveira et Lindblad 2005, Oliveira et Lindblad 2008).

Le chapitre 4 traitera plus en profondeur de ces 2 régulateurs transcriptionnels, des superfamilles auxquelles ils appartiennent et de ce qui est connu quant à leur rôle sur l'ensemble du métabolisme de *Synechocystis*.

4-4-5- Fonctionnement de l'hydrogénase de *Synechocystis*

Cournac et al. 2004 ont décrit la production d'hydrogène chez *Synechocystis*. Lorsque les cellules sont soumises à une anaérobie à l'obscurité par bullage d'argon, la production d'H_2, mesurée par un spectromètre de masse, démarre et se stabilise après réactivation de l'enzyme (qui était inactivée par l'O_2). Par passage en phase lumineuse, le niveau d'H_2 mesuré subit une brève impulsion rapidement résorbée (une trentaine de secondes) et lorsque l'H_2 est entièrement consommé, la production d'O_2 démarre. Leurs travaux indiquent que l'enzyme n'est pas immédiatement inactivée à cet instant précis mais plus tard. Après rebasculement à l'obscurité, la production d'H_2 doit attendre que le niveau d'O_2 redevienne nul (environ 2 minutes) et que l'enzyme se réactive (environ une minute) pour redémarrer.

Figure 67



Mesure par spectrométrie de masse d'H_2, O_2 et CO_2 pendant une transition obscurité-lumière-obscurité d'une *Synechocystis* sauvage - ef et du DCMU

A. 10µg de Chl par mL de cellules de Synechocystis ont été préincubées dans l'obscurité anaérobiquement dans la chambre de mesure du spectromètre jusqu'à voir une production d'H_2. Les cellules ont été éclairées brièvement (2 minutes) afin de voir varier les niveaux de H_2, O_2 et CO_2. **B.** comme A. mais avec 75µM de DCMU, un inhibiteur du PSII. Les périodes obscures sont représentées sur l'axe x par une barre noire, et la période lumineuse par une barre blanche.

D'après Cournac et al 2004

Une même manipulation menée avec l'inhibiteur du PSII DCMU empêche toute production d'oxygène en phase lumineuse, le profil de l'hydrogène suit cependant le même profil : une brève impulsion suivie d'une rapide consommation de tout l'H_2. Par basculement consécutif à l'obscurité, la production d'H_2 redémarre instantanément, l'absence d'O_2 n'ayant pas inhibé l'enzyme.

Cette production d'H_2 transitoire est encore mal comprise, et d'autres paramètres comme par exemple la carence en soufre sont favorables à cette production d'hydrogène (Zhang et al.2008).

4-4-6- Bilan sur l'hydrogénase de *Synechocystis*

Résumé des paragraphes précédents :

L'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* s'exprime à partir d'un opéron octacistronique comportant les 5 gènes *hox* E, F, U, Y et H ainsi que 3 gènes de fonctions inconnues. Il existe au moins un ARN messager comportant ces 8 gènes, dont l'expression est positivement régulée par au moins deux régulateurs transcriptomiques, mais des expressions de parties de l'opéron dans certaines conditions ne sont pas exclues. La stabilité de l'ARNm pourrait également faire l'objet d'une régulation post transcriptionnelle (ARN non-codants ou autres facteurs protéiques inconnus qui en modifieraient la stabilité).

Les 2 parties de l'hydrogénase, diaphorase (HoxEFU) et hydrogénase (HoxYH), comportent plusieurs centre Fe-S différents qui doivent nécessairement être assemblés par des protéines mais qui sont encore inconnues. Le centre [NiFe] de HoxH est assemblé par le complexe $HypA_1B_1CDEF$, dont les 6 gènes sont dispersés sur le génome. Finalement, l'extrémité C-terminale de HoxH est clivée par la protéase HoxW, finissant l'assemblage de l'enzyme.

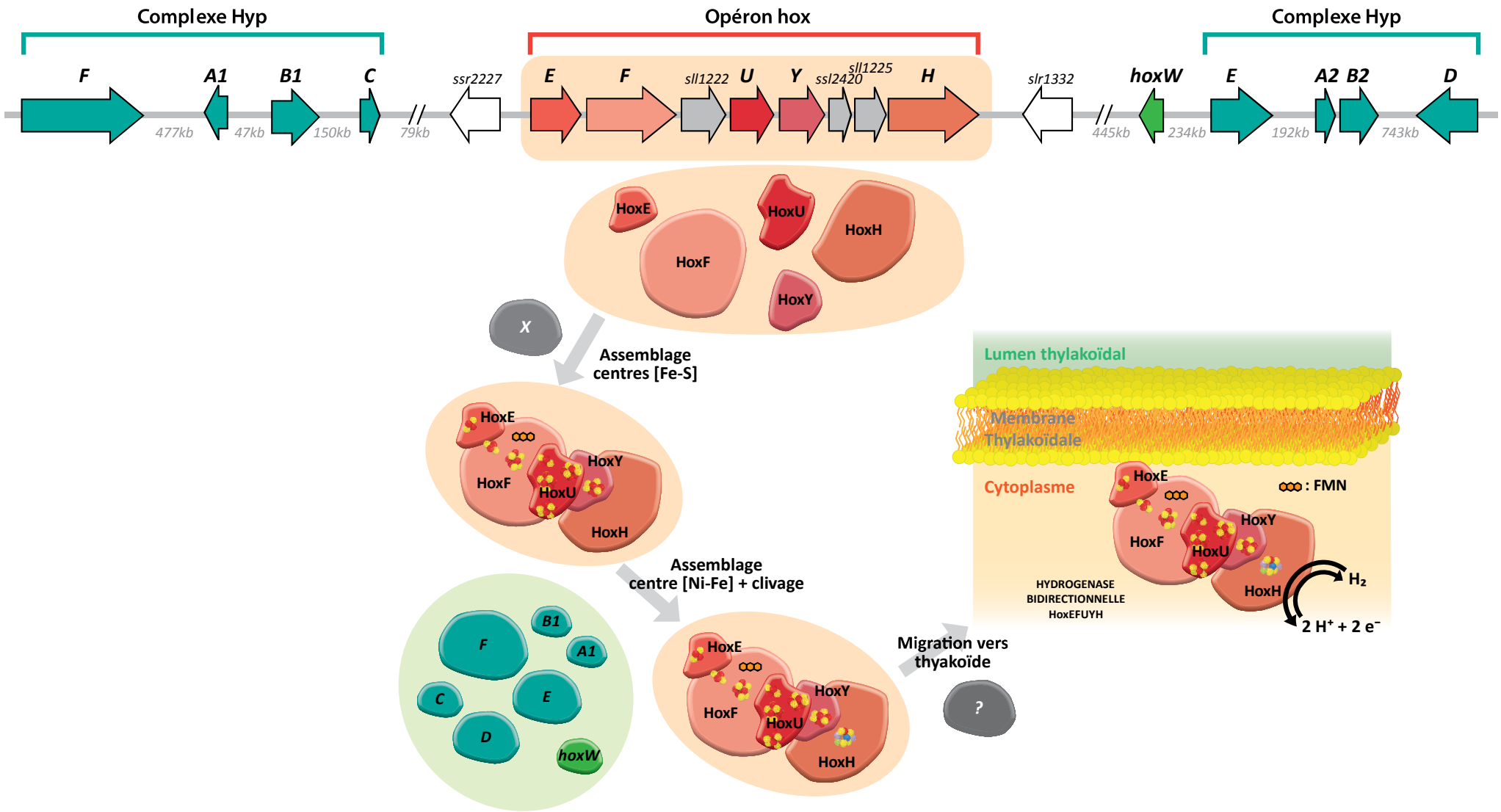
In vivo, l'hydrogénase bidirectionnelle a été vue sous forme d'un dimère $(HoxEFUYH)_2$ faiblement relié aux membranes thylakoïdales. Cette liaison serait hypothétiquement réalisée grâce à la sous-unité HoxE qui interagirait avec une protéine membranaire du thylakoïde.

La sous-unité HoxF réalise la réaction réversible : $NAD(P)^+ + H^+ + 2e^- \leftrightarrow NAD(P)H$

La sous-unité HoxH réalise la réaction réversible : $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$

Figure 68

Assemblage de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*
Position des gènes sur le chromosome et rôles des unités d'assemblage



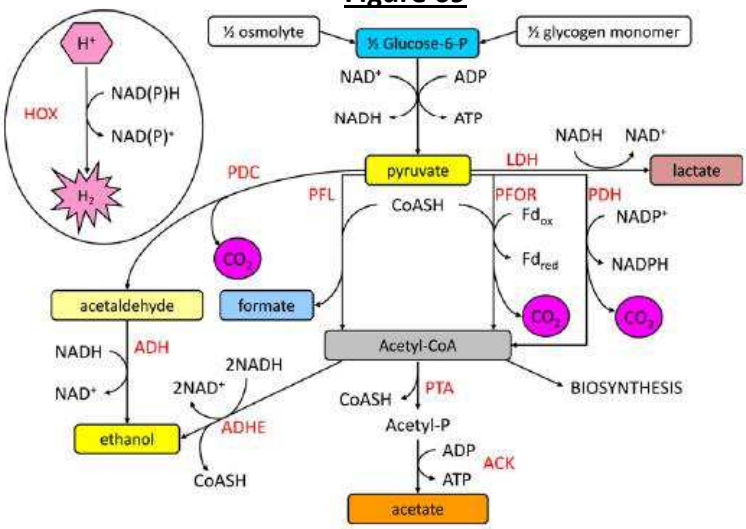
4-5- Rôle biologique

Connaître le rôle d'une enzyme chez un organisme particulier ne signifie pas toujours que celui-ci est partagé chez tous les organismes où on peut trouver un homologue. De même, un rôle apparent découvert sous certaines conditions peut en réalité n'être qu'une incidence du rôle véritable, encore inconnu, car la condition la plus critique n'a pas encore été expérimentée. C'est ainsi que la génomique et l'analyse des conditions naturelles métaboliques des organismes analysés peut aider, dans une première approche, à proposer un rôle à certaines enzymes.

4-5-1- Les rôles supposés

Historiquement, de nombreux rôles ont été attribués à l'hydrogénase bidirectionnelle, souvent suite à des observations ponctuelles.

Figure 69



Assistance à la fermentation

Ainsi, quand il a été remarqué que les cyanobactéries fermentaires possédant une hydrogénase bidirectionnelle produisaient de l'hydrogène simultanément au processus de fermentation, ils proposèrent que Hox permettrait ainsi de régénérer du $NADP^+$ à partir du NADPH et que ceci leur permettrait de rééquilibrer l'homéostasie rédox des cellules, perturbée par l'accumulation des produits de la fermentation (Carrieri et al. 2011). Cette hypothèse étant nettement supportée par le comportement de la cyanobactérie *Gloeocapsa alpicola* CALU743, fermentaire à haute productivité en hydrogène mais ne possédant pas de nitrogénase. Cette cyanobactérie produit de grandes quantités d'hydrogène lors de la fermentation, mais aucun des produits classiques de la consommation du NADPH par les enzymes classiques (éthanol et lactate) laissant ainsi penser que la cellule ne peut pas régénérer son pool de $NADP^+$ autrement qu'en laissant l'hydrogénase bidirectionnelle oxyder le NADPH. De plus, le fait que les transcrits *hox* soient également induits en condition d'anaérobie supporte aussi cette hypothèse, mais cette augmentation des transcrits n'est pas toujours suivie d'une augmentation effective de l'activité hydrogénase dans ces conditions (Appel et al. 2000), incitant à penser que l'augmentation du niveau de transcrits servirait plutôt à compenser une instabilité de l'hydrogénase dans ces conditions plutôt qu'un besoin supérieur de celle-ci. L'hypothèse n'est également pas applicable pour les cyanobactéries non-fermentaires et possédant l'hydrogénase bidirectionnelle.

Gestion du pool de NAD(P)H

Il a également été observé chez *Synechocystis* que, lors d'un passage obscurité à lumière, la photosynthèse déclenche une courte production d'H_2, suivie immédiatement après d'une consommation de ce même H_2, parallèle au début de la fixation du CO_2 et préliminaire à la production d'O_2 (Cournac et al. 2004). Il semblerait ainsi que Hox ait un rôle dans l'initiation d'une nouvelle phase de croissance : lors d'une transition lumière-obscurité, elle produirait d'abord de l'H_2 puis le consommerait pour réduire le $NADP^+$ en NADPH afin d'assister la fixation du CO_2. Fixation du CO_2 qui s'initie difficilement quand les pools de transporteurs électroniques s'oxydent facilement comme c'est le cas dans ce type de transitions lumineuses.

Les travaux rapportés par Ananyev et al. en 2008 évoquent quant à eux que « les conditions physiologiques et nutritionnelles qui permettent la croissance photoautotrophique optimale sont souvent non-optimales pour la production d'hydrogène », effectivement, les facteurs qui élèvent le ratio NADH/NAD+ favorisent la production d'hydrogène mais ne sont pas favorables à la croissance. Cette remarque est supportée par des résultats sur *Synechococcus* sp. PCC7002 (Carrieri et al. 2009): ils rapportent qu'un mutant de lactate déshydrogénase (Δ*ldh*), enzyme consommatrice de NADH pendant la fermentation (voir Fig.69), produit 5 fois plus d'hydrogène par équivalent carbohydrate que la souche sauvage, phénomène corrélé avec un ratio $NADH/NAD^+$ 2 fois supérieur.

Il se pourrait ainsi que le rôle de l'hydrogénase bidirectionnelle soit, plus généralement, de maintenir le ratio $NADH/NAD^+$ à un niveau équilibré pour la cellule et de contrebalancer les fluctuations de ce ratio en réponse aux changements environnementaux abrupts qu'elle peut rencontrer.

L'hydrogénase, valve à électron pendant la photosynthèse

Cette idée de valve à électron a tout d'abord été suggérée par Appel et Schulz en 1998 et 2000. Selon eux, quand un excès d'électrons est ponctuellement généré par la photosynthèse, l'hydrogénase Hox les utilise pour générer du dihydrogène, comme un siphon alternatif d'électron.

Ils ont ainsi relevé qu'un mutant *hoxH-* (délété de la sous-unité hoxH) aurait (au niveau transcriptionnel) une augmentation du ratio PSII/PSI et une diminution du ratio phycobilisome/chlorophylle en comparaison de la souche sauvage (Appel et al. 2000). Leur équipe a également montré que la vitesse d'oxydation et de réduction du P700 était sensiblement diminuée, suggérant ainsi une sorte d'interaction entre Hox et la machinerie photosynthétique.

Comme évoqué plus tôt Hox est exprimée à la fois en condition d'aérobie ou d'anaérobie, et pourtant elle n'est pas censée être active en présence d'oxygène (rappelons que l'inactivation de Hox par l'O_2 est transitoire et non définitive chez *Synechocystis* sp. PCC6803). La raison de la présence de la protéine dans les conditions photosynthétiques doit donc être élucidée. Il semble probable que l'hydrogénase ait un rôle dans l'évacuation de l'excès électronique ou l'ajustement de la balance de rédox durant la photosynthèse, autrement dit un rôle de valve à électrons. Cependant, il reste à designer une expérience qui en apporterait la preuve et montrerait l'avantage physiologique d'exprimer Hox durant la photosynthèse.

L'hydrogénase, un régulateur rédox

La présence de cette enzyme dans seulement certaines cyanobactéries et pas dans toutes, sous-tend le fait que cette dernière confère un avantage évolutif dans des conditions environnementales spécifiques. Son côté « bidirectionnel » laisse penser qu'elle pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie redox de la cellule, notamment d'empêcher un niveau de $NAD(P)H/NAD(P)^+$ trop élevé en conditions microoxique ou anaérobique, ou de permettre d'augmenter ce ratio lorsqu'il est trop bas et que la cellule dispose d'H_2.

Un avantage évolutif possible à la possession de Hox pourrait être que la cellule soumise à une trop grande quantité de NAD(P)H, pourrait diminuer ce pool en l'oxydant au prix de protons seulement, et non au prix de substrats carbonés. Cet avantage évolutif serait rencontré lorsque les cellules se trouveraient en conditions microaérobiques ou anaérobiques et ne pourraient donc pas disposer de l'accepteur traditionnel des électrons de la respiration : l'O_2 (Cependant on peut noter qu'aucune cyanobactérie connue n'est capable de réaliser de respiration anaérobique (avec un autre accepteur d'électrons que l'O_2)). Les cellules n'auraient pas alors à sacrifier une molécule carbonée qu'elles auraient dû préalablement fixer au prix d'ATP, ni à l'excréter. La molécule d'hydrogène diffuse

effectivement beaucoup plus facilement hors des cellules et membranes que des acides organiques ou des alcools. (Carrieri et al. 2011)

Par ailleurs, l'état rédox de la cellule est susceptible de varier beaucoup plus rapidement que la vitesse de diffusion du dihydrogène. Ainsi on peut imaginer que la réversibilité de l'hydrogénase bidirectionnelle pourrait permettre d'exploiter l'hydrogène gazeux dissout comme réserve d'électrons ou de protons, particulièrement lors de changement abrupts comme des transitions de lumière à obscurité.

On peut également rappeler à ce niveau les travaux de Cournac et al. 2004 qui ont prouvé qu'en l'absence du complexe NdhB, qui sert à réduire le pool de plastoquinones, au niveau du PSII, éventuellement suroxydé durant la photosynthèse en consommant du NADPH, *Synechocystis* était capable de soutenir une production continue d'hydrogène pendant près de 30 minutes en présence de glucose. Ils ont montré que l'hydrogénase assure la réduction de protons (et donc la production d'hydrogène) lorsque le pool de NAD(P) de *Synechocystis* est réduit à plus de 99,9%, phénomène n'arrivant que dans certaines conditions particulières : dans les conditions standard il ne serait réduit qu'aux environs de 50% d'après Cooley et Vermaas 2001. Un mutant ne contenant plus l'enzyme NdhB présente ainsi un pool de NADP réduit à 100% (il y a environ 10 fois plus de NADP que de NAD, réduit à 70%, chez *Synechocystis*, Cooley et Vermaas 2001) ce taux permet à l'hydrogénase de fonctionner afin d'évacuer cet excès de pouvoir réducteur. La production d'H_2 qu'il obtiennent dans le mutant M55 ($NdhB^-$) dure quelques minutes, et plus longtemps encore lorsqu'ils ajoutent du glucose qui aiderait à maintenir le niveau de réduction du NADP très haut et également à inhiber légèrement la production d'O_2 et donc d'éviter l'inactivation de l'hydrogénase.

Ces résultats montrent encore l'importance de l'hydrogénase bidirectionnelle dans le maintien du statut rédox de la cellule lorsque celle-ci se trouve dans des situations métaboliquement dangereuses.

Le paragraphe suivant essaye d'apporter d'autres éléments de réponse en éclairant la question sous un angle différent : comprendre le rôle de l'hydrogénase en fonction de l'environnement des cyanobactéries qui la portent .

4-5-2- Un lien entre environnement et fonction?

Cette hydrogénase est loin d'être largement répandue parmi les cyanobactéries, en effet, ce serait même plutôt l'inverse puisque moins de la moitié des cyanobactéries recensées et séquencées en présentent une (voir Fig.70). Vouloir extrapoler sur son rôle par une généralisation sur les environnements où on la trouve est donc encore un peu hasardeux étant donné le faible nombre de cyanobactéries connues et présentant une activité hydrogénase.

Actuellement, la seule constatation est qu'aucune cyanobactérie de haute mer dont le génome a été séquencé ne possède d'hydrogénase bidirectionnelle.

Ce constat pourrait s'expliquer par l'absence de besoin d'une fonction hydrogénase chez ces organismes, mais pas nécessairement. En effet, la première interprétation de cette répartition de Hox pourrait être que les conditions environnementales où l'hydrogénase est importante ne seraient que très rarement rencontrées en haute mer. Par exemple, le niveau d'oxygène dissout en haute mer ne descend presque jamais sous 200 µM (Carrieri et al. 2011). En effet les variations du milieu marin sont rarement aussi fluctuantes en comparaison de mangroves, côtes soumises à de fortes marées, étangs ou encore de lacs et rivières d'eau douce où l'eutrophisation peut se produire fréquemment. Ainsi, en haute mer, des conditions variant peu induisent peu de stress et moins de besoin de s'adapter (un génome plus petit est souvent caractéristique de ces cyanobactéries) ou d'évacuer des électrons. Cependant, ce premier éclairage possible se heurte à une autre interprétation : le fait que les disponibilités en métaux (Fe et Ni) en haute mer soient relativement plus faibles qu'ailleurs pourrait avoir induit ces organismes à développer une fonction qu'assurait l'hydrogénase bidirectionnelle mais par le biais d'une autre enzyme encore inconnue. A l'image des flavodoxines, enzymes non métalliques, qui assurent le rôle de ferrédoxines, enzymes à fer, lorsque l'organisme connait une carence prolongée en Fer. Quoi qu'il en soit aucune hydrogénase bidirectionnelle n'a été trouvée à ce jour chez des cyanobactéries « marines ».

Espèce	Lieu d'isolation	Ordre	N_2	H_2
Gloeobacter violaceus PCC 7421	Calcereous rock in Switzerland	C	-	-
Thermosynechococcus elongatus BP-1	Beppu hot spring in Japan	C	-	-
Acaryochloris marina MBIC11017	Symbiotic ; in coral in Palau republic	C	+	+
Anabaena variabilis ATCC 29413	Freshwater sewage oxidation pond	N	+	+
Nostoc punctiforme PCC 73102	symbiosis with cycad Macrozamia	N	+	-
Nostoc sp. PCC7120	Fresh water USA	N	+	+
Nostoc azollae 0708	Water fern Azolla filiculoides	N	+	-
Arthrospira maxima	Alkaline soda lakes East Africa	O	-	+
Trichodesmium erythraeum ISM101	Coastal waters, North Carolina USA	O	+	-
Microcystis aeruginosa NIES-843	Lake Kasumigaura in Japan	C	+	+
Cyanothece sp. ATCC51142	Intertidal ares in Texas	C	+	+
Cyanothece sp. PCC 7424	Rice fields in Senegal	C	+	+
Cyanothece sp. PCC 7425	Rice fields in Senegal	C	+	+
Cyanothece sp. PCC 7822	Rice fields in Cuttack India	C	+	+
Cyanothece sp.PCC 8801	Rice fields in Taiwan	C	+	+
Cyanothece sp.PCC 8802	Rice fields in Taiwan	C	+	+
Cyanobacterium UCYN-A	North Pacific subtropical	C	+	-
Synechococcus sp. PCC7002	Onshore, Magueyes, Puerto Rico	C	-	+
Synechocystis sp. PCC6803	Fresh water lake California USA	C	-	+
Synechococcus elongatus PCC6301	Fresh water	C	+	+
Synechococcus elongatus PCC7942	Fresh water	C	-	+
Synechococcus sp. CC9311	California current Pacific (95 m)	C	-	-
Synechococcus sp. CC9605	California current Pacific ocean	C	-	-
Synechococcus sp. CC9902	Coastal	C	-	-
Synechococcus JA-2-3B' a(2-13)	Yellowstone park B-Prime	C	-	-
Synechococcus JA-3-3B' Ab	Yellowstone park B-Prime	C	-	-
Synechococcus sp. RCC307	Mediteranean sea	C	-	-
Synechococcus sp. WH 7803	Sargasso sea Atlantic ocean (25 m)	C	-	-
Synechococcus sp. WH 8102	Carribean sea	C	-	-
Prochlorococcus marinus AS9601	5m depth in Mediterranean Sea	P	-	-
Prochlorococcus marinus MIT 9211	North altlantic océan '10m)	P	-	-
Prochlorococcus marinus MIT 9215	Equatorial Pacific HL	P	-	-
Prochlorococcus marinus MIT 9301	Mediteranean sea (5m)	P	-	-
Prochlorococcus marinus MIT 9303	Mediteranean sea	P	-	-
Prochlorococcus marinus MIT 9312	Gulf Stream surface water	P	-	-
Prochlorococcus marinus MIT 9313	Gulf Stream (135 m)	P	-	-
Prochlorococcus marinus MIT 9515	North Atlantic Ocean (10 m)	P	-	-
Prochlorococcus marinus NATL1A	North Atlantic Ocean (10 m)	P	-	-
Prochlorococcus marinus NATL2A	North Atlantic Ocean (10 m)	P	-	-
Prochlorococcus marinus SS120°	Sargasso sea (120 m)	P	-	-
Prochlorococcus marinus MED4°	Open ocean	P	-	-

Figure 70

Lieux d'isolation de quelques cyanobactéries. Les environnements marins sont indiqués en violet. Synechocystis sp. PCC6803 est en orange. Les Cyanobactéries possédant *hox* sont indiquées en bleu, et celles fixant l'azote en vert

Une étude vise à répertorier parmi plus de 400 cyanobactéries de la mer Baltique et de lacs finnois celles qui étaient capables de produire du dihydrogène (Allahverdiyeva et al. 2009). Parmi les 100 souches mises en avant dans la revue, on peut relever que la grande majorité sont fixatrices d'azote (98%) et qu'ainsi leur screening a majoritairement mis en avant des productions d'hydrogène médiées par une nitrogénase. 51 de ces souches sont planctoniques, 46 benthiques (fonds marins) et 3 associées aux sols ou aux lichens. Ils ne rapportent malheureusement pas dans ces travaux si les souches possèdent ou non d'hydrogénase bidirectionnelle (l'hydrogène pouvant être produit par la

nitrogénase n'est pas discriminé) mais il semble qu'une grande partie des souches isolées et productrices d'H_2 soient originaires de lacs, de côtes de la mer baltique, ou de fonds marins. Les deux seules cyanobactéries non fixatrices d'azotes et productrices d'H2 qu'ils ont trouvées sont une *Microcystis* (Syke 967/5) unicellulaire et une *Planktothrix* (223) filamenteuse qui produisent respectivement en anaérobie obscure 0,037 et 0,131 mmol H_2.mg $Chl^{-1}.h^{-1}$, et dont seule la première produit de l'H2 en aérobie obscure (0,020 mmol H_2.mg $Chl^{-1}.h^{-1}$). Ils ont également remarqué que leurs tests complémentaires de production d'H_2 pouvaient donner des résultats de production d'hydrogène très différents de leurs résultats préliminaires, laissant ainsi penser que certains faux-négatifs ont pu être oubliés par leur screen.

On retiendra que la production d'hydrogène par les cyanobactéries est avant tout un phénomène transitoire et faible qui dure une trentaine de secondes en absence d'O2 lors d'une transition obscurité-lumière et qui peut se maintenir stable anaérobiquement en obscurité (Cournac et al. 2004). Le rôle de cette enzyme et cette production d'hydrogène est encore largement incompris. L'hypothèse la plus probable est liée au maintien d'un niveau de NADPH cellulaire acceptable pour la cellule. La présence de l'hydrogénase permettrait probablement de tamponner les variations redox des transitions approximatives entre métabolismes lors de variations environnementales abruptes. Le rôle de valve à électrons ou de valve à protons en situation photosynthétique ou de stress redox marqué restant néanmoins une possibilité non négligeable.

Comprendre à quoi sert l'hydrogénase est crucial pour pouvoir imaginer et construire des systèmes biologiques capables de produire de l'hydrogène photosynthétique en quantité industriellement intéressante.

Les études in vivo et vitro portant sur des mutants de la machinerie se sont heurtées à de multiples limitations techniques. La raison principale en est justement l'ignorance d'un rôle biologique clair qui permettrait d'obtenir un phénotype interprétable.

C'est pourquoi s'intéresser aux mécanismes et aux réseaux de régulation de l'hydrogénase pourrait être une stratégie alternative pour cerner le rôle de l'hydrogénase bidirectionnelle. Le prochain paragraphe traite de la régulation de l'hydrogénase bidirectionnelle des cyanobactéries et introduit la première partie de mes résultats.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE 4

Les régulateurs de l'hydrogénase, les CyAbrBs et AbrB2

ARTICLE I

AbrB2 est un répresseur de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp. PCC6803

CHAPITRE 4

Les régulateurs de l'hydrogénase, les CyAbrBs et AbrB2

*Ce **quatrième chapitre** délimite finalement le cadre du sujet. Y sont évoqués les 2 régulateurs connus de l'hydrogénase de Synechocystis sp. PCC6803 : LexA et AbrB1. Plusieurs généralités concernant les deux superfamilles de protéines auxquels ils appartiennent seront compilées, puis un zoom sur leurs rôles connus dans le métabolisme de Synechocystis sera effectué. Le chapitre rapportera ensuite la première partie de mes travaux de thèse, constituée du premier article dont je suis co-premier auteur, traitant de l'identification d'AbrB2 comme répresseur de l'expression de l'hydrogénase ainsi que de résultats annexes non publiés, qui complètent les connaissances actuelles autour de la régulation de l'hydrogénase bidirectionnelle cyanobactérienne.*

Les régulateurs de l'hydrogénase

Ce paragraphe traite des régulateurs de l'expression de l'hydrogénase de Synechocystis. Lorsque j'ai débuté ma thèse, deux régulateurs de l'opéron hox avaient déjà été identifiés : LexA et AbrB1. J'introduis ici ces deux régulateurs et les familles auxquelles ils appartiennent en traitant de leurs rôles connus dans d'autres organismes préliminairement à leurs rôles chez les cyanobactéries et Synechocystis en particulier.

Je détaillerai plus particulièrement les régulateurs CyAbrBs qui font l'objet de mon travail de thèse.

1- Le régulateur transcriptionnel LexA

Chez les protéobactéries, LexA est connu pour son rôle important dans la régulation de la réparation de l'ADN (réponse SOS). Chez les cyanobactéries, l'homologue de ce régulateur intervient principalement dans la régulation de l'assimilation du carbone et du métabolisme de production de l'hydrogène.

1-1- LexA, régulateur transcriptionnel lié à la réponse aux dommages à l'ADN

Chez la plupart des organismes bactériens, LexA contrôle les mécanismes de réparation des dommages faits à l'ADN. Il fonctionne conjointement avec une autre protéine, RecA, qui détecte les dommages de l'ADN et modifie l'activité de LexA.

1-1-1- LexA et la « réponse SOS »

La réparation de l'ADN est une fonction cruciale du vivant, le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du génome en réponse aux agressions environnementales est en effet indispensable à la survie cellulaire. Un premier mécanisme de la réponse cellulaire à de tels dommages a ainsi été

proposée et appelée « réponse SOS » (Georges et al. 1974) et décrit de manière détaillée chez *E.coli* (Walker 1984).

La réponse SOS, telle qu'elle est décrite aujourd'hui, requiert les gènes *lexA* (pour « locus for X-ray sensitivity A », Howard-Flanders et al. 1966 cité dans Butala et al. 2009) et le gène *recA* (pour « recombinase A »). L'action des deux protéines LexA et RecA permet la mobilisation d'un ensemble de gènes qui stoppent la division cellulaire et induisent la réparation de l'ADN endommagé. Durant ce processus il y a induction d'une mutagénèse et des prophages. Ce réseau génétique permet aux bactéries concernées de survivre ainsi que de muter ou d'échanger du matériel génétique, ce qui pourrait avoir pour effet de stimuler une évolution favorable d'adaptation au stress rencontré. (Butala et al. 2009)(voir Fig. 71).

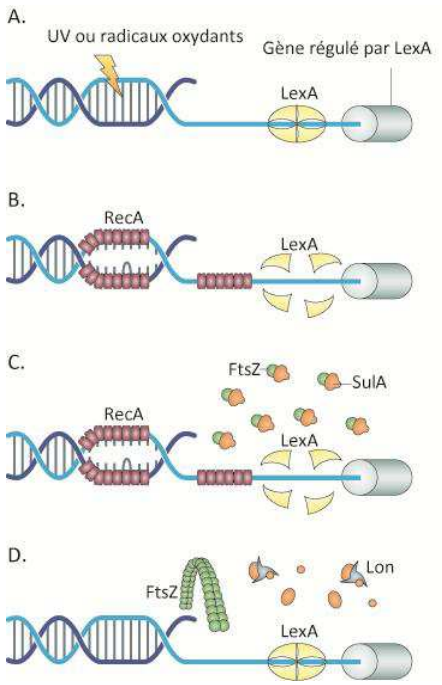


Figure 71

La réponse SOS

A. l'exposition aux ultraviolets ou à des radicaux oxydants peut entrainer des dommages à l'ADN chromosomique.

B. Un mauvais assortiment de bases entraine des régions d'ADN simple brin qui servent de plateforme de polymérisation pour RecA. Le filaments de RecA entraine l'autoprotéolyse de LexA, le répresseur de la réponse SOS. Les gènes activés permettent la réparation de l'ADN

C. Le régulon de LexA inclue également un inhibitor de la division cellulaire SulA afin d'empêcher la transmission d'ADN mutant à de nouvelles cellules filles. SulA inhibe spécifiquement la polymérisation de la protéine de la division cellulaire FtsZ en se liant à ses monomères, bloquant la formation de l'anneau FtsZ au milieu de la cellule.

D. Une fois la réparation de l'ADN terminée, la répresion par LexA des gènes SOS est restaurée. La protéase cytoplasmique Lon dégrade aussi SulA afin de restaurer les capacités de division cellulaire.

D'après Justice et al 2008

Parmi les causes déjà identifiées de l'activation de la réponse SOS, sont notamment représentatives : le blocage des fourches de réplication de l'ADN, l'apparition de défauts après recombinaison ou ségrégation de chromosomes et les dommages de l'ADN successifs à l'action d'intermédiaires métaboliques dans des cellules en croissance normale ou carencée. La réponse SOS est déclenchée par, entre autres, les expositions aux rayonnements ultraviolets, des produits chimiques, le changement de pH du milieu (comme c'est parfois le cas lorsque une bactérie entre brusquement en contact avec un milieu différent, tel le sang) ou même des stress physiques comme une exposition à des plus hautes pressions.

L'exposition aux antibiotiques induit également la réponse SOS, susceptible de favoriser statistiquement l'apparition de résistances croisées à plusieurs antibiotiques.

Récemment il a été découvert que LexA jouait également un rôle dans la répression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de pathogénicité (comme des colicines chez *E.coli*, la synthèse de facteur de virulence chez *Staphylococcus aureus,* etc...), et pas uniquement dans le maintien d'un génome fonctionnel. (Butala et al. 2009)

1-1-2- Importance biologique de LexA

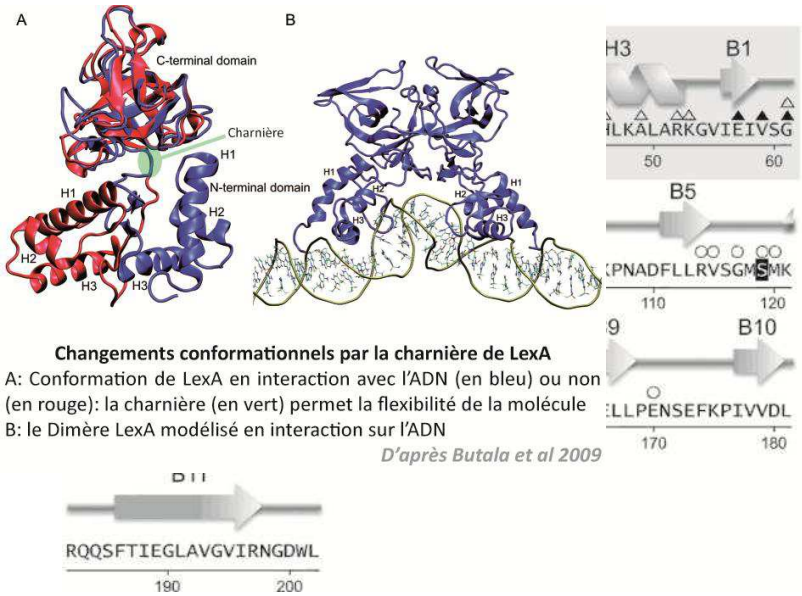
L'importance biologique de ce système de maintien de l'intégrité du génome est renforcée par sa très large répartition dans le monde bactérien. En effet un homologue de *lexA* est présent dans toutes les protéobactéries (à l'exception des ξ-protéobactéries), chez les bactéries Gram-positives, les bactéries vertes non-sulfureuses et les cyanobactéries. Chez *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Courcelle et al. 2001, Au et al. 2005, Goranov et al. 2006, Cirz et al. 2006, Cirz et al. 2007, Butala et al. 2009) *lexA*, *recA* et un gène codant pour une ADN polymérase infidèle sont contrôlés par LexA.

Chez les *Pseudomonas* et les *Xanthomonas*, le gène *lexA* est parfois dupliqué, LexA1 permettant la réponse SOS classique tandis que LexA2 régule notamment l'expression de deux ADN polymérases infidèles (Abella et al. 2007).

Chez *Bacillus subtilis*, l'homologue de *lexA*, *dinR* (damage inducible) contrôle un régulon de 63 gènes dont 7 seulement ont des homologues chez *E.coli*, illustrant la variabilité des réponses biologiques aux dommages à l'ADN. Chez cet organisme l'expression d'une hydrolase de parois cellulaires est nécessaire pour contrôler les processus de sporulation lorsque la cellule est confrontée à des dommages à l'ADN (le processus de sporulation de *B.subtilis* sera évoqué plus en détail dans le paragraphe concernant les régulateurs de la famille AbrB).

1-1-3- Structure de LexA

LexA, protéine de 202 acides aminés, existe sous forme dimérique. Il est constitué de deux domaines distincts : un domaine reconnaissant l'ADN et un deuxième impliqué à la fois dans l'oligomérisation de la protéine et dans son activité d'autoclivage. Entre ces deux domaines, 5 résidus (70 à 74) forment une « charnière » souple et hydrophile qui joue un rôle capital dans la flexibilité de la protéine, indispensable à son activité (Fig 72 et 72).



Changements conformationnels par la charnière de LexA
A: Conformation de LexA en interaction avec l'ADN (en bleu) ou non (en rouge): la charnière (en vert) permet la flexibilité de la molécule
B: le Dimère LexA modélisé en interaction sur l'ADN
D'après Butala et al 2009

Figure 72
Les différents éléments structurels de LexA
Gris clair: Le domaine de fixation à l'ADN. Gris foncé: charnière entre les deux domaines de LexA. Résidus en noir: Dyade catalytique (Ser119 et Lys156) et site de clivage (Ala84 et Gly85). Les triangles représentent les sites qui, mutés, améliorent (noir) ou inhibent (blanc) l'activité de fixation à l'ADN. Les cercles représentent les sites de mutation rendant les mutants hyperclivables (noir) ou non-clivables (blanc)

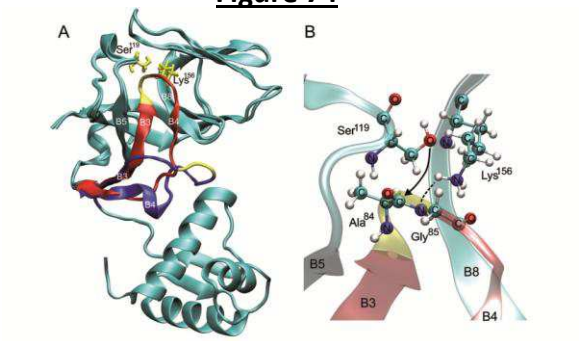
D'après Butala et al 2009

La zone de fixation à l'ADN en N-terminal de la protéine contient 3 hélices α (reconnaissant l'ADN, les hélices II et III réalisant le motif classiquement connu « hélice-tour-hélice ») et deux courts feuillets β antiparallèles, tandis que la deuxième partie de la protéine contient 9 feuillets β. La charnière souple permet au dimère $(LexA)_2$ « libre » de reconnaitre l'ADN cible puis de « refermer » la protéine sur le site par changement conformationnel (à noter que cet élément n'a jamais été cristallisé, seulement modélisé, (Fig.73). Il a été attribué au dimère $(LexA)_2$ différents consensus nucléotidiques de reconnaissance selon les organismes : le palindrome CTGT-N8-ACAG concerne *E.coli,* et est conservé

chez beaucoup de bactéries Gram-négatives, et GAAC-N4-GTTC est *a priori* le consensus occurant chez les bactéries Gram-positives.

L'autoclivage de la protéine LexA est effectué par les deux résidus Ser119 et Lys156 (dyade catalytique) qui vont permettre de rompre la liaison peptidique entre les deux résidus Ala84 et Gly85, eux même situés dans une boucle soumise à deux conformations possibles, la rapprochant ou l'éloignant de la dyade catalytique. En conditions physiologiques, la conformation de LexA est stable et la région clivable est éloignée de la dyade catalytique, alors que lorsque LexA est en interaction avec un filament de RecA, la conformation de la boucle change et le clivage de LexA se déclenche, décrochant LexA de l'ADN, le rendant beaucoup plus sensible aux protéases et levant l'inhibition sur les gènes cibles. A noter qu'à des pH alcalins, l'autoclivage de la protéine LexA peut se produire spontanément et indépendamment de la formation d'un filament de RecA (Little 1984, Butala et al. 2009).

Figure 74



Les deux conformations du monomère LexA
A: En bleu la boucle en conformation non clivable, la zone de clivage (jaune) est éloignée de la dyade catalytique Ser119/Lys156. En rouge, la boucle en conformation clivable avec le site de clivage (jaune) à proximité de la dyade catalytique.
B: Zoom sur la zone de d'autoclivage en conformation propice à l'auto-clivage.
D'après Butala et al 2009

BILAN :

On retiendra que chez la plupart des bactéries, LexA est un régulateur transcriptionnel qui fonctionne en réprimant ses gènes cibles. Chez *E.coli,* l'activation du régulon se déclenche suite à l'autoclivage de LexA, activé par la polymérisation de RecA suite à des dommages subis par l'ADN, ou un pH alcalin (Little et al. 1984).

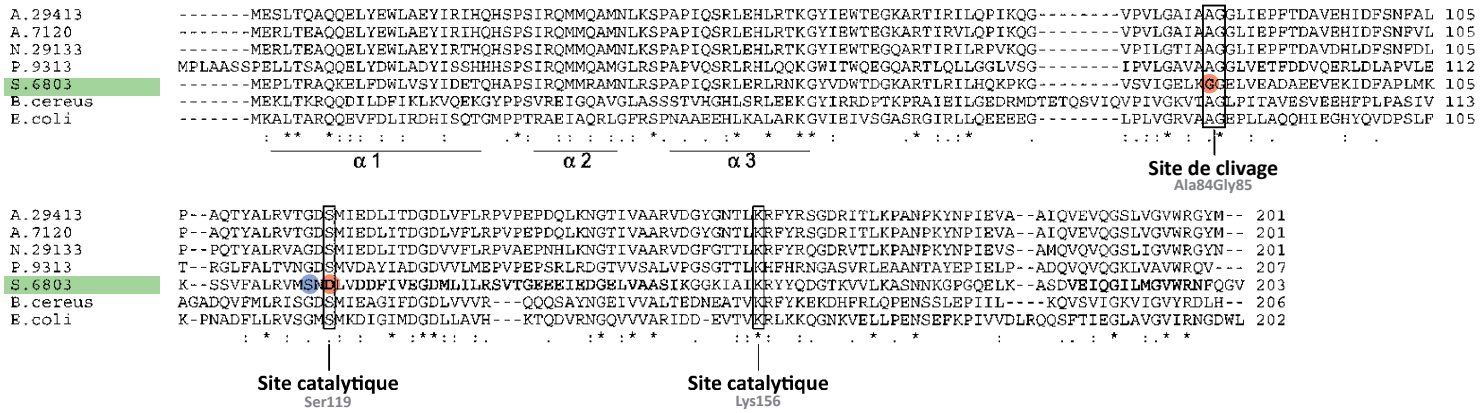
1-2- CyLexA : LexA chez les cyanobactéries.

Le rôle de LexA chez les cyanobactéries n'a été étudié que très récemment. Une étude transcriptomique d'un mutant Δ*lexA* parue en 2001, rapportait avec étonnement que LexA ne semblait pas être lié à la réponse SOS chez *Synechocystis*, et par extension, chez les cyanobactéries (Kamei et al. 2001). En 2004, notre laboratoire montra que chez *Synechocystis*, lexA n'est pas impliqué dans la réponse SOS mais régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du carbone et de l'azote et est essentiel à la croissance lors d'une carence en carbone (Domain et al. 2004).

1-2-1- Structure de la protéine CyLexA

Les travaux de Mazon et al. en 2003 et de Oliveira et Lindblad en 2005 rapportent certaines différences dans la séquence du *lexA* de *Synechocystis* comparée à la séquence classiquement observée chez d'autres organismes (Fig.75). On observe 2 différences : une au niveau du site de clivage (Ala84 devenant Gly84), et une au niveau du site catalytique Ser119 (Ser119 devenant Asp119). En accord avec la plupart des mutations étudiées déjà chez *E.coli* (Fig 72, Butala et al. 2009), Mazon et al. ont proposé que ces 2 mutations « pourraient avoir un impact négatif » sur l'activité d'autoclivage de LexA. Pour rappel, Butala et al. en 2009 avaient, eux, décrit des substitutions au niveau de ces sites qui rendaient les protéines LexA de *E.coli* « non-clivables », mais aucune étude ne permet de généraliser leur résultat au LexA de *Synechocystis* (Oliveira et Lindblad 2011).

Figure 75



Alignement entre différentes protéines LexA

A.29413 = *Anabaena variabilis* ATCC29413. **A.7120** = *Anabaena* PCC7120. **N.29133** = *Nostoc* ATCC29133. **P.9313** = *Prochlorococcus marinus* MIT9313. **S.6803** = *Synechocystis* PCC6803. **B.cereus** = *Bacillus cereus* ATCC10987. **E.coli** = *Escherichia coli* K12.
α1, α2 et α3 indiquent les hélices alpha impliquées chez *E.coli* dans la fixation à l'ADN. Les cercles rouges indiquent les mutations remarquables de la séquence de *Synechocystis* en comparaison des autres organismes. Le cercle bleu indique un résidu sérine de *Synechocystis* à proximité de sa position théorique.

Oliveira et al 2005
Màzon et al 2003

De manière intéressante, ces « mutations » ne sont pas communes à toutes les cyanobactéries, et semblent même assez spécifiques du LexA de *Synechocystis* (seule la séquence de LexA de la cyanobactérie UCYN-A est différente de celle de *E.coli* à ces deux sites). Oliveira et Lindblad proposent ainsi que ces mutations apparemment très significatives pourraient être une conséquence de la grande ancienneté des cyanobactéries qui a conduit au groupe phylogénétique non homogène que nous étudions aujourd'hui. En conséquence de ce postulat, ils suggèrent que LexA a pu évoluer chez certaines cyanobactéries d'une manière différente des autres. En extrapolant cette remarque, ils conseillent de prendre un certain recul sur l'ensemble des résultats concernant les hydrogénases cyanobactériennes et leurs régulateurs, un résultat valable dans un organisme ne sera pas forcément généralisable à l'ensemble du groupe. (Oliveira et Lindblad 2011).

Il a été postulé par Domain et al. 2004 que la séquence d'ADN reconnue par le LexA cyanobactérien devrait être différente de celle reconnue par le LexA de *E.coli* en raison de la différence de séquence de la région de fixation à l'ADN.

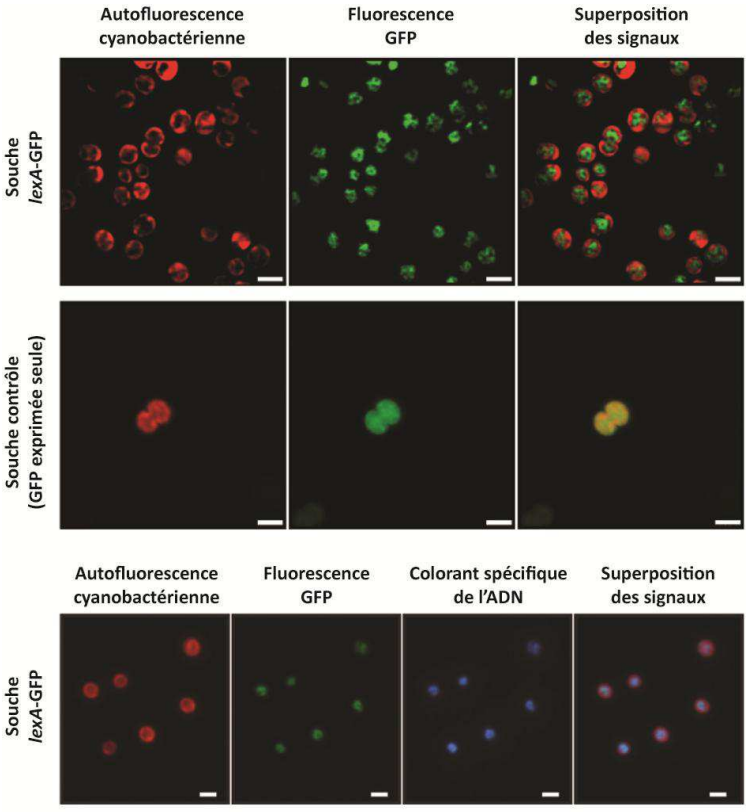
Mazon et al. en 2003 proposaient aussi que ces mutations de LexA de *Synechocystis* puissent affecter la nature du site de reconnaissance de la protéine. Ils ont en effet identifié un site consensus, TAGTACTAATGTTCTA chez *Anabaena* sp. PCC7120, extrapolé à RGTACNNNDGTWCB chez plusieurs cyanobactéries, comme étant les séquences que reconnaitrait LexA chez ces organismes. Leur étude rapporte que ce motif se retrouve de nombreuses fois chez les organismes concernés mais pas chez *Synechocystis,* ils ont ainsi proposé que les mutations du LexA de *Synechocystis* soient en partie responsables d'un site de reconnaissance particulièrement différent de celui des autres cyanobactéries.

LexA, qui ne possède pas de domaine transmembranaire, est *a priori* considérée comme une protéine soluble. Cependant des études protéomiques ont permis de déterminer que LexA pouvait également se retrouver associée aux fractions membranaires et thylakoïdales (Wang et al. 2000, Zhang et al. 2009). L'hypothèse retenue est qu'elle serait en interaction avec une ou des protéines membranaires. Cependant aucun résultat supplémentaire n'en apporte la preuve.

Les travaux de l'équipe de Lindblad en 2011 rapportent que dans les cellules d'une souche exprimant une protéine LexA fusionnée à la « green fluorescent protein » (GFP) on observe de la fluorescence exclusivement dans le cytoplasme et en particulier en colocalisation avec l'ADN. Ils ont ainsi suggéré que les précédents résultats montrant que LexA pouvait être située dans des membranes devaient résulter de contamination des membranes avec de l'ADN.

La localisation de LexA semble répartie de manière assez homogène sur l'ensemble du génome, en concordance avec le fait que son consensus probable de reconnaissance soit retrouvé plus de 1300 fois sur le génome (même si les auteurs pensent peu probable que tous soient effectivement des sites de fixation). Bien qu'ils suggèrent l'inverse, leurs travaux ne peuvent toujours pas exclure la possibilité qu'une infime partie non visible de LexA soit en interaction avec les fractions membranaires.

Figure 76



Localisation cellulaire de LexA
La première ligne montre la localisation de la protéine chimère LexA-GFP.
La deuxième ligne montre le contrôle lorsque seule la GFP est exprimée.
La troisième ligne montre la superposition entre le signal LexA-GFP et l'ADN.
LexA colocalise avec l'ADN.
D'après Oliveira et Lindblad 2011

Plusieurs études rapportent également que la protéine LexA peut être modifiée post-traductionnellement. En 2011 l'équipe de Lindblad, par western-blot, ont pu identifier 3 formes différentes de LexA, une correspondant au point isoélectrique (PI) attendu et 2 autres formes dont la nature de la modification n'a pu être déterminée (bien qu'ils les qualifient de « petites » au vu que la taille de la protéine n'est pas drastiquement changée), les 3 spots apparaissaient à la fois pour des extraits protéiques traités en conditions standard ou à l'obscurité. Liemann-Hurwitz et al., en 2009 ont également remarqué que le LexA interagissant avec le promoteur du gène *sbtA* qui code pour un transporteur de HCO_3^- , Na^+ dépendant, migrait comme une protéine de 30 kDa au lieu des 22,7 kDa théoriques), ce dernier résultat pouvant indiquer soit une modification post-traductionnelle, soit une migration perturbée par une structure inhabituelle du peptide dans les conditions de la migration.

Très récemment chez *Neisseria gonorrhoeae*, il a été observé que l'unique cystéine de l'orthologue de LexA est sensible à l'oxydation qui affecte négativement son activité de fixation à l'ADN de manière indépendante à RecA (Schook et al. 2011).

1-2-2- Que régule CyLexA ?

Le transcrit de *lexA* est monocistronique (Domain et al. 2004, Mitschke et al. 2011) et sa quantité varie en fonction des conditions environnementales (Domain et al. 2004, Houot et al. 2007, Kiss et al. 2009, Pakrash et al. 2009, Singh et al. 2008, Zhang et al. 2008).

On observe une augmentation réversible en passage de lumière à obscurité (Kiss et al. 2009), et une diminution par passage en microaérobie (Summerfield et al. 2011) et par stress thermique froid (20°C, Patterson-fortin et al. 2006) et une diminution forte après une exposition au SeO_4, aux UVC et à l'H_2O_2 (Domain et al. 2004). LexA étant considéré comme un répresseur, une diminution transcriptionnelle pourrait indiquer que des mécanisme de résistance/adaptation aux conditions évoquées soient dépendant de l'effet « répresseur » de LexA.

Les travaux rapportés par le laboratoire (Domain et al. 2004) montrent par ailleurs que la variation du transcrit *lexA* en réponse aux UVC n'est pas due à une variation de l'activité de son promoteur. En effet , en utilisant une approche par fusion transcriptionnelle au gène rapporteur *cat* il a été montré que l'activité des promoteurs de *lexA* et *recA* ne variaient pas après exposition aux UVC. L'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle du niveau de transcrit de *lexA*, par la RNaseE (*slr1129*) dont l'activité augmente en réponse aux UV a été proposée. Cette hypothèse a été confirmée (Oliveira et Lindblad 2011) car dans certaines conditions le niveau de transcrit de *lexA* varie mais n'est pas corrélé avec un changement au niveau protéique, l'anticorps détectant la même quantité de LexA sous toutes les conditions. Cependant une grande stabilité de la protéine LexA pourrait aussi expliquer que la diminution transcriptionnelle ne soit pas visiblement répercutée au niveau protéique en seulement 24 heures, et la sensibilité de leur anticorps pour détecter de petites augmentations pourrait aussi être remise en question. Une seule étude protéomique récente (Li et al. 2012) a pu corréler une variation de transcrits de *lexA* avec une variation de la quantité de protéines.

L'analyse du transcriptome d'un mutant déplété en LexA comparé à celui d'une souche sauvage a permis de mettre en évidence 57 gènes dont l'expression est sous la dépendance directe ou indirecte de LexA. 30 d'entre eux sont impliqués dans le métabolisme du carbone inorganique et/ou leur expression est contrôlée par la disponibilité de ce même carbone inorganique dans le milieu (Domain et al. 2004). Plus récemment un mutant totalement dépourvu de *lexA* a été construit au laboratoire par Panatda Saenkham (résultats transcriptomiques non publiés). L'équipe Patterson-Fortin et al. a de son côté rapporté que *lexA* était impliqué directement dans l'expression du gène *crhR* de *Synechocystis* qui code pour une RNA hélicase (« cyanobacterial RNA hélicase rédox»). Le rôle des RNA hélicases est de modifier les éventuelles structures secondaires des ARN afin de permettre leur traduction. Chez *Synechocystis* il a été remarqué que *crhR* était particulièrement sensible aux effets du statut rédox de la cellule : quand la chaîne de transport d'électron est fortement réduite (par des électrons photosynthétiques ou venant de la consommation du glucose), les transcrits de *crhR* s'accumulent. Inversement une chaîne de transport d'électrons plus oxydée diminue cette accumulation de transcrits. Ces résultats suggèrent que CrhR permet la traduction de gènes nécessaires à la gestion du stress rédox. L'équipe a décrit *lexA* comme un répresseur de *crhR*. Comme évoqué au paragraphe précédent, l'équipe de Liemann-Hurwitz et al. a identifié en 2009 la protéine LexA, ainsi que deux régulateurs AbrB-like dont il sera traité ultérieurement, comme interagissant avec le promoteur du gène *sbtA* codant pour un transporteur de bicarbonate (HCO_3^-) Na^+ dépendant, résultat en accord avec le lien entre LexA et l'assimilation du carbone (Domain et al. 2004).

1-3- CyLexA régule le promoteur de l'opéron *hox*

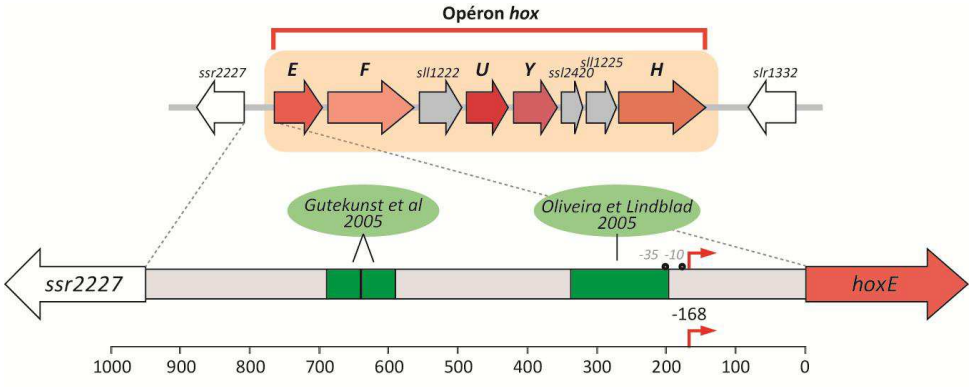
1-3-1- Chez *Synechocystis* sp. PCC6803

En 2005, deux équipes ont décrit LexA comme un régulateur de l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp.PCC6803. Les deux équipes ont décrit un site de démarrage de la transcription de l'opéron *hox* identique en position -168 avant l'ATG de *hoxE* (évoqué au paragraphe 4-4-1 du précédent chapitre).

Oliveira et Lindblad 2005, ont décrit pour la première fois que LexA se fixe sur le promoteur en amont de *hoxE*, sans toutefois préciser son rôle activateur ou répresseur. Ils ont incubé la sonde promoteur de *hoxE* (marquée avec une biotine) avec des extraits cellulaires de *Synechocystis* sp. PCC6803 ou de *Nostoc punctiforme* ATCC29133 et identifié par spectrométrie de masse LexA comme la protéine la plus abondante interagissant avec cet ADN (en remarquant que les extraits de *Nostoc* fournissaient un profil de protéines interactantes très différent, sans toutefois préciser sa nature). Ils validèrent ensuite *in vitro* l'interaction LexA-promoteur de *hox* en utilisant une protéine LexA taguée avec une queue histidine produite et purifiée à partir de *E.coli*. Ils identifièrent ainsi le site préférentiel de fixation de -198 à -338 en amont de *hoxE*. Ces résultats n'indiquaient en rien si LexA est un activateur ou un répresseur ou autre.

La deuxième équipe (Gutekunst et al. 2005), décrit également que LexA interagit avec le promoteur de *hoxE* mais sur une séquence beaucoup plus en amont. Pour cela, ils ont analysé les régions promotrices de l'opéron *hox* par fusion transcriptionnelle dans la région située entre -690 et -569 avant l'ATG de *hoxE*. Ils y identifièrent 2 sites probables de fixation de CyLexA. Ils ont ensuite utilisé cet ADN avec des extraits totaux de *Synechocystis,* ou une protéine CyLexA purifiée à partir d'*E.coli*, et ont visualisé par retard sur gel la formation de complexe ADN-protéine. Ils montrèrent qu'une souche mutante partiellement déplétée de *lexA* avait une activité hydrogénase divisée par deux et conclurent que LexA est un activateur transcriptionnel de l'hydrogénase bidirectionnelle, or il s'agit d'une affirmation abusive car l'effet ici peut-être indirect.

Depuis lors LexA est considéré comme activateur alors même que ces travaux n'apportent pas réellement une preuve suffisante à une telle conclusion. Ce qui est aussi à retenir est la fixation de CyLexA dans une zone très différente de celle proposée par Oliveira et Lindblad 2005 et très en amont de l'opéron *hox*, ainsi qu' une diminution de l'activité hydrogénase dans une souche déplétée en *lexA* (voir Fig.77).



Région génomique de *Synechocystis* portant le promoteur *hox*
Le domaine intergénique s'étend sur 963pb. La petite flèche rouge représente le site d'initiation de la transcription en position -168 par rapport à l'ATG de *hoxE*. Les 2 petits cercles en amont de la flèche représentent les boîtes -10 et -35 proposées. Les blocs verts représentent les sites de fixation de LexA identifiés par l'équipe de Gutekunst et al (2 sites) et Oliveira et Lindblad (1 site)

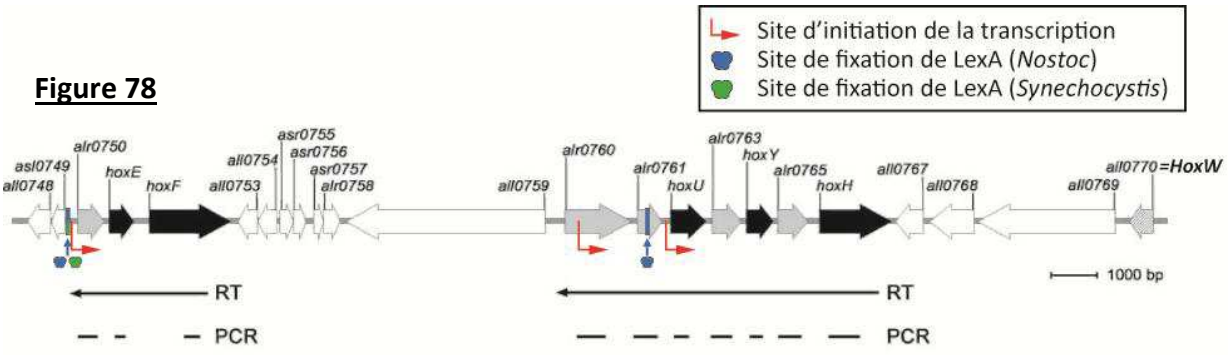
Sites de fixation de LexA en amont du promoteur de *hoxE*
Figure 77

Plus récemment Oliveira et Lindblad ont observé 2 formes modifiées post-traductionnellement de LexA en interaction avec le fragment d'ADN situé dans la région -198 à -338 en amont de *hoxE* en plus des 3 qu'ils avaient détectées auparavant dans les extraits solubles de *Synechocystis*, amenant à 5 le nombre de formes différentes de LexA chez *Synechocystis*. Ils proposent que lorsque LexA entre en interaction avec l'ADN certains changement conformationnels et post-traductionnels se produisent, devenant visibles en gel 2D, et jouent un rôle primordial sur l'activité régulatrice de la protéine (Oliveira et Lindblad 2011).

1-3-2- Chez *Nostoc* sp. PCC7120

LexA intervient dans la régulation de l'expression de l'hydrogénase chez *Nostoc* sp. PCC7120 (Sjoholm et al. 2007) où l'opéron *hox* est divisé en 2 clusters *hoxEF* et *hoxUYH.* Ces 2 clusters ne s'expriment pas toujours de manière coordonnée (voir Fig. 78).

Figure 78



Organisation de la région génomique de *Nostoc* sp. PCC7120 autour des clusters *hox*
Noir: gènes *hoxE, F U, Y et H*. Gris: ORF présentes sur les mêmes transcrits que les *hox*. Hachuré: *hoxW.*
Les tirets "PCR" indiquent les zones vérifiées et validées par PCR comme présentes sur les transcrits où *hoxF* ou *hoxH* appartiennent. Les flèches rouges correspondent aux starts de transcription identifiés contenant *hoxF* (à gauche) ou *hoxH* (les deux de droite). Les carrés bleu ou vert sur la carte représentent les fragments testés en affinité avec les protéines LexA de *Nostoc* (Bleu) ou *Synechocystis* (Vert).

D'après Sjoholm et al 2011

Ils rapportèrent que les gènes se trouvent sur 3 transcrits. Ainsi, en condition d'anaérobie à l'obscurité, *hoxE* et *hoxF* sont coexprimés avec le gène de fonction inconnue *alr0750* et les gènes *hoxU*, *hoxY* et *hoxH* sont coexprimés avec 4 gènes de fonctions inconnues : *alr0760*, *alr0761* et al.*r0763* et al.*r0765* (voir Fig. 78) ce dernier possédant 2 sites d'initiation de la transcription distincts. Ils trouvèrent que 2 de ces 3 transcrits possédaient potentiellement une séquence de fixation pour LexA en amont de leur +1 de transcription et validèrent l'interaction *in vitro* avec le LexA de *Nostoc* pour ces deux régions (une en amont de *hoxU* et celle en amont de *alr0750, voir fig78)*. Par contre, le LexA de *Synechocystis* ne reconnait que la région en amont d'*alr0750*. Une des raisons probables de cette différence est que les deux LexA reconnaissent des séquences d'ADN légèrement différentes ou bien ceci est dû à l'effet d'une modification post-traductionnelle spécifique d'un des deux organismes.

1-4- Bilan

En conclusion, les connaissances actuelles sur LexA chez les cyanobactéries montrent que ce facteur de transcription n'est pas impliqué dans la régulation SOS, mais plutôt au métabolisme du carbone, particulièrement dans les mécanismes de l'assimilation du carbone inorganique, le métabolisme de l'hydrogène et il a également été identifié comme régulant *crhR*, une RNA hélicase, dont le rôle est de défaire les structures secondaires des ARN messagers fortement structurés. L'expression de *crhR* augmentant lors de fortes variations du statut rédox des cellules, et la zone 5' non traduite devant l'opéron *hox* comportant de fortes structures secondaires, on peut voir ici s'amorcer la silhouette d'un schéma global ou LexA régulerait d'une manière ou d'une autre l'expression et la traduction de l'enzyme qui nous intéresse.

2- AbrB

Le premier régulateur de la famille AbrB (Antibiotic resistance Bacillus) a été identifié chez Bacillus subtilis. Ce paragraphe résume quelques-unes des connaissances de cette famille de régulateurs chez les Bacillus et ainsi que sur les CyAbrBs des cyanobactéries.

2-1- Le régulateur transcriptionnel AbrB

2-1-1- Régulateurs de l'état de transition

Toutes les bactéries subissent en fin de phase exponentielle de croissance un changement drastique de leur métabolisme. Dès lors que les conditions de culture ne sont plus optimales, de nombreux gènes et voies cataboliques ou anaboliques responsables de la production de diverses molécules tels les antibiotiques, les toxines ou des enzymes dégradants des polymères s'expriment.

Ce phénomène appelé « état de transition », est généralement regardé comme un carrefour où les cellules continuent d'exprimer la plupart des gènes liés à la croissance active mais où elles commencent en parallèle à exprimer d'autres gènes nécessaires à la survie en environnement carencé ou hostile.

Chez les *Bacillus*, de nombreuses fonctions cellulaires caractéristiques de l'état de transition sont déjà répertoriées : la transformation, la production d'antibiotiques ou bien d'enzymes extracellulaires ou encore la synthèse de flagelles. La plupart des gènes codant ces fonctions sont régulés, au moins en partie, par de petits régulateurs transcriptionnels négatifs simplement baptisés « régulateurs de l'état de transition ». Leur fonctionnement classique est principalement d'empêcher l'expression de leurs cible pendant la croissance exponentielle (Klein et Marahiel 2002). Le régulateur de l'état de transition considéré comme central chez *Bacillus subtilis* s'appelle AbrB (pour *Antibiotic resistance Bacillus subtilis*), il a notamment été identifié comme jouant un rôle essentiel dans le processus de sporulation (voir plus loin).

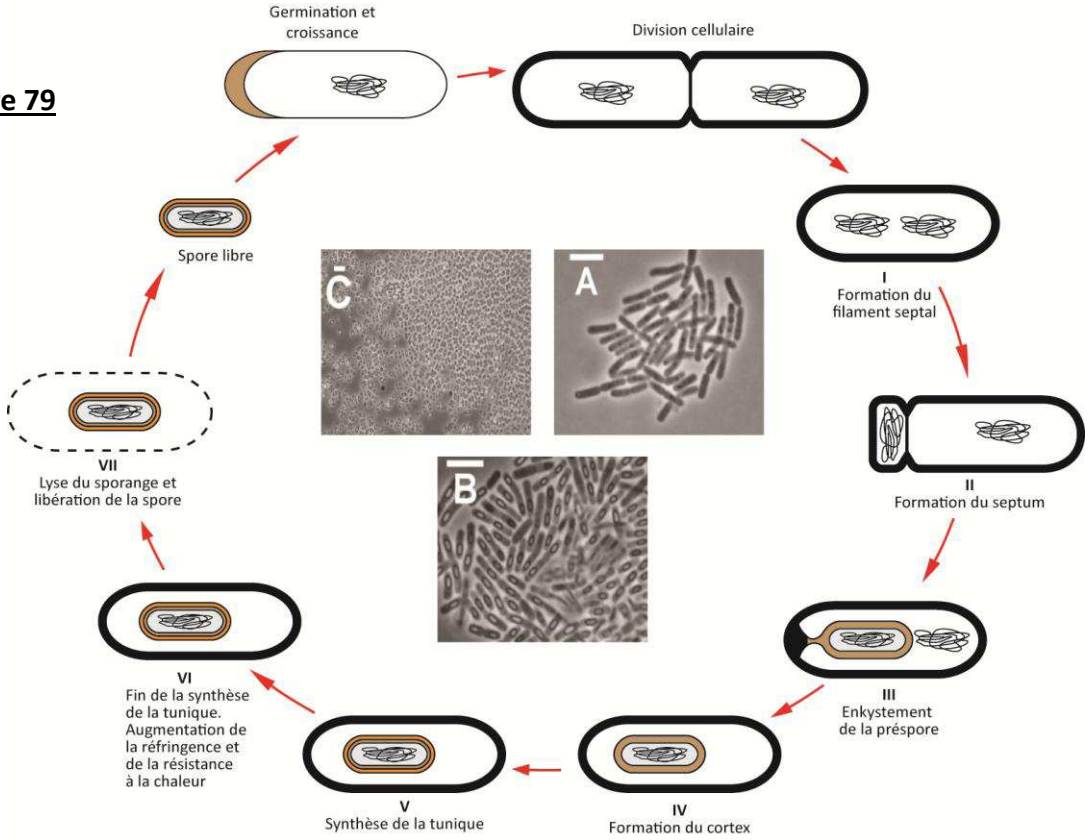
2-1-2- Rôle d'AbrB dans la sporulation chez *B.subtilis*

La sporulation est un procédé par lequel les bactéries trouvent un moyen de résister à de longues périodes défavorables, elles s'entourent d'une coque extrêmement résistante et vivent au ralentit jusqu'à être de nouveau en présence de conditions plus favorables. Chez *Bacillus subtilis*, la plupart des gènes liés à ce mécanisme sont sous le contrôle d'AbrB. Celui-ci réprimant la plupart des gènes *spoO* ainsi que d'autres régulateurs de la sporulation ou des autres procédés de l'état de transition (tels *sin* (sporulation inhibitor) ou Hpr lié à l'excrétion de protéases) (de Vries et al. 2004).

Lorsque les conditions de croissances varient fortement, un mécanisme de phosphorelais (cascade de phosphorylation) s'enclenche sur les protéines SpoOF, SpoOB et finalement SpoOA (Perego et al. 1989). La phosphorylation de cette dernière lui permet de réprimer l'expression d'*abrB* et ainsi de déclencher les voies métaboliques conduisant à la sporulation.

L'identification d'*abrB* chez *B.subtilis* en 1971 par l'équipe de Michel Guespin s'est faite par la recherche de pseudo-révertants dans le mutant *spoOA* qui est non-motile, incapable de produire des antibiotiques, d'acquérir la compétence pour la transformation et d'initier la sporulation. Les révertants de l'ORF *abrB* (codant une protéine de 94 acides aminés pour 10,5 kDa) ont permis de récupérer leur capacité à générer des antibiotiques et leur motilité mais pas leur capacité à sporuler. Plus tard les travaux de Perego et al. (1988) et ceux de Zuber et Losick (1987) montrèrent que ces révertants concernaient des gènes *abrB* ayant perdu leur fonction ou dont l'expression était fortement diminuée (probablement par des mutations au niveau du promoteur du gène).

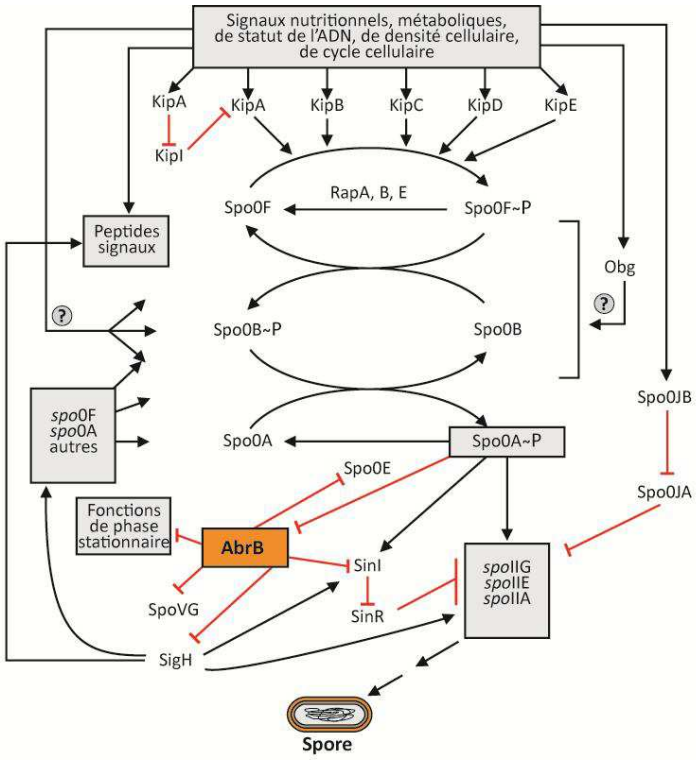
Figure 79



Cycle de la Sporulation
Le cycle est représenté à l'extérieur de la figure. Les photos au centre sont des images microscopiques d'une partie du cycle de *Bacillus cereus* (Barre blanche = 5µm): **A.** Cellules végétatives s'agrégeant en phase stationnaire. **B.** Cellules aggrégées formant des spores. **C.** Spores.

Il semblerait également que le gène *abrB* soit transcrit par 2 promoteurs dont seulement le deuxième serait contrôlé par SpoOA ; mais la signification de cette caractéristique n'est pas encore bien comprise. Une soixante de gènes chez *Bacillus subtilis* ont été confirmés comme étant ses cibles, et la majorité de ceux-ci sont réprimés durant la phase exponentielle de la croissance.

A ce jour, plusieurs homologues et paralogues d'AbrB ont été identifiés chez *Bacillus subtilis* : Abh et SpoVT avec lesquels il partage 36% d'homologie sur l'ensemble de la séquence et 78% sur le seul domaine N-terminal, responsable de l'interaction avec l'ADN. Ces 3 régulateurs ne sont pas connus pour partager des gènes cibles, ni pour être exprimés simultanément, mais ils interagissent avec l'ADN de manière très similaire (Sullivan et al. 2008, voir plus loin).



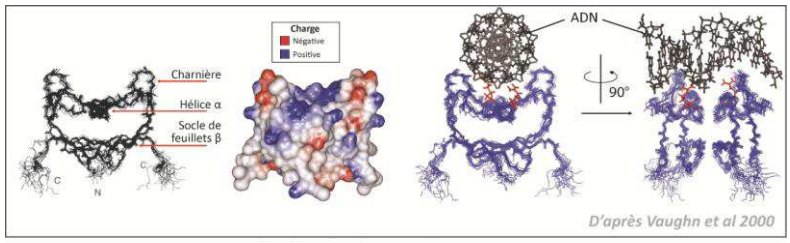
Complexité du Phosphorelai et rôle d'AbrB dans celui-ci
Les principales interactions qui arrivent dans ou en association avec le phosphorelai sont illustrées. Les flèches indiquent des activations, les lignes en "T" indiquent des répressions. Des formes phosphorylées de protéines sont indiquées par un "~P". Les mécanismes régulatoires encore inconnus sont indiqués d'un "?". AbrB joue un rôle central dans la répression générale du phosphorelai.

Figure 80

2-1-3- Structure des régulateurs AbrB-like

2-1-3-1- Historique

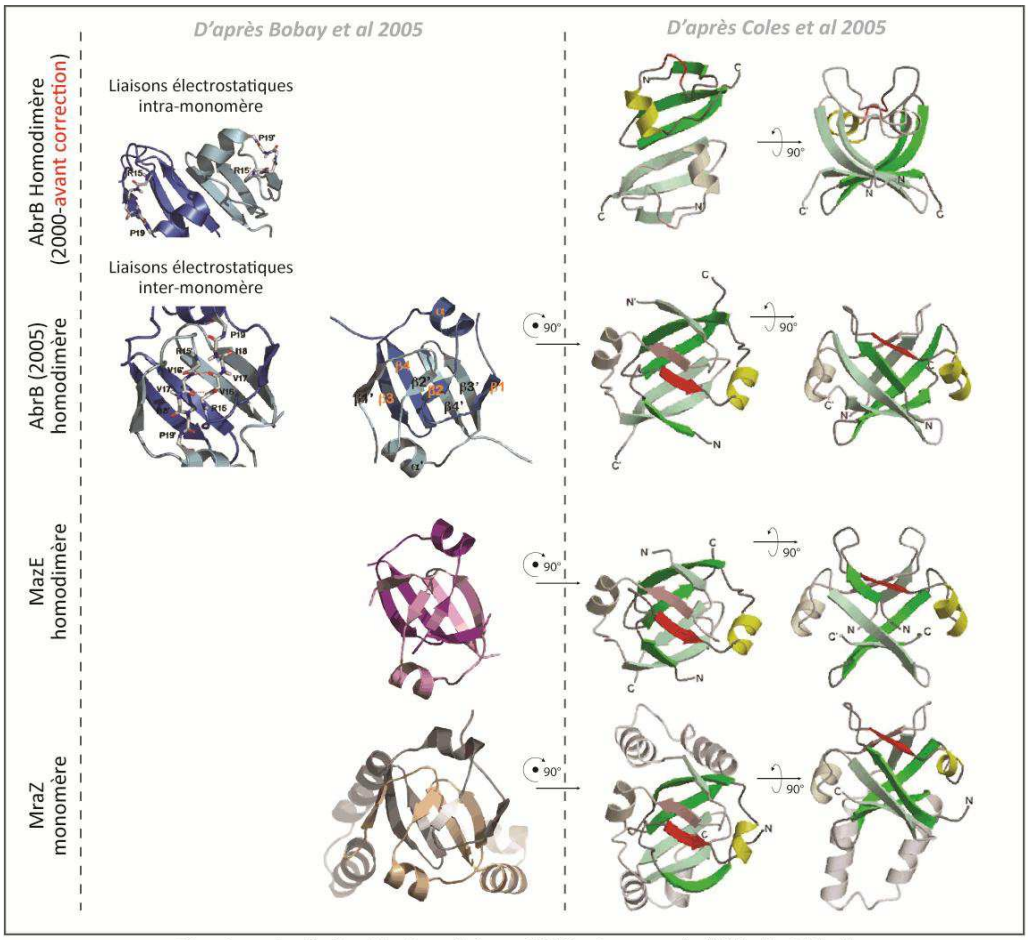
Malgré l'intérêt grandissant qui est porté à cette nouvelle famille de régulateurs et à leur rôle primordial dans les organismes où il est présent, relativement peu d'informations concernant la structure de cette protéine existent. Le domaine N-terminal de la protéine (ses 53 premiers acides aminé) a été cristallisé (Vaughn et al. 2000), puis la tétramérisation (l'assemblage des 2 dimères Nter) se faisant par une liaison covalente entre les cystéines 54 des différents monomères a été mise en évidence (Strauch et al. 2001). Cette cystéine et les résidus en aval de celle-ci n'avaient pas été inclus dans les travaux de cristallisation antérieurs.



Structure obsolète du dimère AbrB proposée en 2000

Figure 81

En 2005, cette équipe corrigea sa structure proposée en 2000 (Bobay et al. 2005) confirmant ainsi avec les travaux d'une équipe allemande qui avait proposé une autre structure pour le dimère (Coles et al. 2005). C'est en se calant sur la structure des petites protéines MraZ et MazE (MazE étant un régulateur d'*E.coli*), qui partagent de très fortes analogies de séquence avec AbrB, que les 2 équipes se rendirent compte de l'erreur initiale. En 2000, Cavanagh et al. décrivirent le dimère AbrB comme deux monomères juxtaposés, possédant de nombreuses interactions (liaisons hydrogènes) intramoléculaires, puis en découvrant les structures de MazE et MraZ, ils retravaillèrent leurs résultats et se rendirent compte que ces interactions étaient en fait intramoléculaires. Les 2 équipes se sont



Structure du dimère AbrB corrigée en 2000, et comparée à MazE et MraZ

Bobay et al 2005: Les deux monomère de AbrB, MazE et MraZ sont présentés respectivement en bleu, rose ou marron clair ou foncé. Coles et al. 2005 : Les deux monomères sont systématiquement représentés en vert clair et vert foncés et l'image a subit une rotation de 90° dans le plan de la feuille par rapport à Bobay et al. 2005. Le feuillet béta, important pour les liaisons électrostatiques inter-monomères est représenté en rouge, l'hélice alpha qui interagit avec l'ADN est représentée en jaune. Deux vues de chaque dimère sont représentées. Coles et al. 2005 montraient également la mauvaise structure de 2000 en comparaison de la nouvelle.

Figure 82

finalement accordées sur la structure d'AbrB. Plus tard, la cristallisation de la partie N-terminale de Abh, le deuxième homologue d'AbrB de *B. subtilis*, a été décrite (Bobay et al. 2006), puis celle du domaine N-terminal de SpoVT, le troisième homologue connu d'AbrB, ainsi que la façon dont le tétramère d'AbrB interagirait avec l'ADN (Sullivan et al. 2008). Le tétramère d'AbrB décrit dans ce dernier article contient des monomères d'AbrB limités à ses 55 résidus Nterminaux, incluant donc la cystéine et la capacité à tétramériser, le rôle du reste de la séquence d'AbrB n'a donc pas été évoqué. Les prochains paragraphes traitent de la structure des régulateurs AbrBs et de la façon dont ils interagiraient avec l'ADN.

2-1-3-2- Détail de la structure

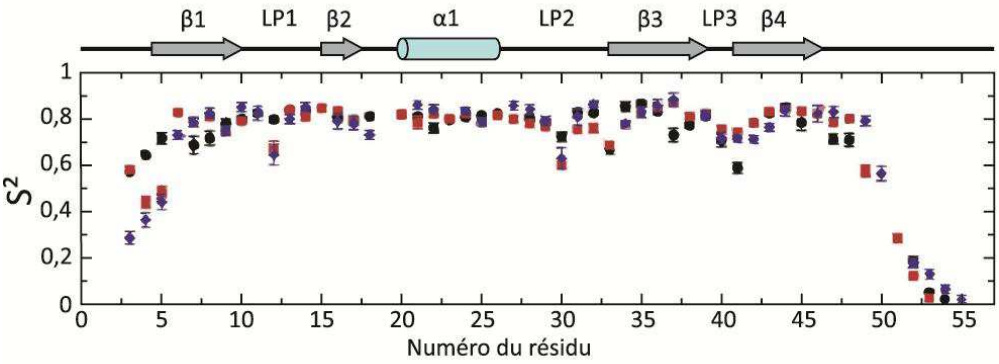
AbrB, Abh et SpoVT, les 3 protéines possédant un domaine AbrB chez *Bacillus subtilis*, forment des tétramères *in vivo*, la partie N-terminale étant responsable d'une première dimérisation par le biais d'interaction entre feuillets β, et la partie C-terminale de la seconde multimérisation par le biais d'une liaison covalente assurée par les cystéines (une par monomère). La partie N-terminale est particulièrement dédiée à l'interaction avec l'ADN et ne fonctionne que lorsque ce domaine de la protéine est effectivement sous-forme de dimère. Le domaine N-terminal comprend 4 feuillets β, une hélice α et 3 boucles. L'interaction moléculaire qui permet la dimérisation du domaine N-terminal est extrêmement forte, bien que non-covalente. Elle est assurée par des interactions étroites entre les feuillets β des 2 monomères (voir Fig 82) : les feuillets β1 et β2 du premier monomère interagissant avec les feuillets β3 et β4 de l'autre monomère. Parallèlement, plusieurs résidus des feuillets β2 et β4 interagissent par liaisons hydrogène avec leurs homologues du deuxième monomère et assurent ainsi cette interface de dimérisation particulièrement solide mais non covalente (Sullivan et al. 2008). Dans le détail, ce sont les résidus 44 et 46 du feuillet β4 qui interagissent avec leurs homologues 44' et 46' du feuillet β4', et le résidu n°16 du feuillet β2 qui interagit aussi avec le 16' du feuillet β2'. La structure de cet « échafaudage » protéique est semblable chez les 3 homologues AbrB, Abh et SpoVT, on notera cependant que quelques variations peuvent cependant se trouver, notamment chez SpoVT où on relève un résidu glycine en position 42, absent chez AbrB et Abh, qui décale le feuillet β4 et modifie ainsi quelque peu la structure de l'échafaud. Les zones les plus structurellement différentes entre les 3 AbrB-like sont constituées des 2 extrémités du domaine étudié ainsi que de la zone LP2 entre l'hélice α et le feuillet β3 (voir Fig 83).

L'hélice α serait quant à elle liée à la spécificité de l'interaction avec les différentes cibles. Effectivement, l'angle que forme l'hélice avec le feuillet β2 est différent dans les 3 différentes protéines.

Les résidus arginines 8, 15, 23 et 24 de l'hélice sont cruciaux au fonctionnement du régulateur AbrB (Sullivan et al. 2008). Les orientations de R8 et R15 semblent responsables de la spécificité des interactions des 3 régulateurs, en effet pour SpoVT, R8 est orienté différemment de pour AbrB et Abh, alors que, simultanément, R15 est orienté similairement chez SpoVT et Abh mais pas chez AbrB. Par contre les résidus R23 et R24 sont orientées de manière comparable dans les 3 régulateurs, semblant ainsi responsables du fonctionnement général du régulateur plutôt que de la spécificité de l'interaction avec l'ADN.

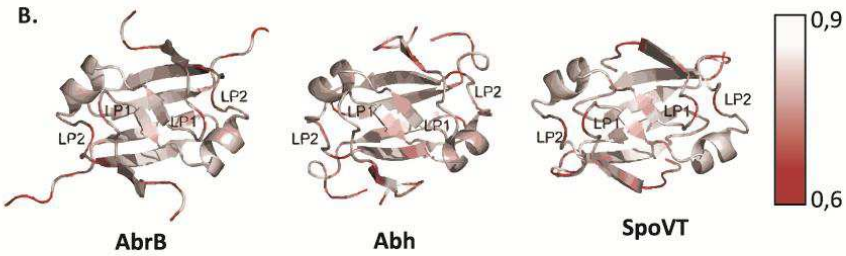
En surface, l'environnement électrostatique proche des arginines R23 et R24 est globalement positif chez les 3 régulateurs (Fig.83) critère favorable pour une interaction avec le squelette phosphate (négatif) de l'ADN. La répartition des charges électrostatiques est différente sur le reste des dimères mais peut également jouer un rôle important dans la spécificité des interactions.

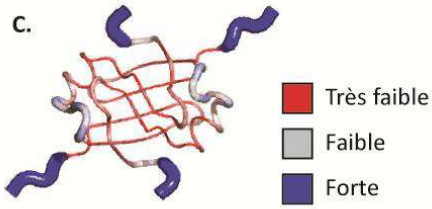
A. Structure du domaine Nter des AbrB-like chez *Bacillus subtilis*



Variations structurales du domaine AbrB
A. Le paramètre d'ordre S2 varie entre 0 et 1 avec une valeur proche de 1 représentant une liberté de mouvement totalement contrainte. AbrBN (carrés rouges) AbhN (cercles noirs) et SpoVTN (losanges bleus). **B.** Le paramètre d'ordre rapporté sur les structures modélisées d'AbrBN, AbhN et SpoVTN. le rouge rosé indique les résidus ayant un haut degrès de liberté, le blanc indique les résidus les plus structurés/contraints. **C.** Variation moyenne de la structure du domaine AbrB chez AbrBN, AbhN et SpoVTN.

D'après Sullivan et al 2008

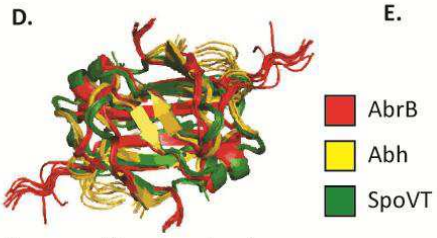




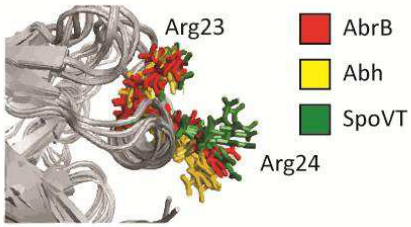
Variations moyennes de la structure des 3 AbrB

Structure des domaines AbrB
D. Superposition des structures modélisées des 3 domaines Nterminaux des 3 régulateurs AbrB (rouge), Abh (jaune) et SpoVT (vert). **E.** Orientation statistique des arginines 23 et 24, résidus importants pour la fixation/reconnaissance de l'ADN. **F.** Charges électrostatiques à la surface des 3 régulateurs, vue de "dessus" du domaine d'AbrB (idem qu'en B., C. et D. Une charge positive (en bleu) est favorable à une interaction avec le squelette phosphate négatif de l'ADN.

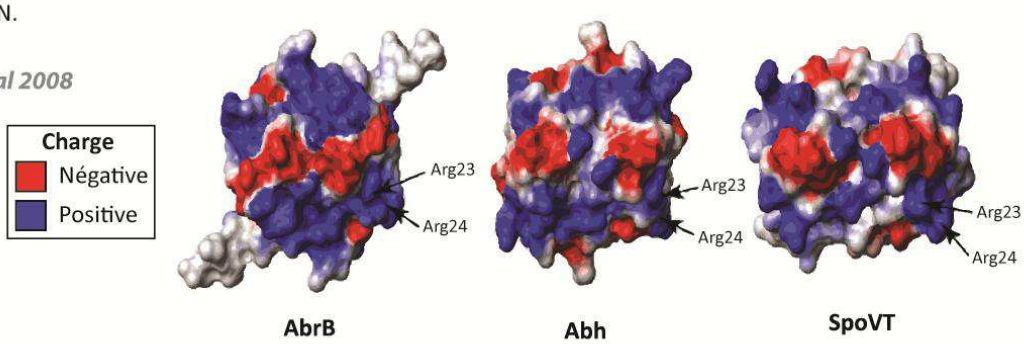
D'après Sullivan et al 2008



Superposition des structures des 3 domaines AbrB



Orientations des Arg 23 et 24

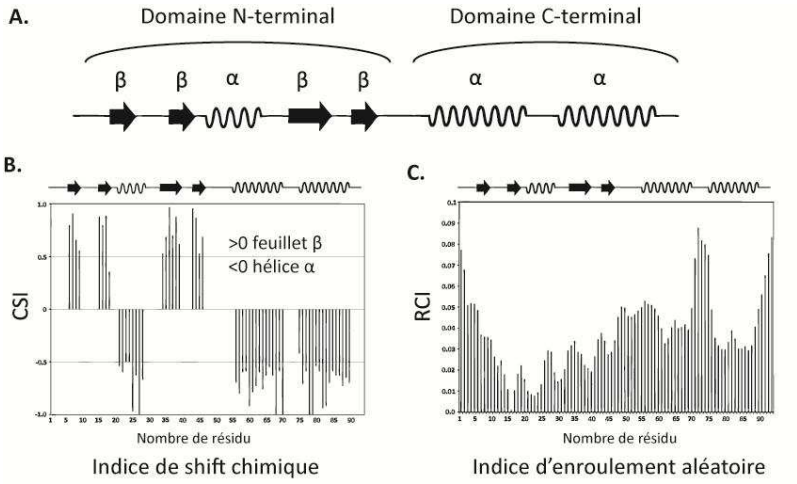


F. Charges électrostatiques à la surface des 3 régulateurs

Figure 83

Depuis, il a été démontré que les parties C terminales d'AbrB, Abh et SpoVT ne semblent pas jouer de rôle dans l'activité régulatrice de ces protéines (Yao et al. 2005). En effet, le domaine N-terminal d'AbrB chimériquement lié à n'importe lequel des 3 domaines C-terminal d'AbrB, Abh ou SpoVT induisait de la même manière un promoteur sensible à la fixation d'AbrB, ils avaient également vérifié en contrôle que le domaine N-terminal seul ne produisait pas cet effet, prouvant de par le fait que c'était la tétramérisation qui était primordiale, plus que la nature de la partie C-terminale, à l'activité régulatrice de la protéine. Leurs travaux ont également conclut à l'état tétramère des 3 régulateurs *in vivo*.

SpoVT et AbrB partagent 65% d'identité de séquence dans leur domaine N-terminal mais présentent pourtant des affinités avec l'ADN très différentes (Coles et al. 2005): SpoVT est en effet un facteur tardif de la sporulation qui module l'activité de transcription dépendante de σ_G à l'intérieur de la préspore. Le domaine C-terminal de SpoVT est beaucoup plus structuré et déterminant pour les structure et fonction du domaine N-terminal que celui d'AbrB. Ce domaine C-terminal partagerait certaines homologies avec un domaine GAF ou PAS, et les auteurs supposent ainsi que SpoVT-C serait un site effecteur d'une petite molécule liée aux processus de la sporulation (Coles et al. 2005).



Structure d'AbrB de *B.anthracis* (100% d'homologie avec AbrB de *B.subtilis*)
A. La position des différents éléments structurels: domaine AbrB ββαββ en Nterminal, 2 hélices α en Cterminal. **B.** Indice de shift chimique (CSI) des résidus: une valeur négative indique un feuillet β et positive une hélice α. **C.** Indice d'enroulement aléatoire (RCI) des résidus, indique la flexibilité de la protéine aux domaines structurés déterminés par le CSI.

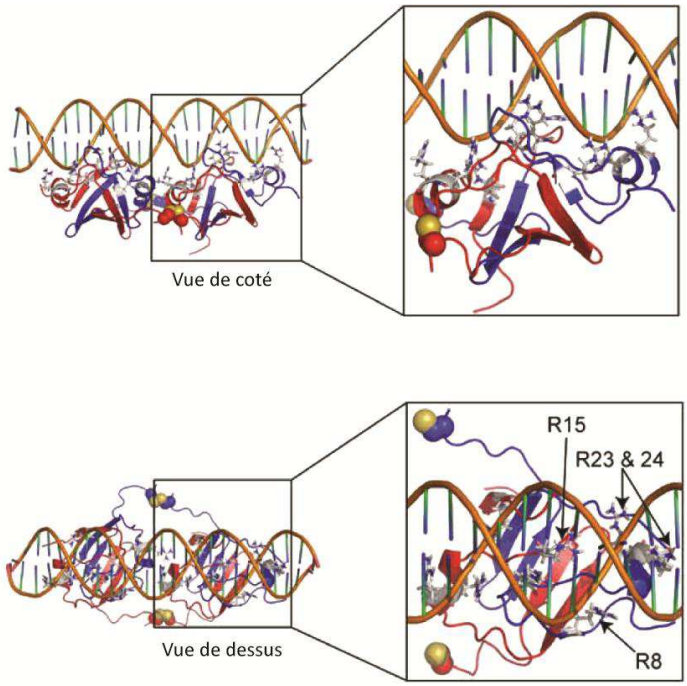
d'après Olson et al 2011

Figure 84

Le domaine C-terminal d'AbrB est bien plus court que celui de SpoVT, et moins structuré, mais possède néanmoins deux hélices α récemment observées par RMN chez la protéine AbrB de *Bacillus anthracis* qui présente 100% d'homologie sur les 62 premiers résidus de la zone N-ter et 80% d'homologie sur la séquence complète avec AbrB de *B.subtilis* (voir Fig 84, Olson et al. 2011). Les auteurs que ces 2 hélices permettent de favoriser la structure tétramérique, et simultanément, le relativement haut niveau d'enroulement aléatoire mesuré sur la partie C-terminale (particulièrement entre les 2 hélices α) serait, lui, caractéristique de la flexibilité potentielle de cette zone qui permettrait à la protéine de changer de conformation à l'approche de l'ADN cible afin de mieux le reconnaître.

2-1-4- Interaction d'AbrB avec l'ADN

Dans leurs travaux récents, l'équipe de Cavanagh a commencé l'analyse la structure des tétramères « AbrB-like ». Pour cela ils ont inclus la cystéine et l'acide aminé suivant (une glutamine pour AbrB) dans leur étude. La protéine peut ainsi tétramériser par liaison disulfure. La structure RMN de ce tétramère ne montrant pas de différence fondamentale avec la structure des dimères, ils ont décidé de modéliser la cristallisation du régulateur en présence de l'ADN cible.

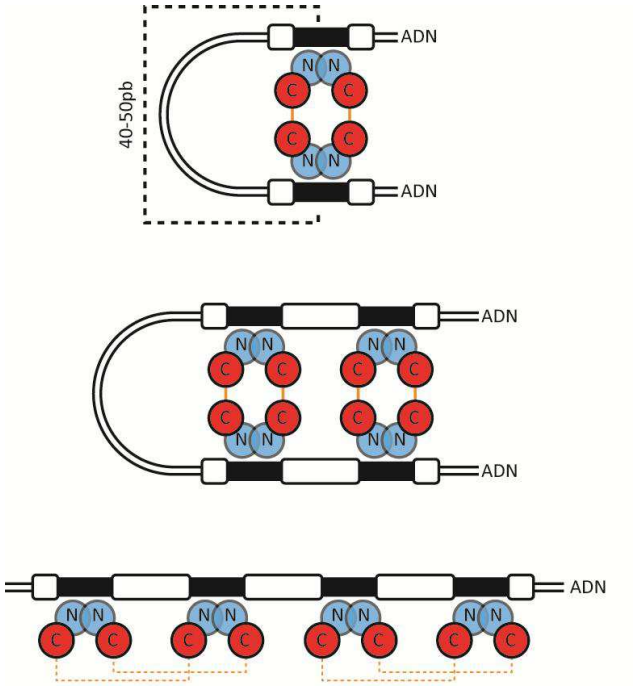


Interaction entre domaine AbrB et ADN
Les tétramères manquent la fin de leur domaine Cterminal mais comporte nénanmoins la cystéine permettant de tétramériser (sphères jaune). Rouge et bleus représentent les 2 monomère imbriqués en un dimère, le pont cystéine relie 2 dimères.

D'après Sullivan et al 2008

Figure 85

Figure 86



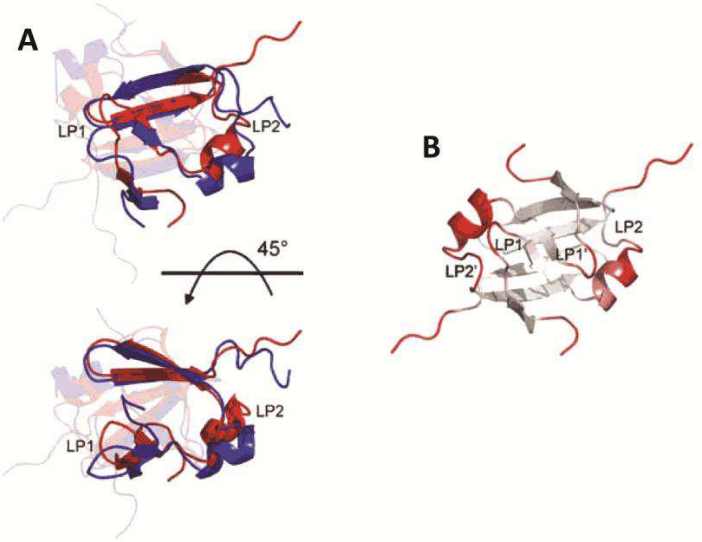
3 possibilités d'interaction entre tétramères AbrB et ADN
L'interaction entre domaines Nter est assurée par interactions entre feuillets β du domaine AbrB. Les liaisons entre domaines Cter sont assurées par un pont disulfure entre les cystéines (1 cystéine par monomère). AbrB reconnait une structure tridimensionnelle de l'ADN

D'après Sullivan et al 2008

Jusqu'à aujourd'hui il a été totalement impossible d'identifier une séquence d'acides nucléiques d'interaction préférentielle d'AbrB avec ses ADN cibles. Quelques travaux ont bien tenté de proposer des séquences, mais aucune équipe n'a pu trouver un consensus car la plupart des motifs proposés suite à des expériences *in vitro* n'ont pas pu être confirmés *in vivo.* Un motif très faible TGGNA-N_5-TGGNA a cependant été proposé (Sullivan et al. 2008). Aujourd'hui, la majorité de la communauté scientifique s'accorde à penser que les régulateurs de la famille AbrB préfèreraient en fait interagir avec des conformations tridimensionnelles spécifiques de l'hélice d'ADN comme des structures en épingle à cheveux (« hairpins », Phillips et Strauch 2002, Bobay et al. 2004, Bobay et al. 2006, Chumsakul et al. 2011). Structures qu'ils reconnaitraient et renforceraient en partie, voir Fig 86 pour un modèle des interaction possibles entre un tétramère et l'ADN

L'équipe de Cavanagh et al. a modélisé l'interaction entre la zone N-terminale d'AbrB et un fragment d'ADN connu pour être une cible d'interaction privilégiée avec AbrB (un fragment de son propre promoteur). D'après cette modélisation, les protéines à domaine AbrB changent légèrement de conformation lorsqu'ils se rapprochent de la séquence d'ADN : la flexibilité des loops 1, 2 et 3 permet de favoriser les interactions entre les acides aminés et les bases nucléotidiques. La figure 87 montre particulièrement que les changements conformationnels les plus importants lors de la fixation à l'ADN concernent les loops 1 et 2 ainsi que l'hélice α (Sullivan et al. 2008).

Figure 87



Changements conformationnel d'AbrB en interaction avec l'ADN
A. Superposition d'AbrB (partie Nter) modélisé sans l'ADN (en rouge) et avec l'ADN (en bleu). Un seul monomère est montré par soucis de clarté **B.** Un dimère AbrB (Partie Nter). Sont représentée les parties qui varient beaucoup lors de l'interaction avec l'ADN (en rouge) ou peu (en blanc).
Sullivan et al. 2008

Les travaux de Chumsakul et al. 2011 décrivent comme probable, mais de rôle non-capital, la formation d'hétérodimères AbrB-Abh. Ces hétéro-multimères pourraient ainsi moduler l'effet transcriptionnel d'AbrB sur ses gènes cibles.

2-1-5- Autres représentants de la famille AbrB

2-1-5-1- Généralités

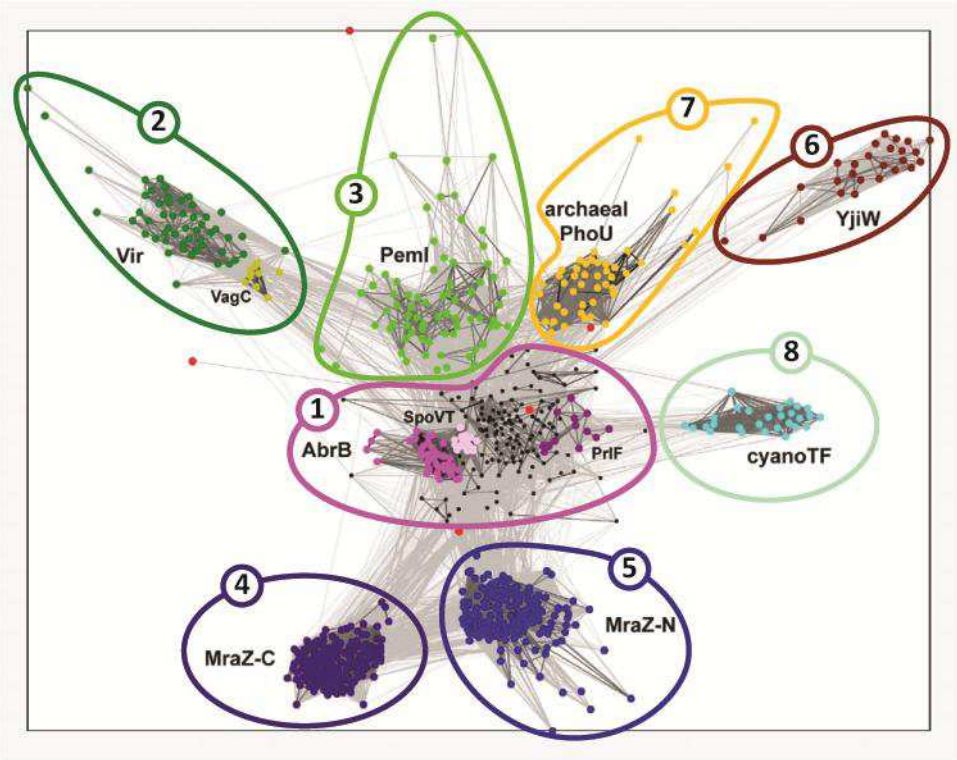
La compréhension des rôles et activités des domaines « AbrB-like » dans divers organismes est importante. En effet, lorsqu'on cherche à caractériser un des membres hypothétiques de superfamilles aussi vastes, s'intéresser aux rôles des autres membres de la famille permet souvent d'orienter les recherches. On remarquera cependant que cette vérité a ses limites, comme par exemple dans le cas de LexA dont l'homologue cyanobactérien présente de très claires différences de rôle et de fonctionnement.

En 2005, près de 724 séquences d'acides aminés qui présentent des ressemblances avec AbrB ont été identifiées dans 580 protéines uniques (certaines protéines présentant 2 domaines dans une même séquence : les MraZ N-ter et C-ter que l'on voit distinctement sur la figure 88). Ces homologues d'AbrB identifiés par bioinformatique forment ainsi 8 groupes distincts, dont un concerne des protéines d'archées et un autre, qui nous intéresse tout particulièrement et qui est le moins détaillé et exploré à ce jour, ***traite des protéines AbrB-like de cyanobactéries*** (Coles et al. 2005).

Les 580 protéines répertoriées dans cette étude présentent leur domaine AbrB en N-terminal, à l'exception des MraZ, et de quelques autres, qui présentent 2 domaines sur une seule séquence peptidique, séparés par une hairpine d'hélices α (voir Fig 82). Les MraZ seraient ainsi le fruit d'une fusion de 2 gènes AbrB-like (groupes 4 et 5, voir plus loin).

Par ailleurs, plusieurs de ces groupes concernent des systèmes toxine/antitoxine ou de maintenance de plasmides qui semblent ainsi suffisamment fréquents pour ne pas les exclure des modes de fonctionnement probables des AbrB-like cyanobactériens (la question sera effectivement traitées plus loin).

2-1-5-2- Les 8 groupes de la famille des « AbrB-like »



Les 8 groupes de protéines de la superfamille d'AbrB

Figure 88 *D'après Coles et al 2005*

Le **groupe principal (n°1)** concerne AbrB et ses plus proches homologues (comme Abh), un deuxième sous-cluster de ce même groupe comporte les homologues de SpoVT (qui possèdent un domaine C-terminal plus structuré qu'AbrB). Ce groupe principal est assez diffus car les organismes représentés s'étalent des bactéries aux archées. Un troisième sous-cluster est également identifiable dans ce groupe : les homologues de PrlF (protéobactéries). PrlF améliore l'activité de la protéase Lon, et est également un suppresseur des mutants thermosensibles de la protéase HtrA. Dans de nombreux génome PrlF est aussi couplée traductionnellement à un homologue de YhaV de *E.coli* qui montre de significatives homologies avec un système toxine/antitoxine qui pourrait être impliqué dans la régulation de la traduction. Les systèmes toxine/antitoxine sont souvent impliqués dans les processus de maintien des plasmides ou de mort cellulaire programmée des procaryotes : les antitoxines (instables) servent de régulateurs transcriptionnels d'opérons et inhibent simultanément les toxines (stables) par la formation d'un complexe. Lorsque l'antitoxine se dégrade et n'est pas remplacée, la toxine accomplit son rôle et tue généralement la cellule, créant ainsi souvent des mécanismes de dépendance génique aux clusters toxine/antitoxine. Dans le cas de ce groupe, la toxine ressemblerait à RelE, un bactériostatique, qui agit comme un inhibiteur global de la traduction lorsque la cellule est en stress nutritif, le but étant de diminuer la mortalité cellulaire en diminuant les besoins nutritifs de la cellule (Bogild et al. 2012).

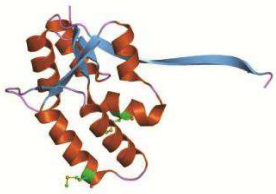
Mécanisme d'addiction toxine/antitoxine :

Généralement, les deux gènes sont co-transcrits en opéron. La toxine stable est inhibée par une antitoxine (antidote) instable. Ce système, souvent porté par des plasmides, leur permet de se maintenir dans les cellules et d'être transmis aux cellules filles efficacement.

Le complexe toxine/antitoxine réprime les gènes codants ces deux éléments. Lorsque l'antidote (instable) est dégradé par les protéases, le complexe toxine/antidote est détruit et la toxine (stable) va endommager la cellule parfois jusqu'à la mort cellulaire. Ce faisant, la répression sur l'opéron est levée et la cellule peut à nouveau synthétiser l'antidote, mais encore une fois au prix d'une synthèse de toxine. La cellule est ainsi forcée de maintenir le plasmide et tous les autres gènes qu'il comporte. Mais le mauvais équilibre entre les quantité de toxine et d'antidote, combiné aux différences de stabilité des deux protéines conduit à la mort programmée de l'organisme.

La transmission des plasmides aux cellules filles est assurée par la division cellulaire : les cellules filles héritent obligatoirement des toxines du cytoplasme de la cellule mère, et si elles n'ont pas pu intégrer le plasmide permettant la synthèse de l'antidote, elles seront rapidement tuées.

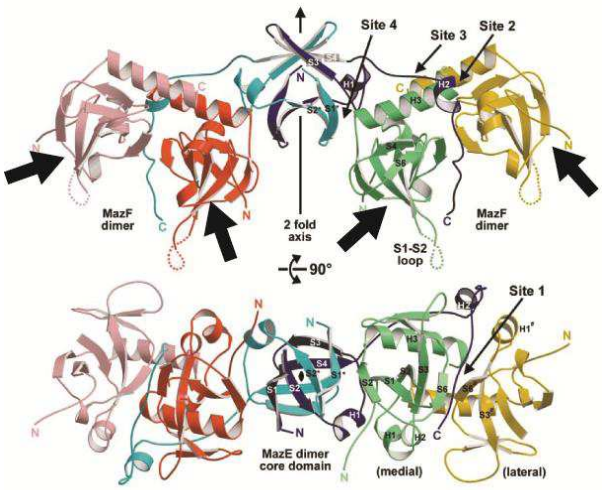
Figure 89



Domaine PIN

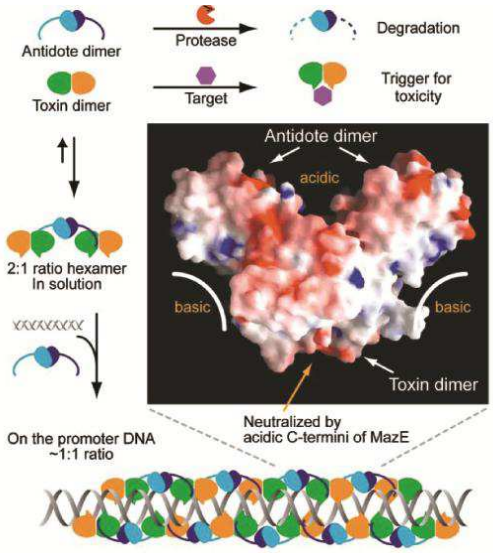
Le **groupe n°2** comporte également plusieurs facteurs de transcription impliqués dans le maintien de plasmides de virulence par des procédés d'addiction (toxine/antitoxine). Dans ce groupe on retrouve VapB de *Dichelobacter nodosus*, MvpT de *Shigella flexneri*, VppA d'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* et VagC des *Salmonella* (sous-cluster distinct du groupe). Les toxines impliquées dans cette famille sont toutes liées au domaine N terminal de PilT (PIN). Par exemple, dans le cas de VapB, VapB est un inhibiteur transcriptionnel contenant un domaine de fixation à l'ADN similaire à Abrb et VapC est la toxine correspondante : une ribonucléase à domaine PIN. Lorsque VapB se détériore, la ribonucléase VapC est libre d'exercer son activité toxique dans la cellule.

Le **groupe n°3** contient également des facteurs toxine/antitoxine, mais les toxines ne font pas partie des 2 précédents groupes RelE et PIN. Le complexe MazE/MazF est représentatif de ce groupe. MazE est l'antitoxine de MazF, et ce dernier possède une forte activité endonucléase clivant l'ARNm au niveau de sites spécifiques (Kamada et al. 2003 voir mécanisme Fig 90). Quelques membres de ce groupes ont toutefois des toxines légèrement différentes.



Complexe MazE/MazF

Domaine AbrB de fixation à l'ADN



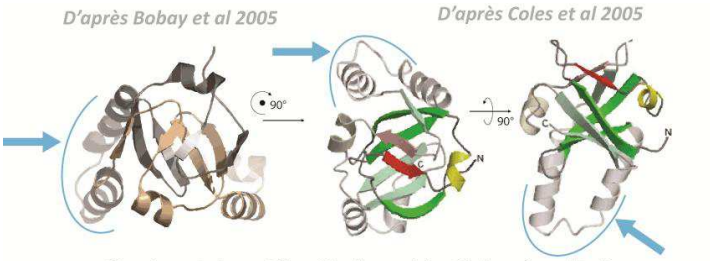
Mécanisme de l'addiction toxine/antitoxine de MazE/MazF

MazF contient le domaine AbrB qui se fixe à l'ADN lorsque l'antidote MazE est présent. Si MazE est dégradée, MazF va pouvoir exercer son effet toxique sur la cellule.

D'après Kamada et al 2004

Figure 90

Comme évoqué plus haut, les **groupes n°4 et 5** constituent les 2 groupes exhibant les 2 domaines AbrB-like de MraZ. Cette classe de protéine, largement étudiée chez *E.coli* mais également très répandue parmi les autres bactéries, est le premier gène du cluster génomique impliqué dans la division cellulaire et les parois cellulaires (constitué de 16 gènes chez *E.coli*). La fonction de MraZ est encore inconnue. L'étude de Coles et al. 2005 suggère que cette protéine jouerait le rôle de régulateur transcriptionnel du cluster, mais personne à ce jour n'a pu confirmer cette hypothèse. MraZ constitue en tout cas un cas particulier parmi les protéines AbrB-like car les 2 sous-unités normalement nécessaires pour le bon repliement du dimère sont ici fusionnées en une seule chaîne peptidique. Les 2 dimères sont séparés par une séquence plutôt longue faisant la jonction et constituée d'une hairpine d'hélices α (premièrement cristallisée depuis *Mycoplasma pneumoniae*, *Chen et al. 2004*).

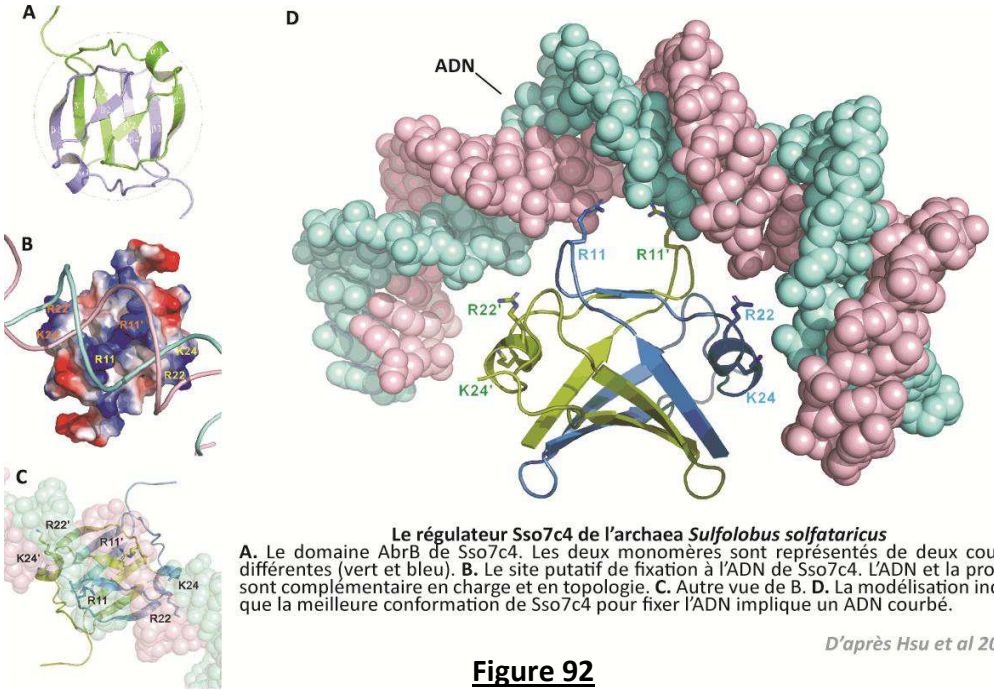


Structure de la protéine MraZ possédant 2 domaines AbrB.
Chez Bobay et al (à gauche) les deux domaines AbrB sont représentés en marron clair et foncé. Chez Coles et al. 2005, ils sont en vert foncé et vert clair. La flèche bleue indique la hairpine d'hélice alpha reliant les 2 domaines AbrB du peptide.

Figure 91

Les protéines du **groupe n°6** sont quasi exclusivement issues de protéobactéries (Une protéine d'*Enterococcus faecalis* faisant exception) et sont nommées en référence à YjiW de *E.coli*. Une grande partie de ces protéines apparaissent dans un arrangement génique conservé évoquant une structure prophage ou d'élément mobile (il contient des recombinases et intégrases). Dans certains cas comme chez *Erwinia carotovora*, on note que la protéine AbrB-like est précédée d'une autre protéine à 2 domaines AbrB-like séparés par une structure en épingle à cheveux (comme MraZ) mais présentant également une disparition du deuxième feuillet β de la deuxième copie. Il s'agit du seul groupe qui combine des protéines homodimériques et monomériques simple-chaîne d'AbrB-like.

Le **groupe n°7** concerne exclusivement des protéines d'archées qui possèdent toutes un domaine AbrB like en N-terminal, suivi d'un domaine central d'activité inconnue puis de deux éléments PhoU en C-terminal. PhoU, initialement décrit dans les protéobactéries où il se trouve également dans les opérons liés aux systèmes de transport spécifique du phosphate, aurait, chez les archées, fusionné avec un domaine AbrB-like afin de réguler transcriptionnellement cette fonction en raison de l'absence des 2 gènes PhoRB qui assurent cette fonction.



Le régulateur Sso7c4 de l'archaea *Sulfolobus solfataricus*
A. Le domaine AbrB de Sso7c4. Les deux monomères sont représentés de deux couleurs différentes (vert et bleu). **B.** Le site putatif de fixation à l'ADN de Sso7c4. L'ADN et la protéine sont complémentaire en charge et en topologie. **C.** Autre vue de B. **D.** La modélisation indique que la meilleure conformation de Sso7c4 pour fixer l'ADN implique un ADN courbé.

D'après Hsu et al 2011

Figure 92

Par ailleurs, il a récemment été découvert chez les archées une nouvelle classe de protéines portant un domaine AbrB. Sso7c4 n'a pas de fonction biologique connue ni de consensus de reconnaissance déterminé, mais le fait qu'il courbe l'ADN dans leurs modélisations laisse penser les auteurs qu'il pourrait s'agir d'une protéine de chromatine (voir Fig 92. Hsu et al. 2011).

Le dernier **groupe (n°8)** concerne exclusivement des protéines de cyanobactéries. En 2005, la totalité d'entre elles étaient annotées hypothétiques et l'équipe de Coles et al. les décrivaient comme « liées aux sous-unités du cytochrome C et à la riboflavine synthase », sans réellement savoir pourquoi. Parmi toutes les protéines identifiées par bioinformatique, 5 séquences de *Synechocystis* présentent des domaines similaire à AbrB : *sll0822*, *slr0724*, *ssl1300*, *ssr2922* et *ssr7040* (la dernière étant portée par un plasmide). Toutefois il est mentionné dans l'article que d'avantage d'homologues pourraient être trouvés en prenant comme point de départ une autre référence que la séquence d'AbrB de *Bacillus subtilis*, et effectivement il s'avère que *Synechocystis* possède bien au moins un sixième gène codant pour une protéine similaire à AbrB: *sll0359*, qui n'a pas été dégagée par leur programme, c'est d'ailleurs étonnant car c'est bien *sll0359* et *sll0822* qui présentent le plus d'homologie avec une structure AbrB-like et entre eux (détaillé dans le paragraphe suivant).

On retiendra que la protéine AbrB est en fait caractérisée par son mécanisme d'interaction très particulier avec l'ADN (son domaine de fixation reconnait généralement des structures secondaires de l'ADN plutôt que des consensus nucléotidiques), ainsi que par son rôle physiologique particulier (lors de l'état de transition ou lorsque l'environnement varie brusquement). Le régulateur AbrB de *Bacillus subtilis* est au centre de mécanismes très complexes de régulation, il réprime notamment le phénomène de sporulation qui se déroule lors de l'état de transition : quand les cellules passent d'une phase où les nutriments abondent vers une phase où ils viennent à manquer, le régulateur AbrB cesse de réprimer les gènes de la sporulation et d'autres métabolismes importants, pour permettre à la cellule de s'adapter. Par bioinformatique, le domaine de fixation à l'ADN AbrB permet de dessiner une superfamille de protéines possédant une structure similaire chez de nombreuses bactéries.

Par ailleurs, certains régulateurs AbrB fonctionnent dans des systèmes toxine/antitoxine et assurent le maintien de plasmides dans les organismes (la protéine contenant le domaine AbrB étant généralement la toxine comme c'est le cas pour MazE), et d'autres sont de simples régulateurs qui interviennent dans des mécanismes très régulés et encore peu compris de la cellule.

Si on admet l'existence d'un lien structure-fonction chez les protéines de la superfamille AbrB - notamment entre la façon dont les régulateurs reconnaissent l'ADN, la manière dont ils détectent les variations environnementales, et la fonction des gènes régulés - alors on peut extrapoler et s'attendre à ce que des régulateurs de la même superfamille qu'AbrB régulent plutôt des gènes impliqués dans l'adaptation rapide à des environnements changeants. Cette idée pourra être pertinente à garder à l'esprit pour l'exploration des fonctions des AbrBs cyanobactériens qui font l'objet de cette thèse.

En effet, nous allons voir que le régulateur Sll0822 (du groupe n°8) est notamment impliqué dans la régulation de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp. PCC6803, enzyme dont la fonction pourrait être l'évacuation d'électrons excédentaires dans des conditions spécifiques.

2-2- CyAbrBs, des protéines de cyanobactéries possédant des domaines AbrB

Chez les cyanobactéries, plusieurs protéines contiennent des domaines AbrBs. Certaines d'entre elles constituent un groupe de protéines spécifiques de ces organismes et unique dans le règne vivant: les CyAbrBs.

2-2-1- « AbrB-like » de cyanobactéries et CyAbrBs.

L' analyse des 58 génomes cyanobactériens séquencés, ont mis en évidence l'existence de 2 familles de protéines spécifiques et partagées uniquement des cyanobactéries (spécifiques avec un seuil de BLASTP e<0,01, Larsson et al. 2011). L'une de ces 2 familles concerne des régulateurs transcriptionnels de petite taille appartenant à la superfamille des protéines possédant un domaine de reconnaissance de l'ADN similaire à celui d'AbrB de *Bacillus subtilis*. Aujourd'hui les protéines de ce groupe sont appelées « Cal » (pour : « Cyanobacterial AbrB like »), « CyAbrB » ou encore « AbrB » selon les auteurs. Ils sont tous trouvés spécifiquement chez les cyanobactéries.

Il est important de noter qu'en fait, chez les cyanobactéries, on trouve plusieurs groupes de protéines présentant un domaine AbrB reconnaissant l'ADN mais que tous ces groupes ne sont pas aussi particulier que celui décrit par Larsson et al. 2011.

C'est l'équipe d'Ishii et Hihara 2008 qui a remarqué que ces protéines désormais d'appelées « CyAbrBs », présentent une particularité structurelle assez surprenante en comparaison des AbrBs connus par ailleurs. Effectivement, dans ces régulateurs, le domaine AbrB est situé à la fin du C-terminal, et non en N-terminal comme c'est le cas pour les 7 groupes d'AbrB évoqués au paragraphe 2-1-5 de ce chapitre. La position du site de fixation à l'ADN contenant les feuillets β se retrouve ainsi à la fin de la chaîne polypeptidique. Les causes et conséquences du déplacement du domaine de reconnaissance de l'ADN sont encore inconnues, mais on peut imaginer aisément que cela n'a pas un effet neutre sur le mécanisme de fonctionnement de ces régulateurs. C'est cette position atypique du domaine AbrB qui constitue la particularité de ce groupe des CyAbrBs.

Ainsi, on fera dès à présent clairement la distinction entre les « CyAbrBs » qui forment ce groupe de régulateurs spécifique des cyanobactéries, objet de cette thèse, avec le domaine AbrB en C-terminal ; et les « simples » protéines « AbrB-like », qui constituent l'ensemble des autres protéines des cyanobactéries qui ont un domaine AbrB en N-terminal, comme le AbrB « originel ». A titre indicatif, chez *Synechocystis* sp. PCC6803, il y a deux CyAbrBs codés par le chromosome (*sll0359* et *sll0822*) et 4 autres protéines présentant un domaine AbrB-like en N-terminal, dont une est portée par un plasmide (*slr0724*, *ssl1300*, *ssr7040* et *ssl2922*) (Ishii et Hihara 2008, Larsson et al. 2011).

Un article récent a étudié plusieurs systèmes de toxine/antitoxine de *Synechocystis.* Le cluster *ssr7040/slr7041*, situé sur le plasmide pSYSA, y joue un rôle de toxine/antitoxine avec Ssr7040 dans le rôle de l'antitoxine se fixant à l'ADN (Kaupfmann et Hess 2013), ils évoquent également une autre protéine du même plasmide qui porterait un domaine AbrB : Ssr7048.

Concernant maintenant les CyAbrBs, relativement peu de travaux à ce jour ont été menés sur ces protéines cyanobactériennes. On peut cependant trouver quelques informations, réparties dans 8 articles qui sont tous postérieurs à 2008 et dont 3 sont sortis après le début de mes travaux :

Oliveira et al. **2008**	*An AbrB-Like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in Synechocystis sp. strain PCC 6803.*
Shalev-Malul et al. **2008**	*An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by Aphanizomenon ovalisporum.*
Ishii et al. **2008**	*An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in Synechocystis sp. PCC 6803.*
Liemann-Hurwitz et al. **2009**	*A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO_2 by modulating low-CO_2-induced gene expression.*

Agervald et al. **2009**	*CalA, a cyanobacterial AbrB protein, interacts with the upstream region of hypC and acts as a repressor of its transcription in the cyanobacterium Nostoc sp. Strain PCC7120*

Parus après le début de ma thèse en 2009:

Agervald et al. **2010**	*The CyAbrB transcription factor CalA regulates the iron superoxide dismutase in Nostoc sp. strain PCC 7120.*
He et Xu **2010**	*CalA, a cyAbrB protein, binds to the upstream region of ftsZ and is down-regulated in heterocysts in Anabaena sp. PCC 7120*
Yamauchi et al. **2011**	*Physiological roles of the cyAbrB transcriptional regulator pair Sll0822 and Sll0359 in Synechocystis sp. strain PCC 6803.*

Remarque : un autre article, plus ancien, traitait également de la découverte d'une protéine interagissant en amont de la RuBisCO, mais à l'époque il n'était pas fait mention du caractère « CyAbrB » de la protéine découverte (la simple identification étant le seul objet de l'article) :

Onizuka et al. **2002**	*CO_2 response element and corresponding trans-acting factor of the promoter for Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase genes in Synechococcus sp. PCC7002 found by an improved electrophoretic mobility shift assay.*

2-2-2- Particularités des CyAbrBs.

Ce paragraphe établit un résumé des connaissances contenues dans les 8 articles précédents.

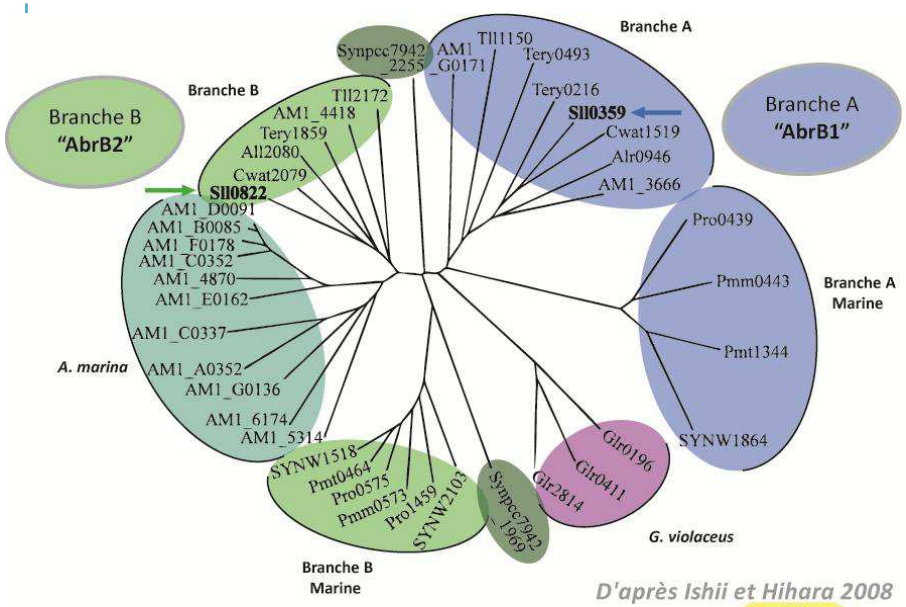
2-2-2-1- Structure des CyAbrBs.

Comme évoqué un peu plus haut, toutes les cyanobactéries dont le génome est séquencé présentent des CyAbrBs. Plus précisément, en 2008, Ishii et Hihara ont rapporté que, souvent, les cyanobactéries en possédaient au moins deux, et que dans ce cas les deux régulateurs paralogues constituaient deux branches phylogénétiques distinctes mais néanmoins proches (plus de 50% d'homologie entre les 2 branches). Ces deux branches, qu'ils ont baptisées A et B, décrites dans leurs travaux sont rebaptisées « AbrB1 » et « AbrB2 » dans ma thèse (voir Fig 93).

Les japonais précisaient en 2008 qu'on pouvait aussi trouver quelques autres cyanobactéries avec plus de deux CyAbrBs (Ishii et Hihara 2008). Sur les 32 espèces au génome connu à l'époque, 23 espèces présentaient les 2 régulateurs AbrB1 et AbrB2, 6 espèces en présentaient 3, *Synechococcus* sp. CC9902 4 gènes, *Synechococcus* sp CC9605 5 et finalement *Acaryochloris marina* (qui possède un très grand génome et de nombreux plasmides) présente en tout 14 protéines CyAbrBs, deux dans la branche AbrB1, une dans la branche AbrB2, et 11 autres qui forment un troisième groupe distinct mais phylogénétiquement plus proche d'AbrB2 que d'AbrB1 (voir Fig 93).

Ainsi, comme évoqué dans le précédent paragraphe, *Synechocystis* sp. PCC6803 fait partie du groupe ne possédant que deux CyAbrBs : Sll0359 (AbrB1) et Sll0822 (AbrB2). On note aussi que les deux cyanobactéries *Gloeobacter violaceus* PCC7421 et *Synechococcus elongatus* PCC7942 possèdent des CyAbrBs, mais formant des petits embranchements phylogénétiques isolés des gros regroupements. Les japonais remarquaient également que les espèces marines forment des branches AbrB1 et AbrB2 légèrement différentes de celles des non-marines, la particularité des séquences trouvées chez les CyAbrBS des cyanobactéries marines étant la disparition d'une dizaine de résidus en N-terminal. Aujourd'hui, davantage de génomes sont connus, une recherche d'homologie sur la base de donnée MBGD (Microbial Genome Database) cantonnée aux seules cyanobactéries permet de

Figure 93



D'après Ishii et Hihara 2008

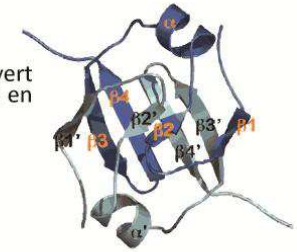
Gauche: Les deux branches philogénétiques de CyAbrB: AbrB1 et AbrB2

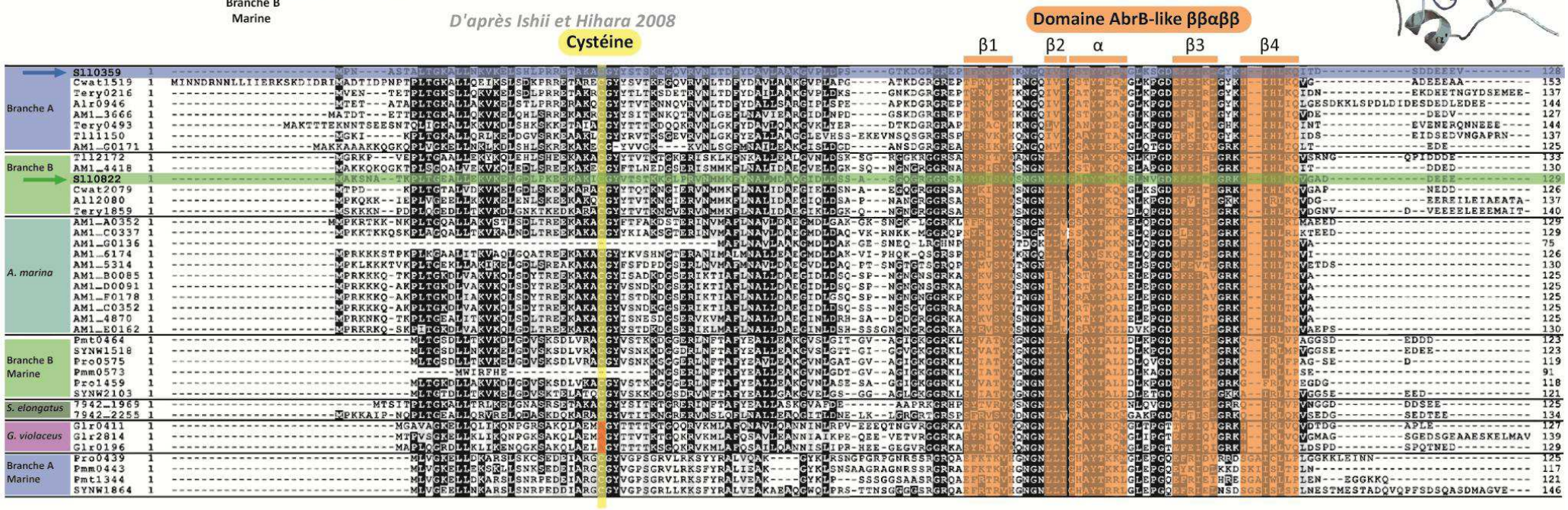
Les branches A (AbrB1) et B (AbrB2) sont représentées en bleu et vert (respectivement). Les autres codes couleur de la figures représentent des branches plus éloignées de régulateurs AbrB.

Synechocystis sp. PCC6803: Sll0822 et Sll0359
Crocosphaera watsonii WH8501: Cwat2079 et Cwat1519
Synechococcus elongatus PCC7942: Synpcc7942_2255 et Synpcc7942_1969
Thermosynechococcus elongatus BP-1: tll2172 et tll 1150
Gloeobacter violaceus PCC7421: glr0411, glr0196 et glr2814
Anabaena sp PCC7120: all2080 et alr0946
Synechococcus sp WH8102: SYNW2103, SYNW1518 et SYNW1864
Prochlorococcus marinus SS120: Pro-0575, Pro-1459 et Pro0439
P.marinus MED4: PMM0573 et PMM0443
P.marinus MIT9313: PMT0464 et PMT1344
Trichodesmium erythraeum IMS101: Tery1859, Tery0493 et Tery0216
Acaryochloris marina MBIC11017: AM1_4418, AM1_5314, AM1_4870, AM1_E0162, AM1_A0352, AM1_B0085, AM1_C0337, AM1_C0352, AM1_D0091, AM1_6174, AM1_F0178, AM1_3666, AM1_G0171 et AM1_G0136

Bas: Alignement de CyAbrB

Sll0359 (AbrB1) et Sll0822 (AbrB2) sont surlignées en bleu et en vert (respectivement). Le domaine AbrB, en Cterminal des séquences, est surligné en orange. La cystéine, quasi ubiquitaire, est surlignée en jaune.
La structure du domaine AbrB (forme dimère) est rappelée à droite.





D'après Ishii et Hihara 2008

trouver 84 CyAbrBs parmi 41 génomes séquencés. Plusieurs cyanobactéries ne comportent qu'un seul CyAbrB (l'algorithme pouvant être en cause). Les deux groupes AbrB1 et AbrB2 se retrouvent agrandis, le groupe nommé par les japonais « branche marine B » est également très étoffé, mais les 4 gènes de la « branche marine A » ne sont plus retrouvés par la base de donnée, ne laissant ainsi plus que trois groupes majeurs et quelques satellites. La figure 97, amenée au paragraphe suivant (2-2-2-2), montrera ces changements depuis 2008 ainsi que quelques autres informations intéressantes.

L'ensemble de ces protéines a son domaine AbrB en C-terminal plutôt qu'en N-terminal, particularité en faisant un groupe unique dans le règne vivant (Ishii et Hihara 2008, Larsson et al. 2011, et Fig 93). Ces protéines au sein d'une même branche présentent souvent de fortes homologies sur l'ensemble de leur séquence d'acides aminés, mais sans qu'aucune structure connue ne puisse se dégager ailleurs qu'au niveau du domaine AbrB, ajoutant encore au côté unique de cette famille.

La cystéine conservée dans le domaine C-terminal et impliquée dans la tétramérisation cruciale pour l'activité de régulation de la protéine chez *Bacillus subtilis* se retrouve largement conservée dans le domaine en N-terminal chez les CyAbrBs AbrB1 et AbrB2 (Fig 93). On remarquera les exceptions notables des 3 CyAbrBs de *Gloeobacter violaceus* qui n'ont pas de cystéine et qui forment déjà un groupe à part dans l'analyse phylogénétique. Les autres exceptions, visibles dans les travaux de Ishii et Hihara 2008, sont constituées d'un des 14 CyAbrBs du groupe spécifique d'*Acaryochloris marina* et de l'AbrB1 marin de *Prochlorococcus marinus* MED4. Ces deux derniers présentent à la fois une absence de la cystéine mais surtout la disparition d'une grosse zone en N-terminal de la protéine en plus de cette disparition. De manière intéressante, une analyse d'homologie portée aujourd'hui sur les 41 cyanobactéries séquencées sur la base de données en ligne MBGD (références dans le matériel et méthodes), on trouve 84 CyAbrBs, dont 79 possèdent une cystéine conservée. MBGD ne propose aujourd'hui plus que 13 CyAbrBs et celui qui est aujourd'hui exclu est celui qui n'avait pas de cystéine. Par contre un autre CyAbrB sans cystéine est référencé parmi les nouveaux génomes : *Synechococcus* sp. (JA-2-3B'a(2-13)) possède 2 CyAbrBs, dont un est dépourvu de cystéine et de plusieurs résidus en N-terminal (voir Fig.supplémentaire 1 de l'article Dutheil et al. (manuscrit en préparation Partie II).

Sa grande conservation parmi plus de 94% des CyAbrBs semble indiquer qu'elle peut probablement jouer un rôle d'importance chez les cyanobactéries. Ceci fait l'objet de la deuxième partie de mes travaux de thèse, relatés dans un prochain chapitre.

Bien qu'aucune structure de CyAbrB ne soit connue à ce jour, Agervald et al. 2009 ont comparé par des méthodes de modélisation informatique les structures des AbrB de *Bacillus subtilis* et d'AbrB1 de *Nostoc* sp. PCC7120. Ils proposèrent que les résidus arginines (Arg8, Arg15, Arg23 et Arg24), cruciaux pour l'interaction d'AbrB avec l'ADN, sont remplacés chez *Nostoc* par les résidus [Arg7, Gln15, Thr23 et Lys24] (voir Fig.94 & 95. pour position des résidus, Agervald et al. 2009).

NB : la numérotation 7, 15, 23 et 24 employée pour les CyAbrBs ici est abusive et renvoit au positions équivalentes de l'AbrB de *B.subtilis :* Chez Alr0946 de *Nostoc* sp. PCC7120, les résidus Arg7, Gln15, Thr23 et Lys24 sont respectivement Arg79, Gln86, Thr95 et Lys96, mais chez Sll0822 de *Synechocystis* sp. PCC6803 les positions équivalentes sont: Arg81, Gln88, Thr97 et Lys98, en raison des variations du nombre d'acides aminés pas forcément significatives en amont du domaine AbrB. Pour plus de lisibilité on tiendra plutôt compte des positions relativement aux éléments du domaine d'AbrB de *Bacillus subtilis.*

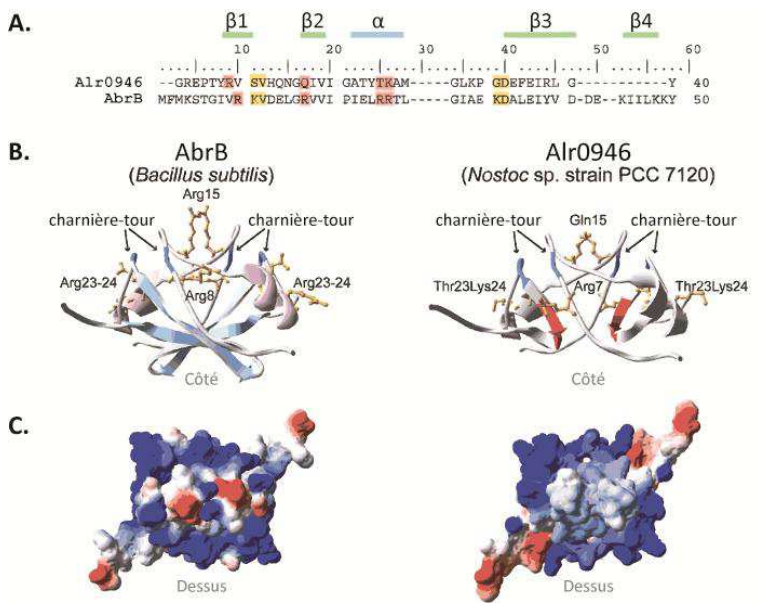


Figure 94

Modélisation 3D de Alr0946 (AbrB1) de *Nostoc* sp. PCC 7120

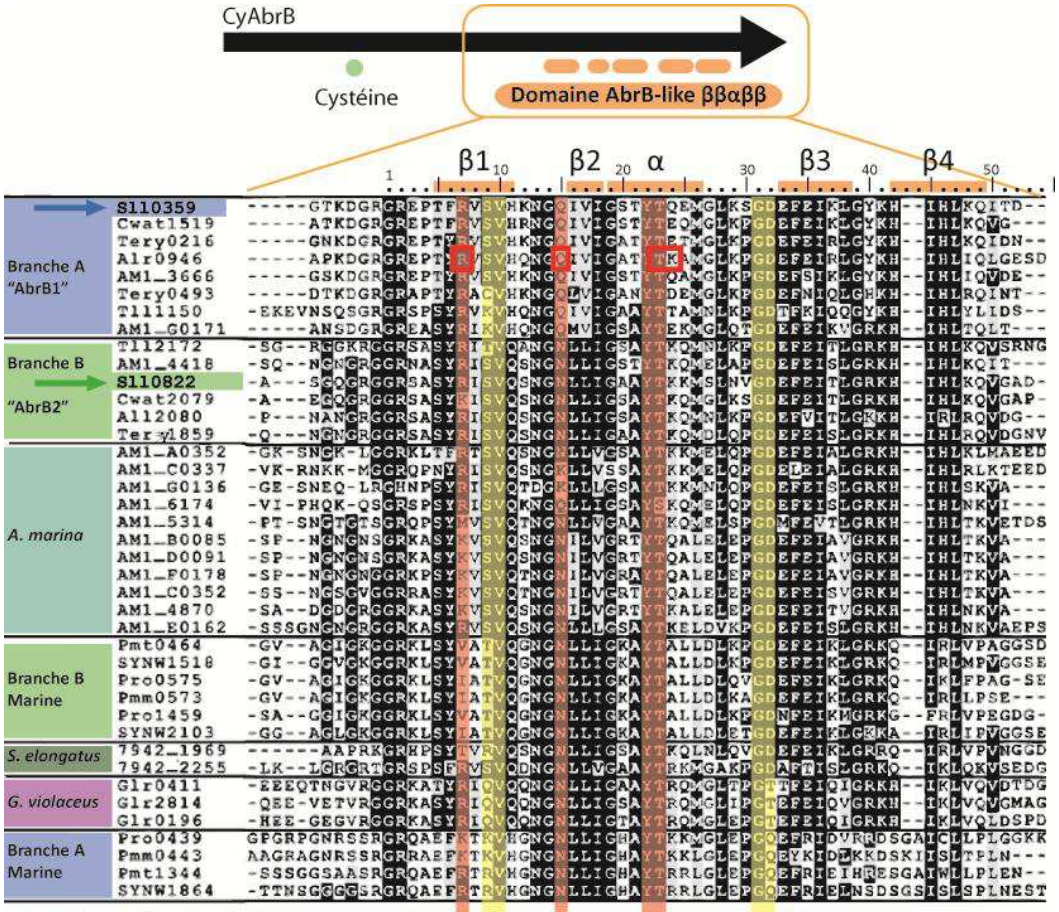
A: Eléments importants du fonctionnement d'AbrB de *B.subtilis*, et leurs équivalents supposés chez *Nostoc:* la numérotation proposée est celle d'AbrB de *B.subtilis,* les arginines R8, R15, R23 & R24 et leur équivalents supposés sont en rose; les motifs "charnière-tour" qui assurent la flexibilité de la fixation à l'ADN sont en jaune. **Modélisation informatique à partir de la structure d'AbrB de *B.subtilis.***

B: Modèles des structures 3D des domaines AbrB. Dimère d'AbrB de *B.subtilis* à gauche et d'AbrB1 de *Nostoc* à droite.

C: charges de surfaces des deux dimères (modélisation) rouge: charge négative et bleu: charge positive. Le dimère AbrB1 est très positivement chargé, caractéristique favorable à l'interaction avec l'ADN.

D'après Agervald et al 2009

Une analyse plus approfondie sur les résidus <u>réellement conservés</u> chez tous les CyAbrBs apporte toutefois des informations complémentaires à la comparaison avec la seule séquence de Alr0946. La Fig.95 montre la superposition de quelques domaines AbrB de CyAbrBs représentatifs des 84 CyAbrBs connus.



Zoom sur les résidus du domaine AbrB des CyAbrBs

La numérotation des résidus se fait par rapport aux équivalences avec AbrB de *B.subtilis.* Les résidus fortements conservés sont surlignés de noir (très conservés) ou de gris (moins conservés). Les carrés rouges représentent les éléments proposés par Agervald et al 2009 comme potentiels substitus des résidus capitaux d'AbrB de *B.subtilis*. En rose sont les résidus très conservé à proximité. En jaune sont les résidus impliqués dans le motif de "charnière-tour".

D'après Ishii et Hihara 2008, Agervald et al 2009

Figure 95

Cette analyse montre que la Lys24 proposée par Agervald et al. 2009 n'est pas aussi conservée que Thr23, mais par contre le résidu Tyr22 est très conservé. La paire R23-R24 chez AbrB serait donc plus vraisemblablement Y22-T23 chez les CyAbrBs (AbrB1 et AbrB2 de *Synechocystis* compris) et pas T23-K24. Y et T sont deux acides aminés portant un groupement hydroxyl, et sont très légèrement polaires. Ils sont de moins bons candidats pour une interaction avec l'ADN qu'une arginine chargée positivement comme chez AbrB, mais la conservation très forte de cette paire de résidus souligne leur importance.

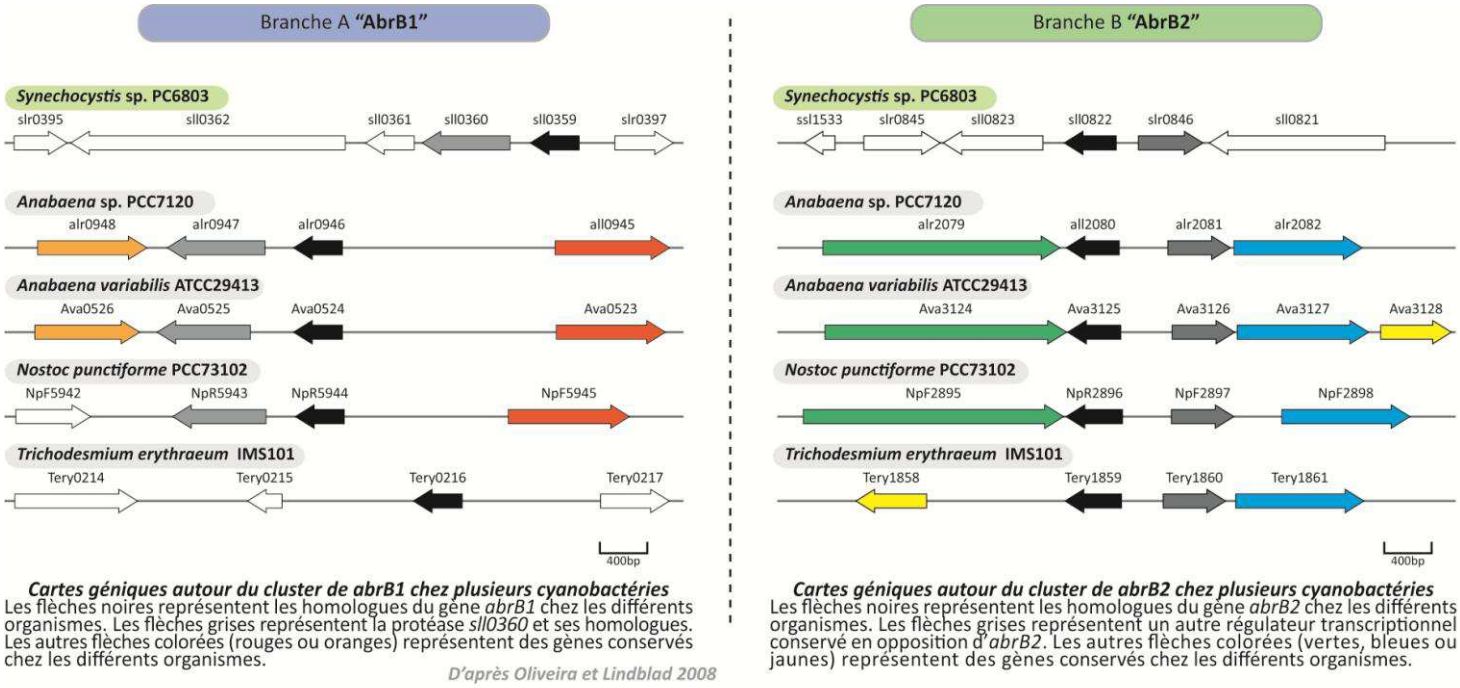
L'équivalent du résidu R8 d'AbrB semble aussi très conservé chez les cyanobactéries, mais en position équivalente R7, on note que ce résidu est souvent une Lysine chez *Acaryochlorys marina*.

Pour l'équivalent de R15 de *B.subtilis,* Agervald et al. proposaient Q15, cependant la superposition (Fig 95) montre que le résidu le plus conservé chez les CyAbrBs en position 15 est un N et pas un Q : l'asparagine N15 est très conservée chez tous les CyAbrBs, sauf chez les AbrB1 où c'est effectivement une glutamine Q15 (Alr0946 est un AbrB1). On remarquera néanmoins que glutamine et asparagine sont deux acides aminés très proches, polaires et non chargés, le fait qu'AbrB1 et AbrB2 diffèrent à cet endroit important est intéressant, cela traduit probablement des subtilités de fonctionnement entre les deux protéines. A proximité de N15, les résidus N13 et G14 sont eux aussi très conservés, et même ubiquitaires chez tous les CyAbrBs. La glycine n'ayant pas de groupement fonctionnel (le groupe substitutif est H) ce résidu très conservé permet peut-être au N15 d'interagir plus librement avec l'ADN (moins d'encombrement stérique ?) voir Fig 95.

On notera également la grande conservation des résidus formant les régions dites « charnière-tour » qui permettent la flexibilité de la structure reconnaissant l'ADN, ces résidus, également hautement conservés chez les CyAbrBs, sont surlignés de jaune dans la figure 95.

2-2-2-2- Région génomique des gènes *abrB1* et *abrB2*

Chez *Synechocystis* sp. PCC6803, AbrB1 (128 acides aminés) est codée par le gène *sll0359* (387 pb) et AbrB2 (129 AA) est codée par le gène *sll0822* (390 pb). Les deux protéines partagent 52% d'homologie sur l'ensemble de leur séquence, pas seulement sur les domaines AbrB en C-terminal.



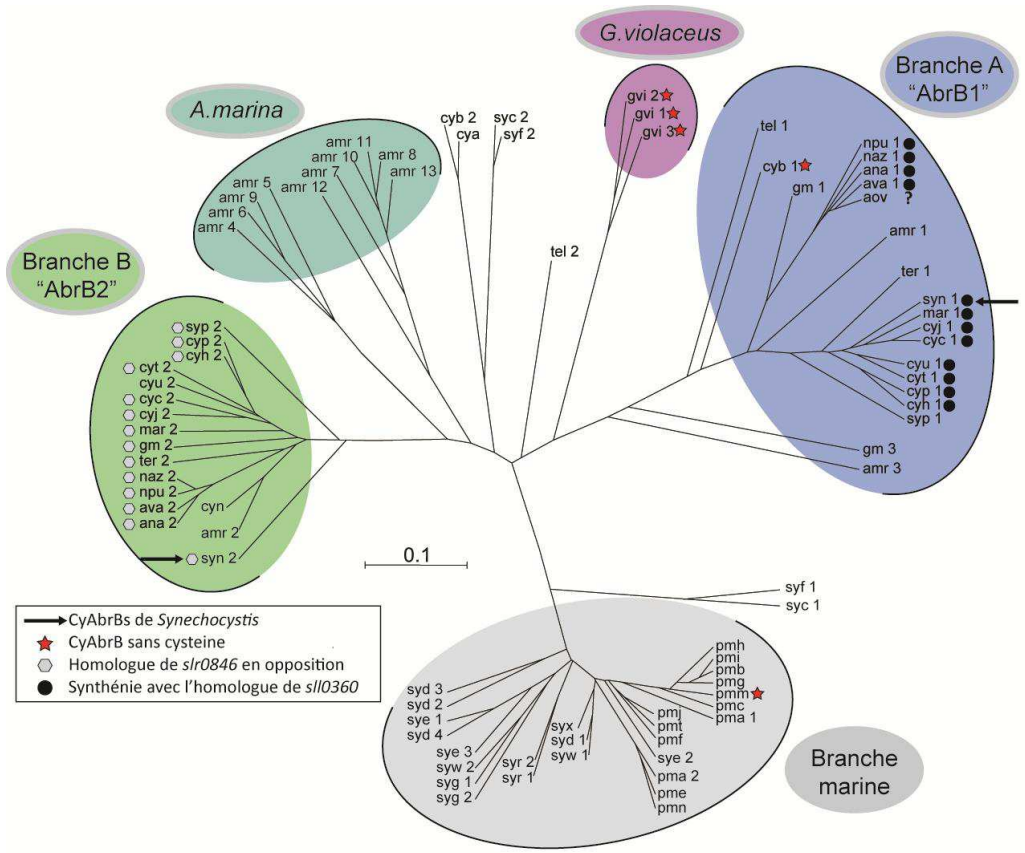
Cartes géniques autour du cluster de abrB1 chez plusieurs cyanobactéries
Les flèches noires représentent les homologues du gène *abrB1* chez les différents organismes. Les flèches grises représentent la protéase *sll0360* et ses homologues. Les autres flèches colorées (rouges ou oranges) représentent des gènes conservés chez les différents organismes.

D'après Oliveira et Lindblad 2008

Cartes géniques autour du cluster de abrB2 chez plusieurs cyanobactéries
Les flèches noires représentent les homologues du gène *abrB2* chez les différents organismes. Les flèches grises représentent un autre régulateur transcriptionnel conservé en opposition d'*abrB2*. Les autres flèches colorées (vertes, bleues ou jaunes) représentent des gènes conservés chez les différents organismes.

Figure 96

Figure 97



Arbre phylogénétique 2013 des 84 CyAbrBs selon MBGD.

Les 84 gènes ont été obtenus sur la base de données MBGD par homologie avec *sll0822* et *sll0359* de *Synechocystis* sp. PCC6803. Les particularités des régions géniques autour d'*abrB1* et *abrB2* sont indiquées (présence de *slr0846:* hexagone gris, présence de *sll0360:* hexagone noir), de même que la présence de cystéine sur la protéine (absence de cystéine = étoile rouge). L'arbre a été généré en utilisant le programme ClustalW et affiché grâce au logiciel SeaView. Les codes pour chaque gène sont ceux de MBGD et sont rapportés dans le tableau à droite de l'arbre, un code couleur pour les gènes *abrB1* (bleu) et *abrB2* (vert) a été employé. Les gènes de *Gloeobacter violaceus* sont indiqués en violet, *Acaryochloris marina* en turquoise et la branche marine en gris. Lorsque l'organisme possède une hydrogénase bidirectionnelle, un carré rouge l'indique.

Organisme possède Hox

hox			nombre de CyAbrBs	AbrB1 Branche A		AbrB2 Branche B			
	Branche A & Branche B:								
	ana	*Nostoc* sp.(PCC7120)	2	ana 1:	ALR0946	ana 2:	ALL2080		
?	aov	*Aphanizomenon ovalisporum*	1?	aov		?			
	ava	*Anabaena variabilis* (ATCC29413)	2	ava 1:	AVA_0524	ava 2:	AVA_3125		
	cyc	*Cyanothece* sp. (PCC 7424)	2	cyc 1:	PCC7424_5329	cyc 2:	PCC7424_1444		
	cyh	*Cyanothece* sp. (PCC8802)	2	cyh 1:	CYAN8802_0405	cyh 2:	CYAN8802_3854		
	cyj	*Cyanothece* sp. (PCC7822)	2	cyj 1:	CYAN7822_1550	cyj 2:	CYAN7822_2847		
	cyn	*Cyanothece* sp. (PCC7425)	1	-	-	cyn :	CYAN7425_4400		
	cyp	*Cyanothece* sp. (PCC8801)	2	cyp 1:	PCC8801_0396	cyp 2:	PCC8801_3802		
	cyt	*Cyanothece* sp. (ATCC 51142)	2	cyt 1:	CCE_3242	cyt 2:	CCE_0453		
	cyu	*Cyanobacterium* UCYN-A	2	cyu 1:	UCYN_01400	cyu 2:	UCYN_10170		
	gm	*Arthrospira platensis* (NIES-39)	3	gm 1:	NIES39_R01040	gm 2:	NIES39_K05010	gm 3:	NIES39_A00980
	mar	*Microcystis aeruginosa* (NIES-843)	2	mar 1:	MAE_13690	mar 2:	MAE_35130		
	naz	*Nostoc azollae* (0708)	2	naz 1:	AAZO_0061	naz 2:	AAZO_2180		
	npu	*Nostoc punctiforme* (PCC73102)	2	npu 1:	NPUN_R5944	npu 2:	NPUN_R2896		
	syn	*Synechocystis* sp. (PCC6803)	2	syn 1:	SLL0359	syn 2:	SLL0822		
	syp	*Synechococcus* sp. (PCC7002; ATCC 27264)	2	syp 1:	SYNPCC7002_A1095	syp2:	SYNPCC7002_A0129		
	ter	*Trichodesmium erythraeum* (IMS101)	2	ter 1:	TERY_0216	ter 2:	TERY_1859		
	***Acaryochloris marina* (2 AbrB1 et 1 AbrB2)**								
	amr	*Acaryochloris marina* (MBIC11017)	13	amr 1:	AM1_3666	amr 2:	AM1_4418	amr 3:	AM1_G0171
				amr 4:	AM1_5314	amr 5:	AM1_6174	amr 6:	AM1_A0352
				amr 7:	AM1_4870	amr 8:	AM1_B0085	amr 9:	AM1_C0337
				amr 10:	AM1_C0352	amr 11:	AM1_D0091	amr 12:	AM1_E0162
				amr 13:	AM1F0178				
	Branche marine:								
	pma	*P. marinus* (CCMP1375;SS120)	2	pma 1:	PRO0575	pma 2:	PRO1459		
	pmb	*Prochlorococcus marinus* (AS9601)	1	pmb:	A9601_06291				
	pmc	*Prochlorococcus marinus* (MIT9515)	1	pmc:	P9515_06381				
	pme	*Prochlorococcus marinus* (NATL1A)	1	pme:	NATL1_11061				
	pmf	*Prochlorococcus marinus* (MIT9303)	1	pmf:	P9303_18171				
	pmg	*Prochlorococcus marinus* (MIT9301)	1	pmg:	P9301_05991				
	pmh	*Prochlorococcus marinus* (MIT9215)	1	pmh:	P9215_06551				
	pmi	*Prochlorococcus marinus* (MIT9312)	1	pmi:	PMT9312_0573				
	pmj	*Prochlorococcus marinus* (MIT9211)	1	pmj:	P9211_05761				
	pmm	*P. marinus* subsp. *pastoris*(MED4)	1	pmm:	PMM0573				
	pmn	*Prochlorococcus marinus* (NATL2A)	1	pmn:	PMN2A_0411				
	pmt	*Prochlorococcus marinus* (MIT9313)	1	pmt:	PMT0464				
	syd	*Synechococcus* sp. (CC9605)	4	syd 1:	SYNCC9605_0991	syd 2:	SYNCC9605_1413	syd 3:	SYNCC9605_1525
				syd 4:	SYNCC9605_1805				
	sye	*Synechococcus* sp. (CC9902)	3	sye 1:	SYNCC9902_0708	sye 2:	SYNCC9902_0897	sye 3:	SYNCC9902_1463
	syg	*Synechococcus* sp. (CC9311)	2	syg 1:	SYNC_0950	syg 2:	SYNC_1780		
	syr	*Synechococcus* sp. (RCC307)	2	syr 1:	SYNRCC307_0525	syr 2:	SYNRCC307_0845		
	syw	*Synechococcus* sp. (WH 8102)	2	syw 1:	SYNW1518	syw 2:	SYNW2103		
	syx	*Synechococcus* sp. (WH 7803)	1	syx :	SYNWH7803_0733				
	Autres:								
	cya	*Synechococcus* sp. (JA-3-3Ab)	1	cya:	CYA_0162				
	cyb	*Synechococcus* sp. (JA-2-3B'a(2-13))	2	cyb 1:	CYB_0763	cyb 2:	CYB_0982		
	gvi	*Gloeobacter violaceus* (PCC7421)	3	gvi 1:	GLR0196	gvi 2:	GLR0411	gvi 3:	GLR2814
	tel	*Thermosynechoccus elongatus* (BP-1)	2	tel 1:	TLL1150	tel 2:	TLL2172		
	syc	*Synechococcus elongatus* (PCC6301)	2	syc 1:	SYC2126_C	syc 2:	SYC1843_C		
	syf	*Synechococcus elongatus* (PCC7942)	2	syf 1:	SYNPCC7942_1969	syf 2:	SYNPCC7942_2255		

En aval d'*abrB1* se trouve un gène conservé chez de nombreuses cyanobactéries (Oliveira et Lindblad 2008) à l'exception de *Trichodesmium erythraeum (*Agervald et al. 2009). Les 2 gènes sont cotranscrits sur un même ARN et il a été proposé que le deuxième gène serait responsable du contrôle de la quantité d'AbrB1 dans la cellule car il code probablement pour une protéase, mais il n'y a pas plus d'éléments pour étayer cette idée.

Par ailleurs, chez *Synechocystis* et chez certaines cyanobactéries, *abrB2* partage sa zone promotrice avec un autre gène en opposition (Fig 96) qui code pour un régulateur ayant de nombreuses homologies avec le gène *cymR* des *Bacillus*. Le rôle de cet autre régulateur n'est pas encore publié mais des études récentes montrent qu'il régule l'expression de certaines sous-unités du photosystème I *psaA* et *psaB* (Midorikawa et al. 2009) et de nombreux autres gènes (données non publiées du laboratoire).

Aujourd'hui le nombre conséquent de génomes cyanobactériens séquencés permet de constater que, sur ces 41 cyanobactéries, ces deux organisations géniques d'AbrB1 et/ou AbrB2 sont très fréquentes, 14 AbrB2 sur 17 sont en opposition avec un gène « *cymR*-like », et 12 AbrB1 sur 21 sont en synthénie avec un gène homologue à *sll0360*» (Voir Fig 96). Cette conservation très forte des clusters géniques permet d'imaginer un rôle important de ces deux autres gènes, bien qu'il soit encore difficile de déterminer lequel. Cette analyse permet aussi de constater que lorsque AbrB2 est présent, AbrB1 l'est aussi (1 exception sur 17 souches : *Cyanothece* PCC7425 n'ayant pas d'AbrB1) (Fig 97).

Autre information particulièrement intéressante : lorsque une cyanobactérie possède une hydrogénase bidirectionnelle Hox, elle possède toujours un gène AbrB2 et presque toujours AbrB1 (*Cyanothece* PCC7425 étant l'exception), *Synechocystis* sp. PCC6803 fait partie de ces organismes. Par contre, posséder AbrB2 et/ou AbrB1 n'implique pas toujours posséder l'hydrogénase bidirectionnelle (Fig 97)

2-2-2-3- Régulation de gènes par les CyAbrBs

La plupart des articles traitant des CyAbrBs décrivent seulement des fixations des protéines AbrB1 ou AbrB2 sur les promoteurs de certains gènes, mais très peu de ces études qualifient réellement le rôle du régulateur vis à vis du gène cible de l'étude. Ainsi « régule » indiquera que la protéine a été trouvée interagissant en amont des gènes cibles ; « active » et « réprime » indiqueront que le rôle est connu (respectivement positivement et négativement).

Un CyAbrB régule l'expression de la RuBisCO chez Synechococcus sp. PCC7002

L'article Onizuka et al. 2002 fait ainsi part qu'une protéine de 16 kDa interagit avec le promoteur de la RuBisCO de *Synechococcus* sp. PCC7002. Le régulateur est décrit comme un homologue des deux protéines Sll0359 et Sll0822 de *Synechocystis* sp. PCC6803, aujourd'hui appelées respectivement AbrB1 et AbrB2. La RuBisCO, l'enzyme la plus abondante du règne vivant, participe à l'assimilation du carbone dans le cycle de Calvin. Chez les cyanobactéries, le taux de CO_2 module la quantité de RuBisCO intracellulaire (plus de RuBisCO en basse concentration de CO_2 Mayo et al. 1989). Le rôle probable du CyAbrB dans la régulation de cette enzyme très importante n'a pas été réellement exploré dans l'article.

AbrB1 régule HypC chez Nostoc sp. PCC7120

Par une méthode similaire, AbrB1 de *Nostoc* sp. PCC7120 (*alr0946*) a été identifiée comme interagissant sur la région en amont du gène *hypC*, en le régulant négativement (Agervald et al. 2009). Il régulerait ainsi potentiellement l'ensemble du cluster *hyp* qui suit *hypC*. Leurs travaux démontrent également que cet AbrB1 s'auto-réprime lui-même ainsi que le gène suivant, porté par le même

transcrit. L'interaction entre AbrB1 et les promoteurs a été vérifiée *in vitro* avec une protéine taguée 6-His en N-terminal recombinante, et le rôle de répresseur a pu être validé grâce à un système de surexpression contrôlée par induction avec NO_3^{2-} de la protéine AbrB1 et qui a permis de constater un effet répresseur sur les niveaux de transcrits ainsi que sur l'activité hydrogénase. Leur système d'induction est cependant très discutable (le nitrate ayant un effet métabolique intrinsèque très important, l'assimilation de l'azote devient chamboulée ainsi que toutes les autres voies métaboliques alimentées par la photosynthèse) et les phénomènes observés sont difficilement imputables au seul effet d'AbrB1, en particulier en ce qui concerne l'activité hydrogénase. Il a été impossible de déléter totalement le gène *abrB1* de *Nostoc*. Ceci a été plusieurs fois confirmé chez d'autres cyanobactéries (voir plus loin).

AbrB1 régule la superoxyde dismutase (SOD) chez Nostoc sp. PCC7120

L'année suivante, la même équipe montre que la surproduction du régulateur par leur système d'induction au NO_3^{2-}, entraine un blanchiment très marqué de la culture, ainsi qu'une diminution des transcrits, des protéines et de l'activité de l'enzyme FeSOD, connue pour son rôle dans la lutte contre les radicaux libres intracellulaires. Ils proposent qu'AbrB1 soit un répresseur de la FeSOD et valident *in vitro* l'interaction entre AbrB1 et l'ADN de la région promotrice du gène codant pour la FeSOD (Agervald et al. 2010).

AbrB1 régule la synthèse de cylindrospermopsine chez Aphanizomenon ovalisporum

Chez *Aphanizomenon ovalisporum,* la synthèse d'un métabolite secondaire la cylindrospermopsine un alkaloïde hépatotoxique inhibant la synthèse de protéines chez les eucaryotes supérieurs est sous la dépendance d'un régulateur CyAbrB. (Shalev-Malul et al. 2008). Un CyAbrB est capable de se fixer sur la région promotrice entre les deux cluster de gènes (en orientation opposée) responsables de la synthèse de la toxine (pour revue voir Méjean et Ploux 2013). La synthèse de cylindrospermopsine est encore un phénomène mal connu, mais ne se fait que dans certaines conditions environnementales comme la réponse aux stress nutritifs (carence en soufre ou azote), au statut redox intracellulaire ou encore au stress lumineux. Deux sites d'initiation de la transcription ont été trouvés devant chacun des deux gènes. Les ARNm correspondants n'étant pas toujours exprimés de manière concomitante en fonction des conditions de culture analysées. Shalev-Malul et al. (2008) ont également montré par MS/MS que le régulateur CyAbrB était modifié post-traductionnellement chez *Aphanizomenon ovalisporum* ce qui n'est pas le cas de la protéine recombinante purifiée *d'E.coli.* Il s'agit d'une acétylation de thréonine en N-ter (T2) et d'une méthylation au niveau de trois résidus Lysine-Valine-Lysine également en N-ter (KVK 17-19). L'hypothèse qu'ils ont retenue est que ces modifications pourraient jouer un rôle dans la capacité (affinité) à se fixer sur la région promotrice, et donc influencer l'expression de la toxine.

AbrB1 active l'hydrogénase bidirectionnelle chez Synechocystis sp. PCC6803

En 2008, Oliveira et Lindblad ont décrit pour la première fois qu'AbrB1 (*sll0359*) était un facteur de transcription capable de se fixer *in vitro* sur la région promotrice de l'opéron *hox* qui code pour les sous-unités de l'hydrogénase. Ils le décrivent comme potentiel activateur et il leur a été impossible d'obtenir une souche mutante de *Synechocystis* Δ*sll0359* complètement ségrégée ce qui indique que ce gène est indispensable à la croissance dans les conditions standards de croissance. Cette dernière observation a été confirmée par Ishii et Hihara (2008) et par moi-même (résultats non publiés).

AbrB2 régule l'assimilation de l'azote chez Synechocystis sp. PCC6803 (tolérante au glucose)

Ishii et Hihara en 2008 ont étudié le rôle d'AbrB2 (*sll0822*) chez une souche de *Synechocystis,* tolérante au glucose (qui présente plusieurs différences physiologiques avec la « vraie » souche sauvage de *Synechocystis*). Par des expériences de retard sur gel, ils montrèrent qu'AbrB2 se fixe sur son propre promoteur et ont fait l'hypothèse qu'il se comporte comme un auto-régulateur.

Ils ont obtenu un mutant de *Synechocystis* dépourvu de *sll0822,* ce qui montre qu'AbrB2, contrairement à AbrB1, n'est pas essentiel à la croissance de *Synechocystis* dans les conditions standard. Pour mieux comprendre son rôle, ils ont comparé le transcriptome du mutant Δ*sll0822* à celui de leur souche de référence. Dans leur mutant , la quantité d'ARN de nombreux gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote, en particulier des transporteurs de nitrate/nitrite ou d'urée, mais également quelques gènes des sous-unités du photosystème I : *psaK*, *psaF* varie par rapport à la souche 'sauvage' de référence. Pour montrer qu'AbrB2 régulait directement certains de ces gènes, ils ont confirmé *in vitro* que la protéine AbrB2 recombinante (produite et purifiée de *E.coli*) se fixe sur les régions promotrice de ces gènes.

Leur mutant dépourvu d'AbrB2 est jaune comme des cultures sauvage carencé en azote (diminution des antennes photosynthétiques pour économiser de l'azote). L'ajout de nitrate dans le milieu de culture restaure partiellement la coloration "verte" de la culture confirmant qu'AbrB2 régule de manière directe ou indirecte ce métabolisme de l'azote. Ils s'étonnèrent du fait qu'une bonne partie du régulon d'AbrB2 concernait des gènes régulés par NtcA, un régulateur majeur du métabolisme de l'azote. N'ayant pas pu démontrer qu'AbrB2 ou NtcA se régulaient mutuellement, ils proposèrent qu'AbrB2 agit en parallèle de NtcA dans la régulation du métabolisme de l'azote (Ishii et Hihara 2008).

Dans leur tableau de résultats supplémentaires, ils reportent une augmentation de l'expression de l'ensemble de l'opéron *hoxEFUYH* (entre x2 et x3.5) sans toutefois faire un commentaire sur ce point. Pourtant leurs résultats pouvaient amener à tester la régulation du promoteur de *hox* par AbrB2. Finalement, ils évoquent une possible interaction entre les 2 régulateurs qui permettrait au système AbrB1-AbrB2 d'exercer une régulation flexible sur les gènes qu'ils régulent ensemble. Selon eux l'existence d'un tel phénomène pourrait expliquer partiellement la présence des deux branches de CyAbrBs chez toutes les cyanobactéries (on sait maintenant que toutes les cyanobactéries ne possèdent pas toujours ces 2 types de CyAbrBs, mais que lorsqu'elles en possèdent un elles ont généralement l'autre, voir Fig 97). Ils rapportent toutefois qu'AbrB2 n'interagit visiblement pas avec le promoteur d'AbrB1 et que les transcrits de ce dernier ne varient pas en conséquence de la mutation Δ*sll0822* (Ishii et Hihara 2008). Au laboratoire nous avons montré que l'expression d'AbrB1 était sous la dépendance d'AbrB2 mais nous n'avons pas encore de résultats montrant que c'est une action directe sur le promoteur (résultats non publiés).

AbrB1, AbrB2 et LexA régulent sbtA (transport de carbone)chez Synechocystis sp. PCC6803

Liemann-Hurwitz et al. en 2009 ont identifié 3 facteurs de transcription se fixant sur la région promotrice du gène *sbtA* à partir d'extraits protéiques de *Synechocystis :* LexA (déjà décrit au paragraphe 1 de ce chapitre), ainsi que les deux CyAbrBs AbrB1 et AbrB2. Lorsque les extraits protéiques étaient préparés à partir d'une culture poussée en carence de carbone, AbrB2 n'interagissait plus avec le promoteur de *sbtA* alors que la quantité d'AbrB2 ne variait pas. L'utilisation d'un anticorps anti-AbrB2 leur a permis de monter qu'il est majoritairement sous forme de dimère dans leurs conditions testées. Après avoir étudié une souche Δ*sll0822* (fournie par Ishii et Hihara) ils montrèrent qu'AbrB2 est impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes intervenant dans le métabolisme du carbone. Ils firent l'hypothèse qu'AbrB2 est un régulateur senseur de l'équilibre carbone/azote.

AbrB1 active FtsZ (division cellulaire) chez Nostoc sp. PCC7120

AbrB1 de *Nostoc* sp. PCC7120 se lie *in vivo* et *in vitro* sur le promoteur de *ftsZ* un gène clé la division cellulaire (He et Xu 2010). La quantité de transcrit d'*abrB1* et de *ftsz* est plus importante dans les cellules végétatives que dans les hétérocystes (cellules différenciées siège de la fixation de l'azote). Il y a 4 fois moins de protéine AbrB1 dans les hétérocystes que dans les cellules végétatives.

Un mutant dépourvu d'AbrB1 chez *Nostoc* PCC7120 n'a pas pu être obtenu dans les conditions standard de croissance, confirmant à nouveau qu'AbrB1 est une protéine essentielle chez les cyanobactéries qui la possèdent.

AbrB1 et AbrB2 peuvent se complémenter partiellement l'un l'autre, interagissent physiquement et AbrB2 régule carbone et azote chez Synechocystis sp. PCC6803.

AbrB2 et AbrB1 semblent interagir *in vivo* puisqu'ils copurifient l'un avec l'autre (Yamauchi et al. 2011). Ce dernier résultat confirme les résultats de double hybride levure (Satoh et al. 2007).

Par des expériences de complémentation fonctionnelle ils ont pu montrer que dans un mutant Δ*sll0822* la quantité de transcrit des gènes *urtA* (import de l'urée), *amt1* (import d'ammonium), *glnB* (régulateur de l'azote) et *sbtA* (transporteur de HCO_3^-) était restaurée (partiellement ou totalement) au niveau sauvage après réintroduction d'*abrB2* ou d'*abrB1* sauvage. Par contre la quantité d'ARN *ftsZ* et *ftsQ* (liés à la division cellulaire) chez Δ*sll0822*, n'est restaurée au niveau sauvage qu'après introduction réintroduction d'*abrB2* mais pas d'*abrB1*. Selon eux, ces résultats ajoutés au fait qu'il soit impossible de déléter totalement *abrB1* chez *Synechocystis* et *Nostoc* indiquent qu'*abrB2* ne peut se substituer totalement à *abrB1,* et inversement, en dépit de la grande similitude entre les deux protéines. Grâce à certains résultats complémentaires de surexpression faible (environ 190% du niveau sauvage) des deux régulateurs qui ne semblent pas avoir d'effet physiologique important dans leur étude, ils proposent comme « vraisemblable » que les activités des CyAbrBs soient modulées non pas au niveau transcriptionnel ou traductionnel, mais plutôt au niveau post-traductionnel, ils n'apportent toutefois pas la moindre information quant à la modification en question. Ils évoquent ensuite à nouveau l'importance d'AbrB2.

AbrB1 et AbrB2 interragissent entre elles

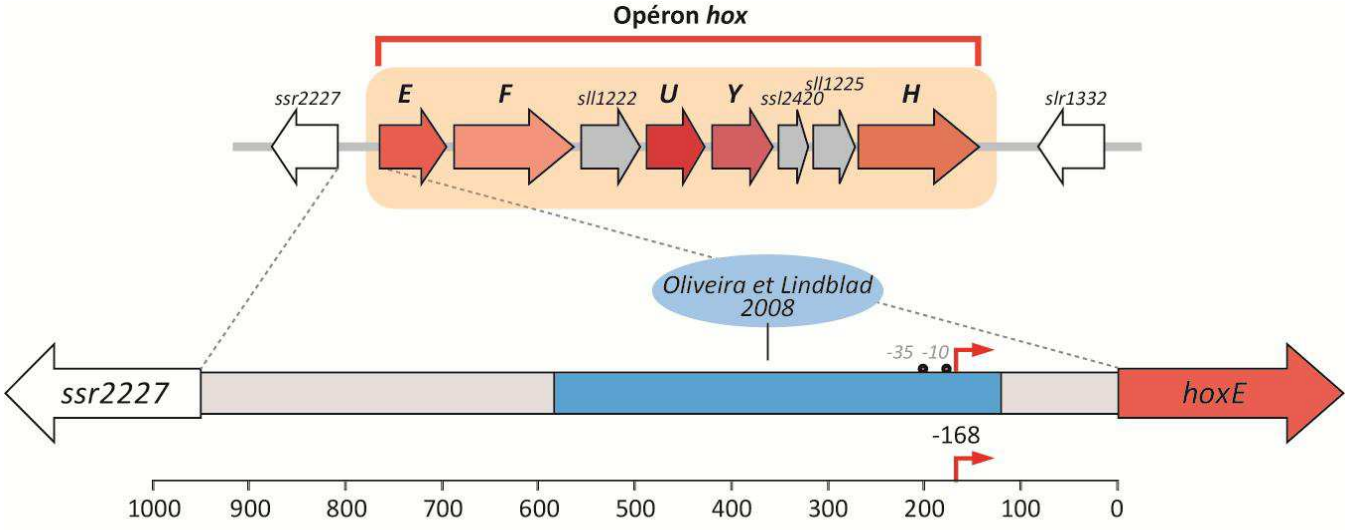
Sato et al. en 2007, dans leur étude à grande échelle des interactions protéine-protéine avec le double hybride chez la levure ont montré qu'AbrB1 interagit avec lui-même ainsi qu'avec AbrB2, une interaction entre AbrB1 et AbrB2 a également été relevée dans l'étude et elle a été validée en 2011 *in vivo* par Yamauchi et al 2011.

De manière moins fiable, la protéase Slr1204 interagirait avec AbrB1 (comme avec beaucoup d'autres protéines), et AbrB2 interagirait avec la protéine inconnue Sll1511, l'homologue de KaiC slr0758 et la sous-unité ATPase Sll0020 de la protéase ATP dépendante Clp. Très peu d'informations sont disponibles concernant ces derniers gènes, et la fiabilité de l'interaction physique obtenue est moins bonne que pour les interaction entre les CyAbrBs

De manière bien plus intéressante, il semble aussi que Slr1896, une protéine de fonction totalement inconnue, intéragisse physiquement avec AbrB2 au niveau de fiabilité A. Or, Slr1896 interagit avec la même fiabilité avec 3 autres protéines : une autre protéine hypothétique Sll1884, un régulateur de la sous-famille NarL Sll1708 (Nar : Nitrate réductase : assimilation de l'azote), et enfin la thiorédoxine M Sll1057. Les thiorédoxines servent généralement de protéines antioxydantes qui vont réduire les autres protéines. Peut-être que la fonction de Slr1896 est d'assurer un lien physique entre AbrB2 et cette dernière thiorédoxine? Cette information sera réutilisée en discussion au prochain chapitre.

2-2-2-4- AbrB1 régule l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*

En utilisant les techniques ayant servi à identifier LexA comme régulateur de Hox, Oliveira et Lindblad ont identifié AbrB1 comme un nouveau régulateur de l'hydrogénase bidirectionnelle (Oliveira et Lindblad 2008). Les niveaux de transcrits *hoxE* et *abrB1* suivent les mêmes profils de variations (en conditions notamment standard, de carence azotée, d'ajout de nitrate ou d'ammonium). L'interaction entre la protéine recombinante His-AbrB1 purifiée chez *E.coli* et une sonde ADN longue de 462 pb en amont de *hoxE* (de -415 à +47 par rapport au start de transcription. voir Fig.98). Ils validèrent également la fixation d'AbrB1 sur son propre promoteur (sans toutefois dire si l'effet était positif ou négatif).



Site de fixation de AbrB1
La zone intergénique comprend le gène *hoxE* et le gène *ssr2227* sur 963pb.
La petite flèche rouge représente le site d'initiation de la transcription (consensus entre les 2 études) en position -168. Les 2 petits cercles en amont de la flèche représentent les box-10 et -35.
Le bloc bleu représente le site de fixation d'AbrB1 identifié par l'équipe de Oliveira et Lindblad.

Figure 98

Ils essayent également de faire varier la quantité d'AbrB1 dans la cellule afin de juger du rôle de ce régulateur vis à vis de l'activité hydrogénase. La délétion complète d'*abrB1* s'avéra impossible (voir plus haut), ils décidèrent donc de surexprimer celui-ci avec un promoteur induit par le cuivre. Des northern blots effectués sur les ARN de ces 3 souches corrélèrent les niveaux de transcrits d'*abrB1* avec ceux de *hoxE*. Ils vérifièrent ensuite l'effet des variations de quantités d'AbrB1 sur l'activité hydrogénase des cellules et ils purent montrer qu'une diminution de la quantité d'AbrB1 dans la souche déplétée se traduit par une diminution d'environ un quart de l'activité hydrogénase, alors que l'induction d'AbrB1 par le cuivre permet d'augmenter l'activité hydrogénase de près de 50% (toutefois ils n'indiquent pas l'activité hydrogénase d'une souche sauvage cultivée avec du cuivre). Ils concluent de ces résultats qu'AbrB1 est un activateur transcriptionnel de l'hydrogénase bidirectionnelle chez *Synechocystis*.

2-2-3- Bilan sur les CyAbrBs :

En conclusion, les résultats sur la caractérisation du rôle de la paire de CyAbrBs sont encore peu nombreux et les mécanismes par lesquels ces derniers régissent le métabolisme des cyanobactéries sont encore loin d'être élucidés. Chez *Synechocystis*, il semblerait qu'*abrB1* et *abrB2* permettent de moduler le métabolisme de l'azote et du carbone.

Parmi les quelques informations rassemblées, les deux régulateurs semblent avoir des cibles différentes et des importances distinctes : *abrB1* est essentiel à la croissance chez *Nostoc* et *Synechocystis*, tandis qu'*abrB2* est dispensable à la viabilité cellulaire. *abrB1* régule des phénomènes aussi variés que la synthèse de toxines, la maturation de l'hydrogénase (chez *Nostoc*), l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle (chez *Synechocystis*), le transport de carbone (*sbtA*) et peut complémenter une partie du phénotype Δ*abrB2* lorsqu'on augmente son expression. *abrB2* quant à lui est impliqué dans les métabolismes du carbone et de l'azote et éventuellement dans la division cellulaire. De plus, l'analyse transcriptomique chez *Synechocystis* (souche glucose tolérante) montre qu'*abrB2* pourrait lui aussi réguler l'hydrogénase bidirectionnelle.

3- Bilan sur la régulation de l'hydrogénase:

3-1- Les facteurs environnementaux

Le tableau ci-après propose un bilan des informations collectées dans différents articles sur la transcription de l'opéron *hox* et des trois régulateurs *abrB1*, *abrB2* et *lexA* en réponse à différentes conditions environnementales et qui n'ont pas déjà été décrites précédemment :

Condition:	light to dark 1h puis retour à la lumière	low O_2+light	low O_2+dark	low O_2+DCMU	low O_2+DBMIB	lowO_2	ΔHik31+salt stress		S starvation		Low N	high light	dark 1h
Technique:	qRT-PCR	qRT-PCR	qRT-PCR	qRT-PCR	qRT-PCR	Puce	Western blot	RT-PCR	RT-PCR	Puce	RT-PCR	Puce	Puce
abrB1	x0,1*	-	-	-	-	=	-	-	ND	x0,6	→0	=	=
abrB2	-	-	-	-	-	x0,6	-	-	ND	=	-	↗↗	↘
lexA	x3*	-	-	-	-	x2	↘	↘	ND	=	-	↘	↗
hoxE	=	x5	x12	x5	x12	x2	-	-	x2	=	-	-	-
hoxF	=	x5	x11	x5	x11	x3	-	-	x2	=	-	-	-
hoxU	x0,1*	x5	x5	x5	x4	x3	-	-	=	=	-	-	-
hoxY	x0,1*	x5	x3	x5	x3	x2	-	-	=	=	-	-	-
hoxH	x0,1*	x5	x3	x5	x3	x1	-	-	=	=	-	-	-
Organisme:	6803	6803	6803	6803	6803	6803	6803	6803	6803	6803	7120	6803	6803
Article:	Kiss et al. 2009					Summerfield et al. 2011	Li et al. 2012		Zhang et al. 2008		He et Xu 2010	Mitschke et al. 2011	

Tableau des variations transcriptomiques
Code couleur : répression (rouge), induction (vert) , pas de changement (jaune) inconnu (gris). DCMU : inhibiteur entre le PSII et le pool de plastoquinone ; DBMIB : inhibiteur entre le pool de plastoquinones et le *cytb6/f*. Une * indique que le phénomène est réversible.

Table 12

3-2- Les facteurs de transcription

Deux facteurs de transcription ont été décrits pour interagir avec le promoteur de *hoxE* chez *Synechocystis* sp. PCC6803:

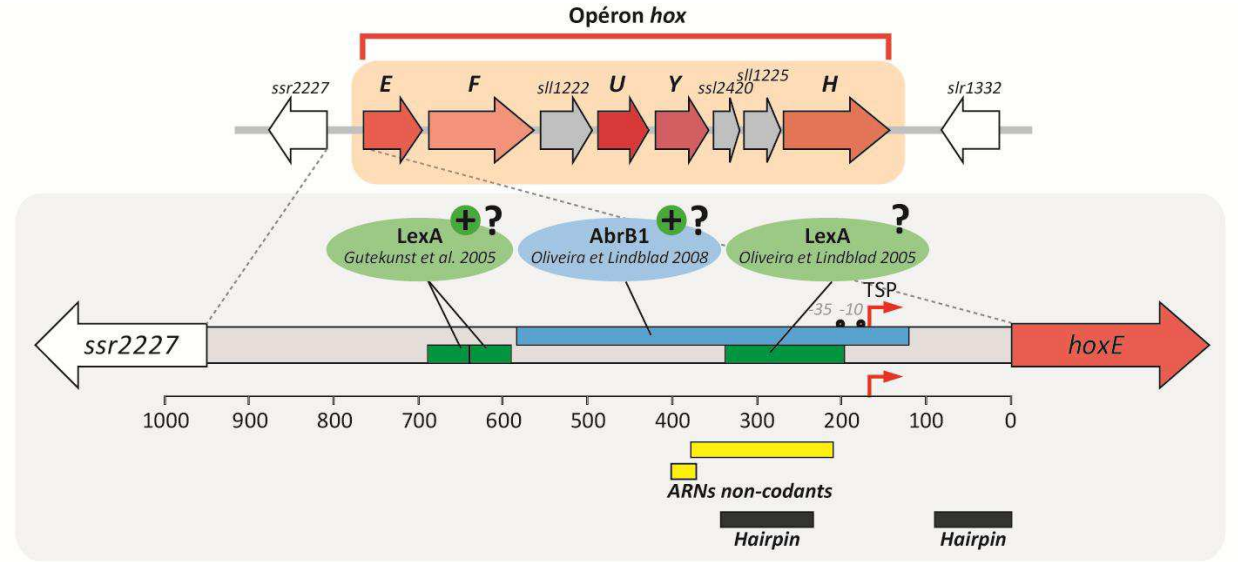
- LexA, qui régulerait *hoxE* en interagissant avec deux zones dans la région intergénique de *hoxE*. Oliveira et Lindblad, 2005 ont montré que LexA interagissait avec un fragment d'ADN en amont du TSP (-169 à -28 par rapport au TSP, soit -337 à -196 par rapport à l'ATG de *hoxE*) tandis que Gutekunst et al. 2005 ont identifié deux zones d'interaction de LexA avec l'ADN très en amont du TSP (-569 à -690 par rapport à l'ATG de *hoxE*).
- AbrB1, qui interagirait dans une région pas très bien délimitée de 450bp à cheval sur le +1 de transcription de *hoxE* (Oliveira et Lindblad 2008). Ils n'ont pas cherché à déterminer plus précisément le site de fixation. Cette zone inclue notamment de fortes structures secondaires de l'ADN, ce qui semble en accord avec le fait que les domaines AbrBs interagiraient préférentiellement avec des structures tridimensionnelles de l'ADN. (Oliveira et Lindblad 2009)

Les deux régulateurs sont considérés comme des activateurs transcriptionnels de l'opéron *hox*, mais avec toutefois certaines précautions à prendre sur ces démonstrations.

3-3- Autres informations :

De plus, les travaux d'Ishii et Hihara en 2008 sembleraient indiquer qu'AbrB2 aurait un effet négatif sur la transcription de l'opéron *hox* chez la souche *Synechocystis* tolérante au glucose.

Dans la région génomique autour de l'opéron *hox*, 3 ARN non codants, deux en amont de *hoxE* et un autre en aval de *hoxH* ont été identifiés. Les rôles de ceux-ci ne sont pas encore clairs mais il semble que leur quantité soit fonction de la quantité de lumière : *syr1,* en aval de *hoxH*, est fortement induit par un stress lumineux et moyennement par une carence en CO_2 alors que ncr0700, en amont de *hoxE* est induit fortement par l'obscurité, légèrement par la carence en CO_2, et fortement réprimé par le stress lumineux. Le troisième petit ARN non codant en amont de *hoxE* n'est qu'évoqué dans ces travaux. Un ARN antisens se trouverait quant à lui juste en amont de *hoxU* sans que rien ne soit connu à son sujet (Mitschke et al. 2011).



Sites de fixation des régulateurs entre *hoxE* et *ssr2227*

La zone intergénique comprend le gène *hoxE* et le gène *ssr2227* sur 963pb.
La petite flèche rouge représente le site d'initiation de la transcription en position -168. Les 2 petits cercles en amont de la flèche représentent les box-10 et -35. Le bloc bleu représente le site de fixation d'AbrB1 identifié par l'équipe de Oliveira et Lindblad en 2008. Les blocs verts représentent les sites d'interaction de LexA identifiés par Gutekunst et al en 2005 (2 sites) et Oliveira et Lindblad en 2005. Les blocs jaunes représentent des ARNs non-codants identifiés (Mitschke et al. 2011), et les blocs noirs les régions très fortement structurées en épingle à cheveux (Oliveira et Lindblad 2009, observations personnelles). les "+" verts indiquent le possible rôle activateur des régulateurs vis à vis de l'expression de *hox*, les "?" indiquent que les preuves ne sont pas complètes ou qu'aucun rôle n'a été proposé.

Figure 99

3-4- Conclusion

En conclusion de cet état de l'art, on retiendra que la régulation de l'hydrogénase et une question dont les réponses sont toujours aussi floues que celles concernant le rôle de cette même enzyme. Cependant les quelques bribes de connaissances sur ses régulateurs avérés et/ou potentiels permettent déjà de penser que le rôle de l'hydrogénase se joue à l'interface entre plusieurs métabolismes différents. Hox est en effet régulée par des facteurs transcriptionnels liés à l'assimilation du carbone ou de l'azote, et plusieurs ARNs non-codants dont l'abondance varie avec les conditions environnementales (en particulier la quantité de lumière reçue par les cellules) et susceptibles d'interagir à la fois avec l'ADN ou l'ARN transcrit pour en moduler l'expression ou la traduction. Indépendamment de ces facteurs *trans* et de leurs mode d'action, Hox est elle-même transcrite de différentes manières en fonction de la présence ou non d'oxygène, d'inhibiteurs de la photosynthèse ou dans d'autres conditions telles la carence en soufre.

Toutes ces différentes observations laissent penser que hox est une enzyme cyanobactérienne qui interviendrait lors de changements subtils ou drastiques des conditions environnementales. Quoi qu'il en soit, il s'agit d'une métalloenzyme complexe, dont la synthèse est très couteuse en énergie pour la cellule (l'enzyme elle-même et les machineries d'assemblage connue et potentiellement inconnues). L'expression de Hox est extrêmement contrôlée et sa régulation est très complexe.

Nul doute qu'un système aussi complexe doit forcément présenter une utilité et un avantage pour les organismes qui le possèdent. Cependant les conditions où ce caractère est avantageux n'ont pas encore pu être mises en évidence et les scientifiques restent encore dans le brouillard sur bien des questions liées à l'hydrogénase bidirectionnelle.

ARTICLE I

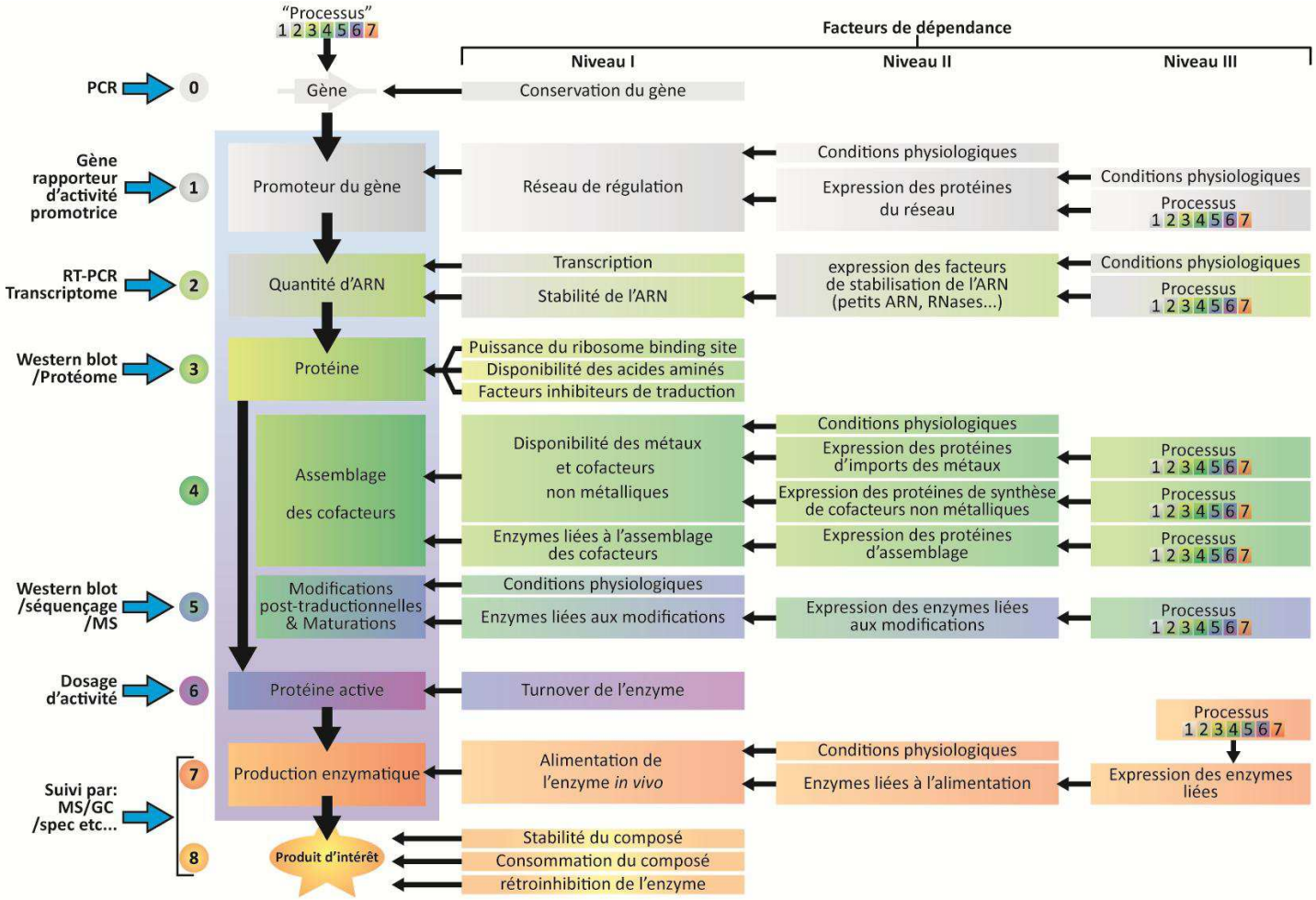
AbrB2 est un répresseur de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp. PCC6803

1- Un nouvel acteur de la régulation génique de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*

1-1- La biologie intégrative

Avant de présenter mes résultats, il me semble utile de rappeler les différents mécanismes par lesquels sont régulés l'expression des gènes, la traduction des protéines et l'activité enzymatique liée. De même je pense utile de rappeler les limites des techniques classiques de biologie qui permettent rarement d'obtenir une réponse simple est précise à une question.

La figure suivante résume ces mécanismes de régulation. Le processus simple (à gauche de la figure) : promotion du gène - quantité d'ARN - quantité de protéine - assemblage des cofacteurs - modification post-traductionnelles & maturation – production enzymatique – produit d'intérêt, constitue la vision la plus schématique de l'expression génique.



Les différents niveaux de régulation du gène au produit d'intérêt - L'approche intégrative

Vue schématique des différentes régulations et contraintes de l'expression génétique. Un code couleur est employé pour chaque niveau ainsi que pour ses facteurs de dépendance. Le bloc "Processus 1234567" indique que le bloc visé est lui même soumis à son propre schéma de régulation, au moins aussi complexe que le schéma ici représenté. Les flèches bleues indiquent les techniques classiques utilisées en biologie pour mesurer/quantifier les variations d'un de ces niveaux (MS: spectrométrie de masse, GC: chromatographie de gaz, spec: spectrométrie). Les mesures expérimentales ne réflètent que la somme de toutes les opérations biologiques, jamais, ou rarement d'une seule. Interpréter un résultat implique de tenir compte de chaque effet.

Figure 100

La vision plus réaliste consiste à considérer que chacune de ces étape est soumise à sa propre régulation :

- la promotion du gène est dépendante de sa force intrinsèque (les box -10 et -35) mais aussi de son réseau de régulation. Les protéines régulant cette expression sont elles-mêmes soumises à leur propres schéma de régulation, assemblage, modifications post-traductionnelles, et activités en fonctions des conditions physiologiques (dans le cas de l'hydrogénase, il s'agit par exemple de LexA et AbrB1, dont les propres quantités de transcrits et de protéines sont dépendantes des conditions environnementales et qui sont soumis à des modifications post-traductionnelles)
- La quantité d'ARN est le fruit de la transcription réalisée à l'étape précédente, ainsi que de la stabilité de ces ARNs. Cette stabilité pouvant être modulée par des protéines stabilisatrices ou déstabilisatrices, par des ARNs non codants, des Rnases spécifiques. Les facteurs de (dé)stabilisation étant eux-mêmes soumis à leur propres expression et aux conditions physiologiques (dans le cas de l'hydrogénase il peut s'agir par exemple des ARNs non codants identifiés en amont et en aval de l'opéron, et dont les quantités dépendent des conditions physiologiques).
- La quantité de protéine dépend bien évidemment de la quantité d'ARNs transcrit, mais également d'autres facteurs : la force du site de fixation du ribosome influe sur la quantité de protéines synthétisées à partir d'un même ARN, d'éventuelles carences en acides aminés essentiels peuvent affecter la synthèse dans certaines conditions particulières, et des facteurs de traduction peuvent l'affecter négativement ou positivement, ces derniers étant eux-mêmes soumis à leur propre expression, réseau de régulation, modulation d'activité etc... (comme par exemple la rna hélicase évoquée plus tôt, sous le contrôle de LexA et qui permet de modifier des structures complexes de l'ARN qui empêche sa traduction Patterson-Fortin et al. 2006, l'opéron *hox* comporte également de fortes structures secondaires de l'ARN dans zone 5' non-traduite)
- L'introduction des cofacteurs métalliques ou non métalliques est également une étape régulée. Dans le cas des métaux, leur disponibilité est évidemment limitée par l'environnement, par la bonne expression et le bon fonctionnement des transporteurs liés. De plus certains cofacteurs nécessitent une machinerie enzymatique d'assemblage particulière, elle-même soumise à sa propre expression, son propre assemblage et son propre fonctionnement qui dépend des conditions physiologiques (dans le cas de l'hydrogénase par exemple, il s'agit des métalloprotéines Hyp qui assemblent le site [NiFe])
- Modification post-traductionnelles : Ces modifications chimiques des protéines sont souvent le fruit de conditions physiologiques qui changent - un milieu plus oxydant par exemple peut modifier chimiquement des cystéines – mais pas toujours - méthylation ou acétylation de résidus souvent catalyser par d'autres protéines - et elles peuvent changer ou abolir l'activité de protéines dans certains cas. Les régulateurs de l'hydrogénase LexA et AbrB1 de *Synechocystis* sont modifiés post-traductionnellement, bien qu'on ne sache pas encore de quelle manière (voir paragraphes précédents) AbrB2 est également soumis à au moins une modification post-traductionnelle (résultat du laboratoire et Sazuka et al. 1999), et HoxH serait également soumise à une modification post-traductionnelle (résultat non publié du laboratoire).

- Maturation : cette étape facultative permet de compléter l'assemblage d'une enzyme. Dans le cas de l'hydrogénase, la sous-unité HoxH est par exemple soumise au clivage de sa partie C-terminale par la protéase HoxW afin de permettre le bon assemblage du site actif [NiFe]. Les facteurs de maturation sont naturellement soumis à leur propre régulation et expression.
- La protéine active est également soumise à son propre turn-over : souvent, après un nombre variable de réactions, les protéines se dégradent et doivent soit-être régénérées soit être réparées. Dans le cas de l'hydrogénase, l'O_2 peut parfois dégrader irréversiblement le site actif et la protéine doit être à nouveau synthétisée (mais ce n'est pas le cas chez *Synechocystis*, cette oxydation y est réversible..
- La production enzymatique en elle-même dépend aussi de nombreux facteurs : l'enzyme dispose-t-elle de suffisamment de substrats? Les enzymes qui produisent ces substrat sont-ils suffisamment abondants? Les conditions physiologiques sont-elles réunies pour que l'enzyme fonctionne? Dans le cas de l'hydrogénase, nous avons vu précédemment que son fonctionnement était opérant seulement dans certaines conditions, notamment en anaérobie ou en passage de l'anaérobie à la lumière (Cournac et al. 2004). De plus, le taux de réduction du pool de NADPH, substrat de l'hydrogénase, semble également être un paramètre déterminant du bon fonctionnement de l'enzyme (plus de 99,9%). Les voies métaboliques consommant le NADPH sont donc des « régulations » du fonctionnement de l'hydrogénase bidirectionnelle.
- Le composé produit lui-même peut-être soumis à régulation : souvent les enzymes qui le produisent sont inhibées par l'accumulation de la molécule qu'elles synthétisent (ce phénomène n'est pas encore très décrit concernant Hox), la consommation de la molécule par d'autres enzyme affecte également l'accumulation du composé (comme c'est par exemple le cas pour tous les intermédiaires métaboliques, concernant l'hydrogénase bidirectionnelle, il semble qu'elle consomme l'hydrogène qu'elle produit rapidement après l'avoir produit Cournac et al. 2004). La stabilité même du composé dans certains cas peut affecter son accumulation, ainsi que les conditions environnementales (les antioxydants par exemple sont synthétisés afin d'être rapidement oxydés à la place d'autres molécules/protéines plus importantes pour l'organisme).

Cette liste non exhaustive illustre la complexité de la régulation d'une enzyme.

Par ailleurs les outils expérimentaux du biologiste sont souvent insuffisants pour visualiser un seul paramètre isolé des autres. Ainsi vouloir voir une augmentation de la transcription d'un gène en quantifiant ses ARN dans un organisme est rigoureusement incorrect, la quantification d'ARN n'est pas que le fruit de la transcription, mais aussi de la stabilité de cet ARN qui peut varier d'une condition à l'autre. De même, une variation d'un élément isolé d'un réseau de facteur de transcription ne permet pas de prédire la réponse du reste du réseau ni l'effet sur le gène d'intérêt, un niveau de transcrit augmenté ne permet de garantir une augmentation de la traduction proportionnelle, un western-blot est insuffisant pour décrire un bon assemblage d'une métalloenzyme, un dosage d'activité enzymatique permet de connaître la quantité d'enzymes fonctionnelle dans l'organisme mais ne permet pas de connaître la quantité d'enzyme réellement alimentée dans les conditions physiologiques, la production enzymatique réelle permet de visualiser la production réelle du système, mais seule, cette technique n'informe pas sur la quantité de protéines réellement assemblées et maturées.

La biologie intégrative est une approche qui se propose de considérer un ensemble de résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* afin de décrire au mieux les phénomènes biologiques qui régissent une voie métabolique. Cette thèse porte sur la compréhension de la régulation de l'hydrogénase, et je me suis notamment focalisé sur différents aspects de ce processus : la caractérisation d'un de ses régulateurs : AbrB2, le rôle d'un des résidus de ce régulateur dans son activité: sa cystéine, et l'effet d'une modification post-traductionnelle cette cystéine.

Ensemble, ces résultats permettront, je l'espère, de mieux comprendre les mécanismes physiologiques qui régissent le fonctionnement de l'hydrogénase.

1-2- Introduction & résumé de l'article Dutheil et al. 2012

The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803.

Jérémy Dutheil, Panatda Saenkham, Samer Sakr, Christophe Leplat, Marcia Ortega-Ramos, Hervé Bottin, Laurent Cournac, Corinne Cassier-Chauvat et Franck Chauvat (J.D., P.S., et S.S. ont contribué autant à ces travaux)

Journal of Bacteriology p. 5423–5433 October 2012 Volume 194 Number 19 (doi:10.1128/JB.00543-12)

Cet article concerne le rôle du régulateur AbrB2 de *Synechocystis* sp. PCC6803 vis à vis de l'expression de l'opéron *hoxEFUYH* codant pour les sous-unités de l'hydrogénase bidirectionnelle.

Pour toutes les raisons évoquées dans les précédents chapitres et paragraphes, nous avons décidé de reprendre l'analyse du rôle d'AbrB2 de *Synechocystis* (Sll0822) dans le contexte génomique sauvage qui est la souche réellement identifiée dans la nature.

Le gène *sll0822* a été remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine. Après transformation dans la souche sauvage de *Synechocystis*, un mutant dépourvu d'*abrB2* a été obtenu (Fig 1 de l'article). Contrairement à ce qui a été observé par Ishii et Hihara (2008), ce mutant croît comme la souche sauvage dans les conditions standard de croissance (en photoautotrophie) (voir Fig. 1 panneau C de l'article) et ne montre pas d'altération de pigmentation (phycocyanines et chlorophylles).

Après expression et purification de la protéine recombinante His6-AbrB2 chez *E.coli*, nous avons pu montrer par des expériences de retard sur gel qu'AbrB2 reconnaissait sa propre région promotrice (figure 2). En utilisant des fusions transcriptionnelles au gène rapporteur *cat* nous avons pu montrer qu'AbrB2 était un auto-répresseur (voir Fig. 3A de l'article) et qu'il était exprimé à partir d'un promoteur atypique sans boite -35, dont l'absence est compensée par la présence d'une extension de la boite -10 (voir Fig. 3 A de l'article). Les caractéristiques de ce promoteur ont été retrouvées dans d'autres promoteurs d'AbrB2 chez diverses cyanobactéries (Voir Fig. 3B de l'article).

Pour mieux comprendre le rôle de Sll0822, et notamment son rôle de régulateur de la production d'hydrogène, nous avons également construit mutant thermo-conditionnel de surexpression d'AbrB2.

L'effet des variations de quantité d'AbrB2 (grâce aux mutants dépourvu ou surproducteur d'AbrB2) sur la régulation de l'opéron *hoxEFUYH* a ensuite été mesuré par RT-PCR quantitative (effet sur la transcription), par mesure d'activité promotrice de *hoxE*, via des fusions transcriptionnelles au gène rapporteur *cat*, ainsi que par mesure de l'activité hydrogénase (effet sur la quantité d'hydrogénase maturée et active). Les résultats obtenus sont consistants avec un rôle d'AbrB2 comme répresseur de l'opéron *hox*. En effet : dans une souche dépourvue d'AbrB2 on observe une augmentation de l'activité du promoteur *hox*, de la quantité d'ARN *hoxEFUYH*, ainsi que de l'activité hydrogénase. Tandis qu'au contraire, la quantité d'ARN *hox* ainsi que l'activité hydrogénase diminue dans un mutant surproducteur d'AbrB2 (voir figure 4 de l'article). La fixation d'AbrB2 sur le promoteur de *hoxE* a ensuite été vérifiée *in vitro* par retard sur gel (EMSA) et permet de conclure qu'AbrB2 est un nouveau répresseur transcriptionnel de l'opéron *hox* (voir figure 5 de l'article). Un motif consensus de fixation de d'AbrB2 a été également proposé (TT-N_5-AAC).

JB Journals.ASM.org

The AbrB2 Autorepressor, Expressed from an Atypical Promoter, Represses the Hydrogenase Operon To Regulate Hydrogen Production in *Synechocystis* Strain PCC6803

Jérémy Dutheil,[a] Panatda Saenkham,[a] Samer Sakr,[a] Christophe Leplat,[a] Marcia Ortega-Ramos,[a] Hervé Bottin,[b] Laurent Cournac,[c,d,e]* Corinne Cassier-Chauvat,[a] and Franck Chauvat[a]

UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LBBC, Gif sur Yvette, France[a]; UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LMB, Gif sur Yvette, France[b]; CEA, UMR7265, iBEB, LBBBM, CEA-Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, France[c]; CNRS, UMR7265, Saint Paul lez Durance, France[d]; and Aix Marseille Université, UMR7265, Saint Paul lez Durance, France[e]

We have thoroughly investigated the *abrB2* gene (sll0822) encoding an AbrB-like regulator in the wild-type strain of the model cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC6803. We report that *abrB2* is expressed from an active but atypical promoter that possesses an extended −10 element (TGTAATAT) that compensates for the absence of a −35 box. Strengthening the biological significance of these data, we found that the occurrence of an extended −10 promoter box and the absence of a −35 element are two well-conserved features in *abrB2* genes from other cyanobacteria. We also show that AbrB2 is an autorepressor that is dispensable to cell growth under standard laboratory conditions. Furthermore, we demonstrate that AbrB2 also represses the *hox* operon, which encodes the Ni-Fe hydrogenase of biotechnological interest, and that the *hox* operon is weakly expressed even though it possesses the two sequences resembling canonical −10 and −35 promoter boxes. In both the AbrB2-repressed promoters of the *abrB2* gene and the *hox* operon, we found a repeated DNA motif [TT-(N_5)-AAC], which could be involved in AbrB2 repression. Supporting this hypothesis, we found that a TT-to-GG mutation of one of these elements increased the activity of the *abrB2* promoter. We think that our *abrB2*-deleted mutant with increased expression of the *hox* operon and hydrogenase activity, together with the reporter plasmids we constructed to analyze the *abrB2* gene and the *hox* operon, will serve as useful tools to decipher the function and the regulation of hydrogen production in *Synechocystis*.

Cyanobacteria are ancient photoautotrophic prokaryotes that are regarded as the progenitors of oxygenic photosynthesis (33, 39) and the plant chloroplast (8). Over time, cyanobacteria have evolved as the largest and most diverse groups of bacteria (44) and have colonized most waters and soils of our planet. The hardiness of cyanobacteria is due to their efficient photosynthesis, which uses nature's most abundant resources, solar energy, water, CO_2, and mineral nutrients, to produce a large part of the atmospheric oxygen and organic assimilates for the food chain (52). On a global scale, cyanobacteria fix an estimated 25 gigatons of carbon from CO_2 per year into energy-dense biomass (37, 49). To perform this huge CO_2 fixation, cyanobacteria use 0.2 to 0.3% (49) of the total solar energy, 178,000 TW, reaching the Earth's surface (22). Thus, the amount of energy passing through cyanobacteria exceeds by more than 25 times the energy demand of human society (about 15 TW), roughly 1,000 times the total nuclear energy produced on Earth.

Furthermore, the availability of molecular tools for gene manipulation make cyanobacteria promising "low-cost" microbial cell factories for the carbon-neutral sustainable production of alkanes (10, 41), bioplastics (1), hydrogen (2, 12), and lipids (25, 43), while saving arable soils for crops (50). In light of their tremendous importance, deeper investigation into the mechanisms by which cyanobacteria convey solar energy to the environment is justified. In this frame, investigating the photobiological production of hydrogen by cyanobacteria has both fundamental and applied research values. As the basic research interest, it addresses the paradox of the antagonistic production of oxygen and hydrogen (O_2 inhibits H_2 production). As a biotechnological interest, it may lead to the sustainable production of a high-energy fuel (26), which burns cleanly in producing only water as its by-product.

The pentameric hydrogenase enzyme (HoxEFUYH; Hox for hydrogen oxidation) of cyanobacteria produces H_2 through the reversible reaction $2\,H^+ + 2\,e^- \leftrightarrow H_2$, which uses NAD(P)H as the source of electrons originating from photosynthesis and/or sugar catabolism, as well as a nickel-iron cluster and several iron-sulfur centers as redox cofactors (5). The Hox enzyme has been studied mostly in the best-characterized unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* strain PCC6803 (here designated *Synechocystis*), which harbors a small genome (less than 4 Mb [see CyanoBase, http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/]) that is easily manipulable (14, 29, 38). The active Hox enzyme, matured by the HoxW protease (47) and assembled using the six-subunit HypABCDEF complex (5), has been recently characterized as a truly bidirectional enzyme with a bias toward H_2 production (30). The five genes *hoxEFUYH* are clustered in a octacistronic operon that also contains three open reading

Received 13 April 2012 Accepted 27 July 2012
Published ahead of print 3 August 2012
Address correspondence to Franck Chauvat, franck.chauvat@cea.fr.
* Present address: Laurent Cournac, UMR Eco&Sols, IRD, CIRAD, INRA, Supagro, Montpellier, France.
J.D., P.S., and S.S. contributed equally to this work.
Supplemental material for this article may be found at http://jb.asm.org/.
Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/JB.00543-12

TABLE 1 Characteristics of plasmids used in this study

Plasmid use and name	Relevant feature(s)	Reference
Targeted deletion of *abrB2* in *Synechocystis*		
pGEMT	AT overhang Amp^r cloning vector	Promega
pUC4K	Source of Km^r marker gene	Pharmacia
pΔsll0822	pGEMT with *Synechocystis sll0822* flanking sequences, with *sll0822* coding sequence (from bp 7 to 384) replaced by SmaI site	This study
pΔsll0822::Km^r	pΔsll0822 with Km^r marker inserted into unique SmaI site	This study
High-level expression of *abrB2* in *Synechocystis*		
pFC1	Replicating plasmid for heat-inducible gene expression in *Synechocystis*	32
pSll0822	pFC1 with *sll0822* CS cloned between NdeI-EcoRI sites	This study
Analysis of *hox* and *abrB2* promoters in *Synechocystis*		
pSB2A	Km^r Sm^r/Sp^r replicative promoter probe plasmid harboring unique SnaBI site in front of its promoterless *cat* reporter gene	27
pPS1	Km^s derivative of pSB2A generated after cleavage with NsiI and religation	This study
pJD1	*hox* PR[a] (bp −794 to +173 relative to TSS) cloned at SnaBI site of pPS1	This study
pJD2	*hox* PR (bp −522 to +173 relative to TSS) cloned at SnaBI site of pPS1	This study
pJD3	*hox* PR (bp −403 to +173 relative to TSS) cloned at SnaBI site of pPS1	This study
pJD4	*hox* PR (bp −170 to +173, relative to TSS) cloned at SnaBI site of pPS1	This study
pPS2	*abrB2* PR (bp −75 to +88 relative to TSS) cloned at SnaBI site of pSB2A	This study
pPS2 m-8	pPS2 harboring T→G mutation at −8 position relative to TSS	This study
pPS2 m-13	pPS2 harboring T→G mutation at −13 position relative to TSS	This study
pPS2 m-15	pPS2 harboring T→G mutation at −15 position relative to TSS	This study
pPS2 m-4746	pPS2 harboring TT→GG mutation at positions −47 to −46 relative to TSS	This study
Production of AbrB2 in *E. coli*		
pET14b	Amp^r *E. coli* plasmid for production of 6×His-tagged proteins	Novagen
pSS1	pET14b plasmid with sll0822 CS cloned between NdeI and BamHI sites	This study

[a] PR, promoter region.

frames of unknown function. This operon is weakly expressed as a polycistronic transcript, which initiates 168 bp upstream of the start codon of the proximal *hoxE* gene (15, 35). The transcriptional regulation of the *hox* operon is complex in responding to various environmental conditions (21), and it involves at least three proteins (36). The LexA-related protein Sll1626, which appears to regulate carbon assimilation rather than DNA repair (9), was found to activate the transcription of the *hox* genes through binding to the promoter of the *hox* operon (15, 35). In addition, two AbrB-like regulators, which have their putative DNA-binding domain in the C-terminal region instead of in the usual N-terminal region, as occurs in other prokaryotes (19), were found to operate in *hox* regulation. In *Bacillus subtilis*, the AbrB regulator is implicated in the regulation of about 100 genes involved in sporulation, biofilm formation, antibiotic production, and development of competence for DNA uptake, but its promoter recognition consensus sequence and mode of interaction with DNA remain unclear (6). In *Synechocystis*, the AbrB1 (Sll0359) protein was found to be indispensable to cell life in the wild-type (WT) strain (34) and the glucose-tolerant mutant (19). Furthermore, AbrB1 was shown to bind to the promoter region of its own gene and to activate transcription of the *hox* operon through binding to the *hox* operon promoter (34). In contrast, AbrB2 (Sll0822) was studied only in the glucose-tolerant strain, which possesses several specific mutations that may interfere, at least indirectly, with the studied process (20). In the glucose-tolerant mutant, AbrB2 appeared to (i) be dispensable to cell life, (ii) bind to the promoter regions of its own gene and of other genes involved in nitrogen and carbon assimilations (19, 24, 51), and (iii) negatively influence expression of the *hox* operon via an unknown mechanism (19).

In this study, we thoroughly investigated the function and regulation of the *abrB2* gene in the wild-type strain of *Synechocystis*, because it is the organism that actually occurs in nature. We demonstrate that *abrB2* is expressed from an atypical promoter that possesses an extended −10 element to compensate for the absence of a −35 box. Furthermore, we demonstrate through gene deletion and overexpression that AbrB2 represses its own gene, as well as the *hox* operon, which is of biotechnological interest. We think that our *abrB2*-deleted mutant with an improved hydrogenase activity and healthy growth, and also the reporter plasmids we constructed to analyze the promoters of the *abrB2* gene and the *hox* operon, will serve as useful tools to decipher the regulation and the function of the hydrogen production machine in cyanobacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. *Synechocystis* PCC6803 was grown at 30°C or 39°C (depending on the strain) under continuous white light (2,500 lx, 31.25 μE m^{-2} s^{-1}) on BG11 medium (40) enriched with 3.78 mM Na_2CO_3 (9).

E. coli strains used for gene manipulations (TOP10; Invitrogen), production of recombinant proteins [BL21(DE3); Novagen], or conjugative transfer to *Synechocystis* (CM404; [31]) of replicative plasmids (Table 1) derived from our temperature-controlled expression vector pFC1 (32) were grown on LB medium at 30°C (CM404 and TOP10 harboring pFC1 derivatives) or 37°C [TOP10 and BL21(DE3)]. Antibiotic selection was as follows: for *E. coli*, ampicillin (Ap) at 100 μg ml^{-1} or 50 μg ml^{-1}, kanamycin (Km) at 50 μg ml^{-1}, and spectinomycin (Sp) at 100 μg ml^{-1} for *E.*

coli; for *Synechocystis*, Km at 50 to 300 μg ml^{-1}, Sp at 5 μg ml^{-1}, and streptomycine (Sm) at 5 μg ml^{-1}.

Construction of the DNA cassette for targeted deletion of the *Synechocystis abrB2* gene. The two regions of *Synechocystis* DNA (each about 300 bp in length) flanking the *abrB2* (sll0822) protein coding sequence (CS) were independently amplified by PCR, using the primers sll0822M-Fw and sll0822R4 for the upstream region and sll0822M-Rv and sll0822A4 for the downstream region (see Table S1 in the supplemental material). These two DNA regions were fused through standard PCR-driven overlap extension (17) in a single DNA segment harboring a SmaI restriction site in place of the *abrB2* CS. After cloning in pGEMT (Table 1), the resulting plasmid was opened at the unique SmaI site, where we cloned the Km^r resistance cassette (a HincII fragment of pUC4K) in the same orientation as the *abrB2* CS it replaced. The resulting Δsll0822::Km^r deletion cassette was verified by PCR and nucleotide sequencing (BigDye kit; ABI, Perkin-Elmer).

Construction of the vector for high-level expression of the *abrB2* gene in *Synechocystis*. Our temperature-controlled expression vector pFC1, which replicates autonomously in *E. coli* and several cyanobacteria (32), was used for high-level expression of the *Synechocystis abrB2* gene. pFC1 harbors the λ*c*I857 temperature-sensitive repressor-encoding gene that tightly controls the activity of the otherwise-strong λ*p*R promoter located downstream, which is followed by the λ*cro* ribosome-binding site (5′-AGGA-3′) and ATG start codon (in bold) embedded within the unique NdeI restriction site (5′-CAT**ATG**-3′) for in-frame fusion of protein coding regions. The *abrB2* CS was PCR amplified from *Synechocystis* DNA, using specific primers (sll0822FL1 and sll0822FL2 [see Table S1 in the supplemental material]), which flanked the *abrB2* CS between unique NdeI and EcoRI restriction sites, for cloning into pFC1, opened with the same enzymes. The Smr/Spr resulting plasmid, pSll0822, for high-level expression of *abrB2* at 39°C was verified by PCR and nucleotide sequencing (BigDye kit; ABI Perking Elmer).

RNA isolation. Aliquots of 200 ml of mid-log-phase cultures (2.5 × 10^7cells ml^{-1}) were rapidly harvested by vacuum filtration (less than 1 min), resuspended in 4 ml of 50 mM Tris 50 (pH 8), 5 mM EDTA, immediately frozen in an Eaton press chamber cooled in a dry ice and ethanol bath, and disrupted (250 MPa). RNA was extracted and purified with the Qiagen RNeasy kit as we have previously described (18) and then treated with 20 U of DNase I, RNase-free (Applied Biosystems) for 30 min at 37°C. RNA concentration and purity (A_{260}/A_{280} ratio, >1.9) were determined with a Nanodrop apparatus (Thermo Scientific) and migration on an agarose gel to verify the absence of RNA degradation. The absence of contaminant DNA was verified with the *Taq* DNA-dependent DNA polymerase (Invitrogen) using primers specific to the control gene *rnpB* (see Table S1 in the supplemental material).

RT-PCR and quantitative PCR. cDNAs were synthesized from 5 μg of total RNA by using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (RT; Invitrogen). Samples were then incubated for 20 min at 37°C with 4 U RNase H (Applied Biosystems) to eliminate RNA templates, and the cDNA concentration was measured with Nanodrop apparatus adjusted to 1 μg μl^{-1} by dilution in H_2O. Quantitative PCR (qPCR) assays of the expression levels of the studied genes and the well-known constitutive control gene *rnpB* (see Table S1 in the supplemental material) were performed with Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR assay (RT-SYS2X-03+WOU; Eurogentec) according to the manufacturer's instructions. The gene-specific primers were chosen so as to generate DNA fragments of similar length, between 199 bp and 234 bp. Each reaction was performed in a 50-μl reaction mixture containing 5 ng cDNA, 0.04 μM specific primer, 1× Mesa Green qPCR MasterMix Plus buffer, and 2 mM $MgCl_2$ in an iCycler iQ 96-well reaction plate covered with adhesive film (Bio-Rad). Samples were incubated in an iQ5 multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad) for 2 min at 50°C, 2 min at 95°C, and 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Each assay was performed in triplicate, allowing the mean threshold cycle value (C_T) to be calculated from standard curve by using the iQ5 optical system software (Bio-Rad). Each gene-specific standard curve was made by 4-fold serial dilution of wild-type strain cDNA (ranging from 312.5 to 0.3 ng) compared to the log input cDNA concentration for each primer (data not shown). For each primer tested, the regression value (ΔC_T versus cDNA concentration) was less than 0.1, indicating approximately equal amplification efficiencies. Then, for each studied gene, the C_T value was converted to the gene copy number per ng of template cDNA.

Determination of the TSS of sll0822 by 5′-random amplification of cDNA ends (5′-RACE). Aliquots of 25 μg of total RNAs of the *Synechocystis* WT strain were treated with shrimp alkaline phosphatase (SAP), which does not affect the 5′-triphosphate extremity of full-length mRNAs but dephosphorylates the 5′-monophosphate end of degraded RNA. Then, RNAs were treated with tobacco acid pyrophosphatase (TAP; Epicentre) to convert the 5′-triphosphate extremity of full-length mRNA into the 5′-monophosphate without modifying the 5′-OH end of degraded RNA. The 5′-monophosphate extremity of the full-length mRNAs was ligated to an RNA anchor (see Table S1 in the supplemental material) with the T4 RNA ligase (Invitrogen). The resulting chimeric RNAs were reverse transcribed with SuperScript II (Invitrogen) and the sll0822 gene-specific primer sll0822P1 (see Table S1). This first strand of cDNA was amplified by PCR using both the DNA anchor at the 5′ extremity and the sll0822P1 primer at the 3′ side. The resulting DNA was sequenced (BigDye kit; ABI Perkin-Elmer) to identify the first sll0822 nucleotide located immediately downstream of the DNA anchor, which is the sll0822 transcription start site (TSS) (see Fig. S1 in the supplemental material).

Construction of transcriptional fusions to the *cat* reporter gene and the CAT assay. The studied promoter regions were amplified by PCR with specific oligonucleotides designed to introduce blunt-ended restriction sites in a way that allowed the elimination of all nucleotide substitutions upon restriction cleavage (see Table S1 in the supplemental material). These promoters were cloned in the unique SnaBI site preceding the promoterless *cat* (chloramphenicol acetyltransferase) reporter gene of our promoter probe vector pSB2A or of its Km^s derivative, pPS1 (Table 1), which replicate in *Synechocystis* with the same copy number as the chromosome (27). Site-directed mutagenesis of the sll0822 promoter was done through standard PCR-driven overlap extension (17) using specific mutagenic primers (see Table S1) and the forward and reverse primers SnaBIFW22 and SnaBIRV22. The sequence of each promoter insert was verified, before and after propagation in *Synechocystis*. Then, 1 × 10^9 to 2 × 10^9 cells grown on standard plates to mid-log phase were rapidly harvested and disrupted with a chilled Eaton press prior to CAT assay (28).

AbrB2 production and purification from *E. coli*. The *abrB2* coding sequence was PCR amplified from *Synechocystis* DNA with the primers abrB2-NdeI-Fw and abrB2-BamHI-Rv (see Table S1 in the supplemental material), digested with both NdeI and BamHI, and cloned into the pET14b plasmid opened with the same enzymes for in-frame fusion to the 6×His tag. The resulting plasmid, pSS1 (Table 1), was introduced into *E. coli* BL21(λDE3), which was grown to mid-log phase prior to the addition of 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h to produce the 6×His-AbrB2 protein. Cells were harvested by centrifugation at 7,000 rpm for 5 min at 4°C, suspended in buffer A (30 mM Tris-HCl [pH 7.5], 400 mM NaCl, 20 mM imidazole) containing 2 mg/ml lysozyme (Sigma-Aldrich), and incubated for 1 h on ice. After sonication on ice (6 pulses, 20 s each) and centrifugation (13,000 rpm for 30 min at 4°C), cell lysates were loaded onto a 1 ml Ni-nitrilotriacetic acid–agarose column (Qiagen) preequilibrated with buffer A and washed with 10 bed volumes of 30 mM imidazole in buffer A. The proteins eluted with 300 mM imidazole in buffer A were analyzed by SDS-PAGE. AbrB2-containing fractions were pooled, concentrated with Amicon Ultra centrifugal filter devices (Millipore), diluted in buffer B (30 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl), loaded onto a heparin column (GE Healthcare) preequilibrated with buffer B, and washed with 10 bed volumes of buffer B. AbrB2 was eluted with a linear 0-to-500 mM NaCl gradient in 30 mM Tris (pH 7.5), and the AbrB2-enriched fractions were pooled, concentrated, and stored

in 30 mM Tris (pH 7.5), 400 mM NaCl. AbrB2 protein purity, estimated by SDS-PAGE, was greater than 95%.

Electromobility shift assays (EMSAs). The studied promoter regions were PCR amplified from *Synechocystis* DNA with specific primers (see Table S1 in the supplemental material) purified, 3′-end-labeled with digoxigenin (DIG gel shift kit, 2nd generation; Roche), incubated with AbrB2, migrated on a Novex 6% DNA retardation gel (Invitrogen), blotted on a positively charged nylon membrane (Roche) with a semidry transfer apparatus (Apelex), and cross-linked onto the membrane with a 2-min UV-C (254 nm) exposure (Stratalinker). The DNA bands were revealed with anti-DIG antibodies by chemiluminescence, using Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia) and Kodak developer.

Hydrogenase activity measurements. Hydrogenase activities were measured by two standard methods. First, hydrogen evolution was measured with a modified Clark-type electrode (Hansatech, United Kingdom) (48) as described previously by some of us (46). A total of 2.5×10^7 cells (1-ml culture at an optical density at 580 nm of 1) were harvested by a 5-min centrifugation at 5,000 rpm, resuspended in 25 μl of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer, and introduced into 500 μl of a solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM Na-dithionite, and 5 mM methylviologen as the electron donor to hydrogenase. Calibration was performed using the amplitude of the electrical signal from the electrode in the presence of an aliquot of H_2-saturated water as a concentration reference. Second, hydrogenase activity (the H/D exchange rate of labeled dihydrogen) was determined by membrane-inlet mass spectrometry (MIMS) on cell suspensions, as we have described previously (3, 7).

RESULTS

The *abrB2* gene is dispensable to the viability of the wild-type strain of *Synechocystis*. In the framework of our long-term interest in gene regulation, we have investigated the AbrB2 regulator (Sll0822 in CyanoBase) of the model cyanobacterium *Synechocystis*. Therefore, we constructed the Δ*abrB2*::Km^r deletion cassette (Table 1), in which the complete coding sequence for the 129-amino-acid AbrB2 protein has been deleted and replaced by a transcription terminatorless Km^r marker for selection (Fig. 1A). After transformation in the WT strain of *Synechocystis*, we verified through PCR (Fig. 1B) and DNA sequencing (data not shown) that the Km^r marker had properly replaced the *abrB2* gene in all copies of the polyploid chromosome (13, 23). We also verified through RT-PCR and quantitative RT-PCR that the mutant completely lacked *abrB2* mRNA (data not shown). These data, together with the fact that the Δ*abrB2*::Km^r mutant grows as healthy as the WT strain (Fig. 1C), showed that the AbrB2 protein is dispensable to the growth of *Synechocystis*. This finding is consistent with, but not identical to, the previous observation that the insertion of the Km^r marker at 177 bp downstream of the ATG start codon of *abrB2* (possibly leading to the synthesis of an aberrant protein) did not impair the viability but strongly reduced the growth rate of the glucose-tolerant mutant of *Synechocystis* (19), which has several specific mutations compared to the WT strain (20), i.e., the organism actually occurring in nature.

AbrB2 negatively regulates expression of its own gene through binding to its own promoter. The *Synechocystis* AbrB2 protein was translationally fused to the 6×His tag for facile purification from recombinant *E. coli* cells to near homogeneity through nickel affinity chromatography. Then, this 6×His-AbrB2 protein was used for an EMSA to determine its ability to bind the DIG-labeled, 163-bp-long promoter region (Fig. 2) shared by the divergently transcribed genes *abrB2* and slr0846 (Fig. 1). We found that AbrB2 binds on this 163-bp full promoter region, in agreement with a previous observation (19), and on the two sub-

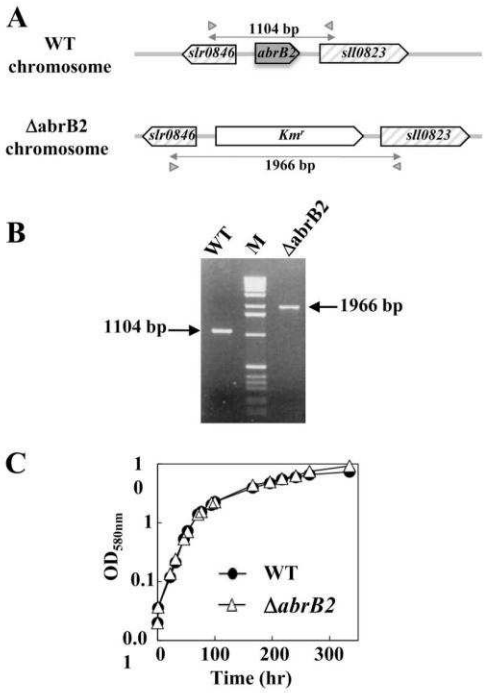


FIG 1 Influence of the AbrB2 regulator on growth of *Synechocystis* under standard conditions. (A) Schematic representation of the *abrB2* chromosome locus in the WT strain (see CyanoBase) and the *abrB2*-deleted mutant (Δ*abrB2*::Km^r) constructed in this study. The genes are represented by boxes pointing in the direction of their transcription. The PCR primers specific to the slr0846 and sll0823 genes are represented by the small gray triangles, and the sizes of the products they generated upon amplification of the *abrB2* chromosome locus of the WT (1,104 bp) and *abrB2*-deleted (Δ*abrB2*::Km^r; 1,966 bp) chromosomes are indicated by double arrows. (B) UV light image of the agarose gel, showing the 1,104-bp and 1,966-bp PCR product typical of the WT and *abrB2*-deleted chromosomes, respectively; the results show that the *abrB2*-deleted mutant harbors no WT copies of the chromosome. (C) Growth of the WT strain and the Δ*abrB2* mutant (this experiment was repeated three times and yielded statistical deviations too small to be represented).

fragments tested here (Fig. 2); thus, the promoter region contains several AbrB2-binding motifs (see below). As negative-control experiments, we verified the absence of binding of (i) AbrB2 on a heterologous (noncyanobacterial) DNA (see Fig. S2 in the supplemental material) and (ii) the bovine serum albumin (BSA) protein on the *abrB2* promoter DNA (see Fig. 5B, below; see also Fig. S2 in the supplemental material). The obvious interpretation of the binding of AbrB2 on its own promoter is that AbrB2 is an autoregulator. To test this hypothesis, we performed a thorough *in vivo* analysis of the *abrB2* promoter by using our promoter probe vector, which harbors the promoterless *cat* reporter gene for promoter analysis and replicates autonomously in *Synechocystis* with a similar copy number as the chromosome (27). We cloned the whole intergenic region (163 bp) between the divergently transcribed genes *abrB2* and slr0846 in front of the *cat* reporter gene, and we selected the p*abrB2-cat* reporter plasmid (pPS2 [Table 1]) expressing the *cat* gene from the *abrB2* promoter. This p*abrB2-cat* plasmid (Table 1) was introduced in both the WT strain and our *abrB2* deletion mutant (Δ*abrB2*::Km^r), where it replicated stably, as expected (data not shown). The level of *cat* expression driven by the *abrB2* promoter in the WT strain (44 CAT units [Fig. 3A]) was

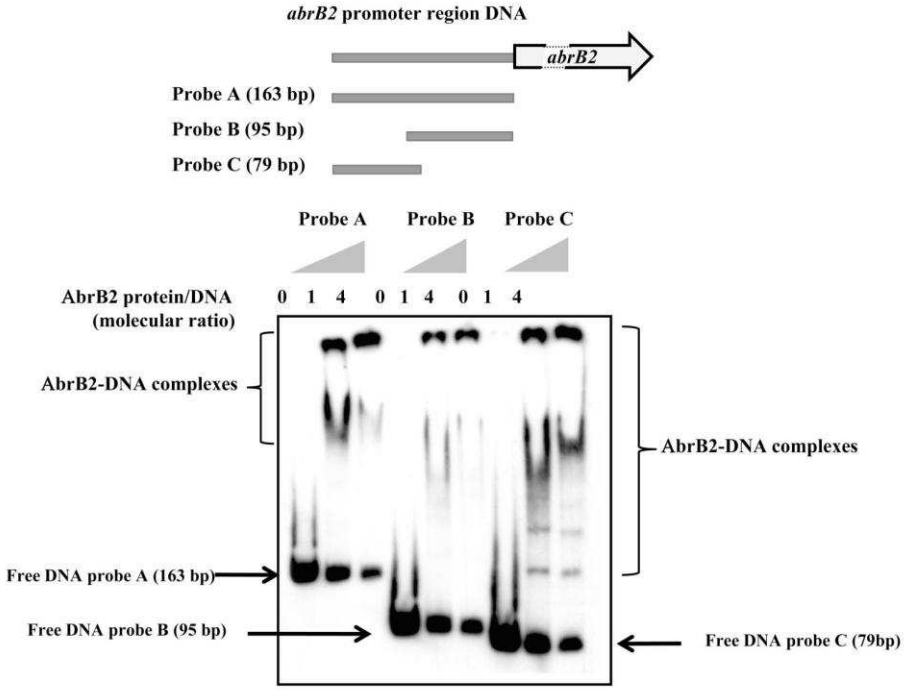


FIG 2 Electrophoretic migration shift assay of binding of the AbrB2 regulator to the promoter region of its own gene. (Top) Schematic representation of the *abrB2* gene, showing its 163-bp promoter region (gray line) and its protein-coding sequence (boxed arrows), which is interrupted (dashed lines) for the sake of size limitation. The positions and sizes of the three DNA fragments of the *abrB2* promoter region used as targets for AbrB2 binding are indicated as probes A, B, and C. (Bottom) Analysis of the electrophoretic mobility of the DIG-labeled segments of the *abrB2* promoter region, following incubation with increasing amounts of purified 6×His-AbrB2 protein. Arrows and regions delineated by braces indicate the positions of the free DNA probes and the retarded DNA-protein complexes, respectively.

similar to that directed by the other promoters we previously analyzed (references 11 and 45 and references therein). This finding indicates that the *abrB2* promoter has an average strength. As the usual control, we verified that the empty promoter probe vector with no promoter insert produced no CAT activity. Very interestingly, the *abrB2* promoter was found to be more active (about 3-fold) in the *abrB2* deletion mutant (131 CAT units), i.e., in the absence of the AbrB2 protein, thereby demonstrating that AbrB2 negatively regulates the expression of its own gene. Collectively, our data unambiguously demonstrate, for the first time, that AbrB2 is an autorepressor.

The core promoter of the *abrB2* gene possesses an "extended −10 element" which compensates for the absence of a −35 box. Using the classical 5′-RACE technique (42), which has performed well in our hands (11, 45), we mapped the TSS of *abrB2*. It is the G nucleotide located 87 bp upstream of the ATG start codon (see Fig. S1 in the supplemental material). Then, we performed a mutational analysis of the *abrB2* promoter to identify its *cis*-acting elements. We studied the 5′-TAatAT-3′ hexamer (lowercase letters indicate nucleotides that are not widely conserved) matching the canonical −10 box of σ^{70}-type *Escherichia coli* promoters (16) with regard to both sequence (5′-TAatAT-3′) and its position (−13 to −8) from the TSS, the above-mentioned G nucleotide we used as the origin of distance (noted as +1 [see Fig. S1 in the supplemental material]). As anticipated, this 5′-TAatAT-3′ *abrB2* element behaves as a −10 promoter box, as it is crucial to transcription. Indeed, transversion mutagenesis of either its presumably important T nucleotides (5′-TAatAT-3′ to 5′-GAatAT-3′ and 5′-TAatAT-3′ to 5′-TAatAG-3′) completely abolished *abrB2* promoter activity (Fig. 3A; reporter plasmids pPS2m-13 and pPS2m-8, respectively), as we previously observed with the −10 box of several *Synechocystis* promoters (references 11 and 45 and references therein). In the *abrB2* promoter, we also noticed the presence of a 5′-TTGAac-3′ motif, resembling a canonical −35 box (16) in sequence (5′-TTGACA-3′) but not position (28 bp instead of 17 ± 1 bp, the usual spacing distance from the −10 box). We mutagenized this 5′-TTGAac-3′ *abrB2* element and found that it was not crucial to promoter activity (Fig. 3A, pPS2m-4746 plasmid), unlike a −35 promoter box. Instead, this *abrB2* 5′-TTGAac-3′ motif appeared to negatively influence the activity of the *abrB2* promoter (Fig. 3A). Then, having in mind that the absence of a −35 promoter box can be compensated by the presence of an "extended −10 box" mediating all contacts with the RNA polymerase σ^{70} factor (4), we mutagenized the upstream T of the presumptive extended −10 box, 5′-TGTAATAT-3′ of the *abrB2* promoter. As anticipated, this mutation (5′-TGTAATA T-3′ to 5′-GGTAATAT-3′ decreased the *abrB2* promoter activity (Fig. 3A, pPS2m-15 plasmid), similarly to what we found in the case of the "extended −10 box" of the *secA* promoter (28). In agreement with its crucial importance for *abrB2* transcription, we found the "extended −10 box," 5′-TGTAATAT-3′, to be highly conserved in the promoter region of the *abrB2* genes from other cyanobacteria (Fig. 3B). Collectively, our data indicate that the *abrB2* promoter possesses an extended −10 element to compen-

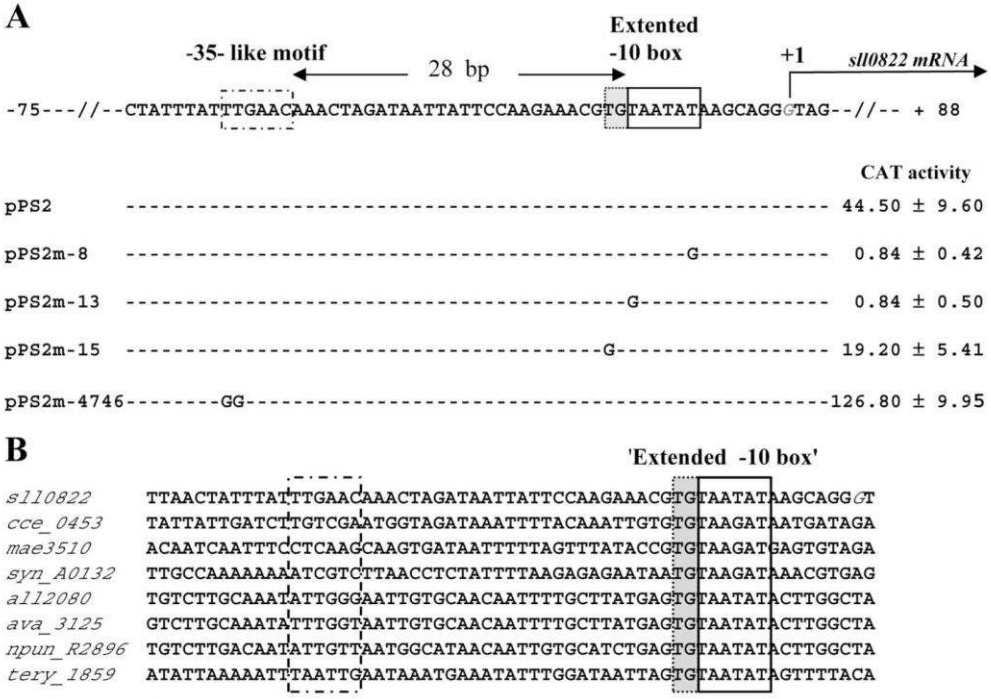


FIG 3 Mutational analysis in *Synechocystis* of the *abrB2* promoter transcriptionally fused to the *cat* reporter gene of our replicative promoter probe vector. (A) Sequence alignment of the nontranscribed DNA strand of the WT (pPS2 reporter plasmid) and mutant (pPS2m reporter plasmids) *abrB2* promoters. Sequence resembling the −35 and extended −10 promoter elements are boxed, and the origin of transcription (+1; G nucleotide in italics) that we mapped in this study (see Fig. S1 in the supplemental material) is indicated by the bent arrow. Nucleotide substitutions in the mutant promoters (m-8, m-13, m-15, and m-4746) are shown in uppercase letters, while the conserved nucleotides are indicated by dashed lines. For each reporter strain, the CAT activity is the mean value of three measurements performed on two independent cellular extracts; 1 CAT unit = 1 nmol of chloramphenicol acetylated/min/mg of protein. (B) Sequence alignments of the *abrB2* promoter regions from various cyanobacteria resembling *Synechocystis* in that their *abrB2* gene is divergently transcribed with an opposite gene. Besides *Synechocystis* PCC6803 (sll0822), these cyanobacteria are as follows: *Cyanothece* ATCC 51142 (cce_0453), *Microcystis aeruginosa* NIES-843 (mae_35130), *Nostoc* PCC 7120 (all2080), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (ava_3125), *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (npun_R2896), and *Trichodesmium erythraeum* ISM101 (tery_1859). The positions of the conserved extended −10 promoter element and of the nonconserved sequence resembling a −35 element in *Synechocystis* are indicated by boxes.

sate for the absence of a −35 box and that these features are conserved in other cyanobacteria.

AbrB2 negatively regulates both the expression and the hydrogenase activity of the *hoxEFUYH* operon. We used quantitative RT-PCR to analyze the influence of the AbrB2 regulator on the transcript abundance of the eight-gene *hox* operon, namely, sll1220 (*hoxE*), sll1221 (*hoxF*), sll1222, sll1223 (*hoxU*), sll1224 (*hoxY*), ssl2420, sll1225, and sll1226 (*hoxH*). Therefore, total RNAs were isolated from WT and *abrB2*-deleted (Δ*abrB2*::Km^r) cells growing under standard conditions and were subsequently hybridized with the gene-specific RT-PCR primers (see Table S1 in the supplemental material) designed to amplify a segment of each of the eight protein-coding sequences of the *hox* operon (Fig. 4A). All eight transcripts were found to be at least 2.5-fold more abundant in the *abrB2*-deleted mutant than in the WT strain (Fig. 4B). As a negative control, we verified the absence of *abrB2* transcripts in the *abrB2*-deleted mutant (data not shown). Together, these data show that AbrB2 negatively regulates the *hox* operon in WT cells of *Synechocystis*, in agreement with what was observed in the glucose-tolerant mutant (19). From these results one can anticipate that the hydrogenase activity should increase in response to the absence of the AbrB2 regulator. Therefore, we used the two classical methods to measure the level of hydrogenase activity, which appeared to be at least 2-fold higher in our *abrB2*-deleted mutant than in the WT strain (Fig. 4B), as expected. To confirm that AbrB2 negatively regulates the expression of the *hox* operon and the activity of the hydrogenase in *Synechocystis*, we constructed an *abrB2* overexpression mutant, as follows. We cloned the *abrB2* protein-coding sequence into our temperature-controlled expression vector, pFC1, which replicates autonomously in cyanobacteria and tightly controls the production of the studied protein according to the growth temperatures, i.e., no production at 30°C and strong production after 24 h of induction at 39°C (32, 38). The resulting pSll0822 plasmid was introduced by conjugative transfer in *Synechocystis* cells, which were transferred for 24 h at 39°C to verify the strong induction of *abrB2* expression (27-fold [data not shown]) and the concomitant downregulation (by at least 2-fold) of *hox* expression and hydrogenase activity (Fig. 4C). Collectively, these results demonstrate that AbrB2 negatively regulates expression of the *hox* operon and activity of the hydrogenase in *Synechocystis*.

AbrB2 negatively regulates the activity of the *hox* operon promoter. We used our promoter probe vector to test whether AbrB2 negatively controls the promoter of the *hoxEFUYH* operon. As *Synechocystis* promoters can be complex in harboring several *cis*-acting regulatory elements (references 9 and 45 and

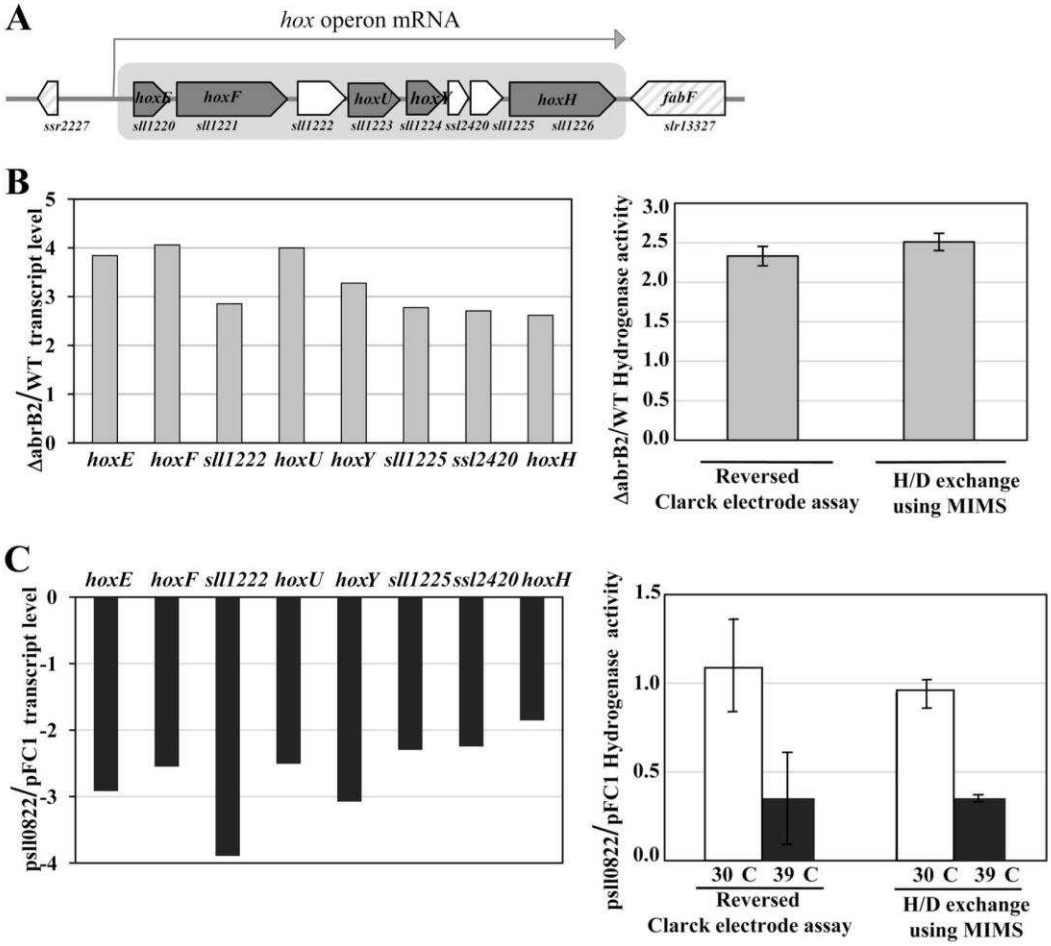


FIG 4 Analysis of expression of the hydrogenase-encoding genes and of hydrogenase activity in various strains of *Synechocystis* harboring a wild-type *abrB2* gene (WT), a deletion of *abrB2* (Δsll0822::Km^r), a plasmid (psll0822) for high-level expression of *abrB2* inducible by 24 h of growth at 39°C, or the empty expression vector (pFC1). All results are expressed as means ± standard deviations of the data obtained after 3 to 6 biological repetitions of each assay. (A) Schematic representation of the locus of the octacistronic *hox* operon. The genes are represented by boxes pointing in the direction of their transcription; boxes are gray in the case of the *hox* genes. (B, left) Histogram plots of the ratios of transcript abundance (measured by quantitative real-time PCR) of each gene of the octacistronic *hox* operon in the *abrB2*-deleted mutant over the WT strain. (Right) Histogram representation of the hydrogenase activity ratios in Δ*abrB2* over WT cells measured with the MIMS assay and a reversed Clark-type electrode, as indicated. (C, left) Histograms showing the transcript level ratios of each gene of the octacistronic *hox* operon, in cells propagating psll0822 over those propagating pFC1, which were all grown for 24 h at 39°C prior to qRT-PCR analysis. (Right) Histogram representation of the hydrogenase activity ratios of cells propagating psll0822 over those propagating pFC1, before (white rectangles) or after (black rectangles) 24 h of growth at 39°C, prior to MIMS and Clark-type electrode assays, as indicated.

references therein), we cloned in our vector the whole *hox* promoter region occurring between the opposite genes *hoxE* and ssr2227, along with the first 5 bp of their protein-coding sequences (Fig. 5A). This 967-bp *hox* promoter region extends from −794 to +173 nucleotides relative to the transcription start site (the A nucleotide mapped by other workers [15, 35], which we used as the origin of distance). Our *hoxprom-cat* reporter plasmid (pJD1 [Fig. 5A]) weakly expressed the *cat* gene in *Synechocystis* (less than 1 CAT unit), thereby indicating that the *hox* promoter was weakly active, in agreement with the low abundance of *hox* transcripts (34). However, the low activity of the *hox* promoter seemed at variance with the occurrence in this promoter of the two sequences resembling canonical promoter boxes, −35 (TTGctc) and −10 (TAacAa), which are located at correct distances from each other (18 bp) and from the transcription start site (7 bp). This apparent discrepancy prompted us to speculate that the AbrB2 regulator, which negatively regulates the expression of the *hox* operon (Fig. 4), operates at the level of *hox* promoter activity. To verify this hypothesis, we introduced the *hox-cat* reporter plasmid pJD1 in the *abrB2*-deleted mutant (Δ*abrB2*::Km^r), and *cat* expression was found to be much higher (about 13 CAT units [Fig. 5A]) than in WT cells, as expected.

Then, to meaningfully examine the EMSA analysis of the binding of AbrB2 on the *hox* promoter, we subcloned the long *hox* regulatory region (967 bp) in our promoter probe vector. Then, we serially deleted the 5′ end of the *hox* regulatory region while keeping its 3′ end intact, because such promoter downstream regions can contain negative *cis*-acting elements (9, 28, 45). As ex-

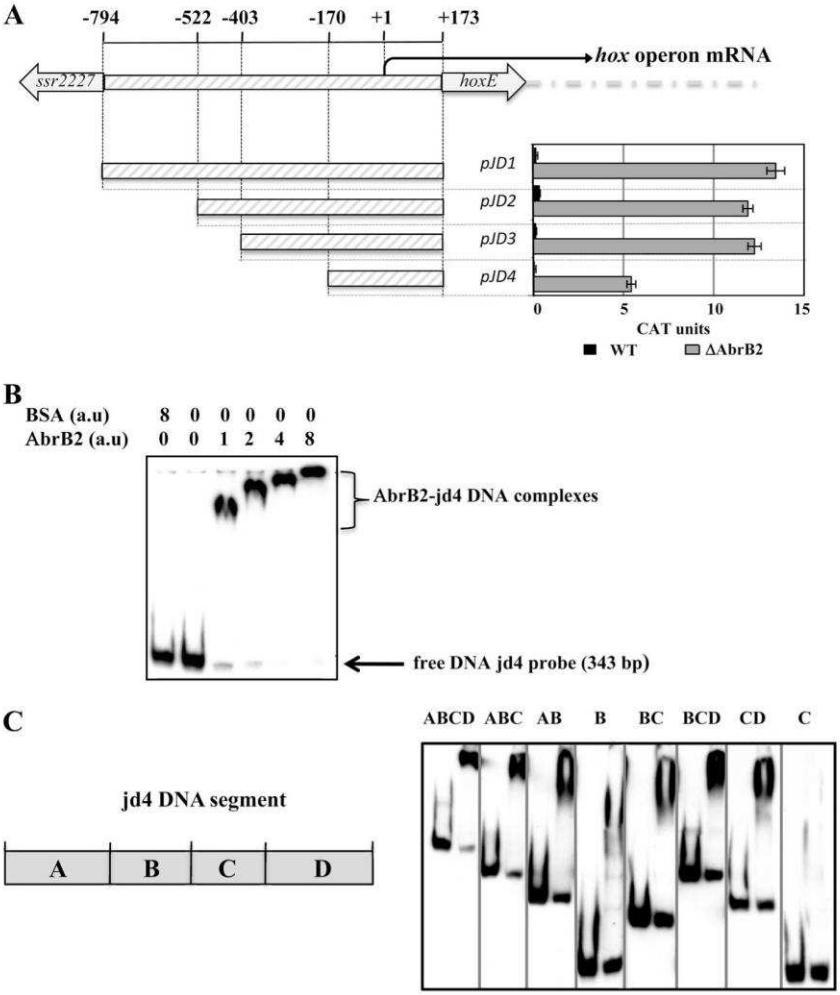


FIG 5 Analysis of the *hoxEFUYH* operon promoter through transcriptional fusion to the *cat* reporter gene and electrophoretic migration shift assay results for binding of the AbrB2 regulator. (A, top) Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon promoter region (thick gray lines) located between the *hoxE* protein-coding sequence and the opposite (putative) transposase gene, ssr2227. The nucleotide positions within the *hoxEFUYH* operon promoter region are indicated relative to the transcription start site (bent arrow), taken as the origin of distance (noted as +1). For the sake of clarity, the operonic genes downstream of *hoxE* are indicated by the large dashed gray line. (A, bottom) Deletion analysis of the *hox* operon promoter region transcriptionally fused to the *cat* reporter gene of our replicative promoter probe vector. CAT specific activities driven by the resulting reporter plasmids replicating in *Synechocystis* WT or Δ*abrB2* (hatched gray bars) are expressed in nmol of chloramphenicol acetylated/min/mg of protein. They are the mean values ± standard deviations calculated from three independent experiments. (B and C) Analysis of the electrophoretic mobility of the DIG-labeled JD4 segment, or subsegments thereof, noted as A, B, C, and D, of the *hox* operon promoter, following incubation with increasing amounts of purified 6×His-AbrB2 regulator or the BSA negative-control protein. Arrows and braces indicate the positions of the free DNA probes and the retarded DNA-protein complexes, respectively.

pected, we identified a shorter *hox* regulatory region (343 bp; plasmid pJD4) that retained a promoter activity that was negatively regulated by the AbrB2 protein (i.e., higher in Δ*abrB2*::Km^r cells than WT cells) (Fig. 5A). Together, our data show that AbrB2 negatively regulates the expression of the *hox* operon at the level of its promoter activity.

AbrB2 represses expression of the *hox* operon through binding to its promoter and flanking regions. Using the suitably sized *hox* operon promoter region (343 bp; JD4 DNA) (Fig. 5A), we performed EMSAs to show that AbrB2 binds on the *hox* promoter region (Fig. 5B), as expected. The apparent size of the AbrB2-*hox* retardation complex appeared to increase in parallel with the increase in the molecular ratio of AbrB2 over *hox* DNA, indicating that several AbrB2 molecules can bind to each *hox* DNA molecule. As the usual controls for specific affinity of AbrB2 for *hox* DNA, we verified the absence of interaction between the *hox* DNA and the BSA control protein and that the abundance of the DIG-labeled *hox*-AbrB2 complex was decreased by the presence of an excess of unlabeled *hox* DNA (see Fig. S2 in the supplemental material).

We also tested the binding of AbrB2 on various segments of the 343-bp JD4 *hox* promoter region in an attempt to better localize the AbrB2-binding sites, and we named the segments A, B, C, and D for the sake of clarity. Fragment A (100 bp) is located upstream of fragment B (74 bp), which harbors the core promoter with the −35-like and −10-like boxes, followed by the downstream frag-

ments C (69 bp) and D (100 bp), in that order (Fig. 5C). We found that AbrB2 bound to all tested subregions, with the noticeable exception of fragment C alone (Fig. 5C). The occurrence of distant AbrB2-binding regions in the *hox* promoter regions suggests the possible involvement of a DNA looping mechanism in the AbrB2-mediated regulation of *hox* transcription.

DISCUSSION

It is important to thoroughly study the mechanisms controlling the expression of the cyanobacterial genes encoding the Ni-Fe bidirectional hydrogenase in order to better understand its role in the global metabolism of the cell and possibly generate new cell factories for better production of H_2. The pentameric hydrogenase Hox enzyme (HoxEFUYH) is mostly studied in the best-characterized cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. In *Synechocystis*, the five *hox* genes are grouped together with three genes of unknown function in an octacistronic "*hox*" operon (Fig. 4), which generates rare transcripts (5, 36). In the context of our long-term interest in gene expression, we decided to test whether this was due to the weak activity of the *hox* operon promoter. Therefore, we cloned the *hox* promoter region upstream of the promoterless *cat* reporter gene of our promoter probe plasmid vector, which replicates autonomously in *Synechocystis* at the same copy number as the chromosome (27). Our *hoxprom-cat* reporter plasmid (pJD1 [Fig. 5]) directed a very low level of *cat* expression in *Synechocystis* (less than 1 CAT unit), showing, for the first time, that the *hox* promoter is weakly active. This finding is at variance with the occurrence in the *hox* promoter of sequences resembling the canonical −35 (TTGctc) and −10 (TAacAa) promoter boxes (15, 35). Consequently, we speculated that the *hox* promoter might be controlled by a negative regulator. Hence, we became interested in the AbrB2 protein, which resembles the pleiotropic AbrB repressor of *B. subtilis* (6, 19). Working with the glucose-tolerant mutant of *Synechocystis*, which harbors several mutations with unknown physiological consequences (20), it was shown that the disruption of the sll0822 gene (here, *abrB2*) increased by about 2-fold the abundance of the *hox* transcripts monitored with DNA microarrays (19). Consequently, we decided to test the influence of AbrB2 on the expression and promoter activity of the *hox* operon. For this purpose, we used the wild-type strain of *Synechocystis*, because it is actually this strain that was originally isolated from nature. First, we deleted the *abrB2* gene from all copies of the *Synechocystis* chromosome, which is polyploid (13, 23), and we found that the corresponding mutant grew as well as the wild-type strain (Fig. 1). This result was similar, but not identical, to what was observed in the glucose-tolerant mutant, in which the inactivation of the *abrB2* gene strongly reduced the growth rate (19). This discrepancy might result from the differences in the strains (see above), growth conditions, and/or gene manipulation protocols employed by the two laboratories. While the previous workers introduced the Km^r marker inside the *abrB2*-coding sequence (at 177 bp downstream of the ATG start codon), which might thereby encode an aberrant protein impeding cell growth, we replaced the full *abrB2*-coding sequence with the Km^r marker to preclude the synthesis of AbrB2 (we have verified the absence of the *abrB2* gene [Fig. 1] and its transcripts [data not shown]).

Using our *abrB2*-deleted mutant, we verified through quantitative RT-PCR that the absence of AbrB2 increased (at least 2.5-fold) the transcript abundance of all eight genes of the *hox* operon (Fig. 4). In agreement, we showed, for the first time, that the amount of active hydrogenase was also increased (about 2-fold) in the absence of AbrB2 (Fig. 4). To confirm these findings, we constructed an *abrB2* overexpression mutant, by cloning the *abrB2* protein-coding sequence into our temperature-controlled expression vector, pFC1, which replicates autonomously in *Synechocystis* and strongly produces the studied protein after 24 h of induction at 39°C (32, 38). As expected, the resulting cells strongly expressed *abrB2* (27-fold more than noninduced cells) and concomitantly downregulated (at least 2-fold) *hox* expression and hydrogenase activity (Fig. 4). Furthermore, we showed that AbrB2 negatively regulated the activity of the *hox* promoter through binding to it (Fig. 5). Together, these novel findings demonstrate unambiguously that AbrB2 represses the *hox* operon. Furthermore, we found distant AbrB2-binding regions in the *hox* promoter region (Fig. 5), thereby suggesting the possible involvement of a DNA looping mechanism in the AbrB2-mediated repression of *hox* transcription. A similar hypothesis has been proposed for LexA-mediated regulation of the *hox* operon (36).

We also studied the expression and the regulation of the *abrB2* gene. First, we mapped its transcription start site (see Fig. S1 in the supplemental material), and we analyzed its promoter through mutations and transcriptional fusions to the promoterless *cat* reporter gene of our promoter probe plasmid vector (27). We report that *abrB2* is expressed from an atypical promoter harboring an extended −10 element (5′-TGTATAAT-3′) that compensates the absence of a −35 box (5′-TTGACA-3′) (Fig. 3), similarly to what we found previously for the *secA* gene (28). Confirming the biological significance of our results, we found the occurrence of an extended −10 promoter element and the absence of a −35 box to be two well-conserved features in the *abrB2* genes from various cyanobacteria (Fig. 3). Also, interestingly, we found the *abrB2* promoter to be about 3-fold more active in the *abrB2* deletion mutant (131 CAT units) than in the WT strain (44 units), thereby demonstrating that AbrB2 negatively regulates expression of its own gene. Furthermore, we verified through EMSA analysis (Fig. 2) that AbrB2 binds on its own promoter, in agreement with a previous observation (19). Collectively, our data demonstrate unambiguously that AbrB2 is an autorepressor that also represses the *hox* operon.

Finally, when looking for a DNA motif that occurs in the *abrB2* promoter and the *hox* promoter subfragments A, B, and D, which all bind AbrB2, but not in the C segment of the *hox* promoter, which does not bind AbrB2, we identified a consensus motif, TT(N_5)AAC, as being possibly involved in AbrB2 binding (see Fig. S2 in the supplemental material). In agreement with this hypothesis, the mutation of the TT(N_5)AAC motif (TTGAACAAAC to GGGAACAAAC), which overlaps the presumptive −35 box of the *abrB2* promoter, appeared to increase (not decrease) the activity of the *abrB2* promoter (Fig. 3).

We believe that our *abrB2*-deleted mutant with an improved hydrogenase activity and also our reporter plasmids for the analysis of the *abrB2* gene and *hox* operon in various host strains with relevant genetic backgrounds will help in deciphering the regulation and the function of the hydrogen production machine, so as to improve it.

ACKNOWLEDGMENTS

J.D. and P.S. were, respectively, recipients of Ph.D. and postdoctoral fellowships from the CEA (France). This work was supported by the

Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-09-BIOE-002-01 (EngineeringH2cyano) and the CNRS (Centre National recherche scientifique) Programme Interdisciplinaire Energie PIE2 (Reprogramhydrogen), as well as the HélioBiotec platform, funded by the European Union, Région PACA, French Ministry of Research, and the CEA.

We thank Patrick Carrier and Pierre Richaud for their help in the MIMS analysis of the hydrogenase activity.

REFERENCES

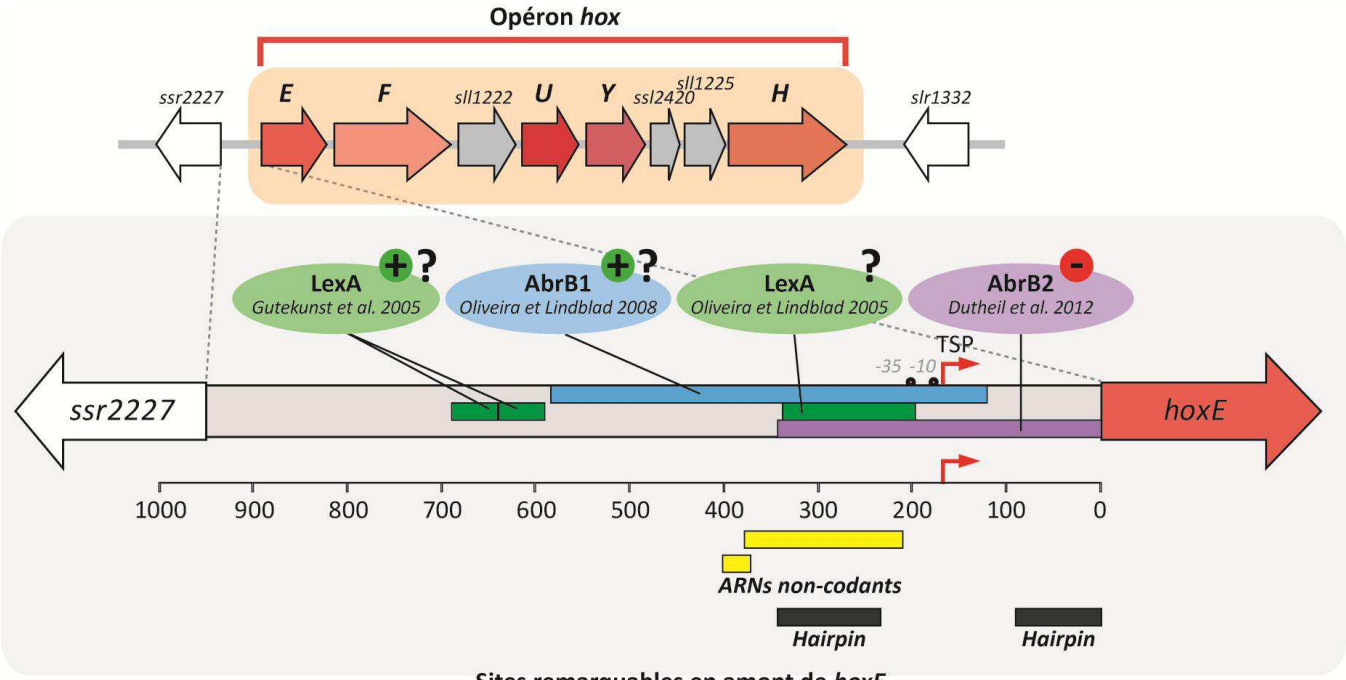
1. **Abed RM, Dobretsov S, Sudesh K.** 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. J. Appl. Microbiol. **106**:1–12.
2. **Angermayr SA, Hellingwerf KJ, Lindblad P, de Mattos MJ.** 2009. Energy biotechnology with cyanobacteria. Curr. Opin. Biotechnol. **20**:257–263.
3. **Aubert-Jousset E, Cano M, Guedeney G, Richaud P, Cournac L.** 2011. Role of HoxE subunit in *Synechocystis* PCC6803 hydrogenase. FEBS J. **278**:4035–4043.
4. **Barne KA, Bown JA, Busby SJ, Minchin SD.** 1997. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the extended-10′ motif at promoters. EMBO J. **16**:4034–4040.
5. **Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu J, Maness PC.** 2011. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. Bioresour. Technol. **102**: 8368–8377.
6. **Coles M, et al.** 2005. AbrB-like transcription factors assume a swapped hairpin fold that is evolutionarily related to double-psi beta barrels. Structure **13**:919–928.
7. **Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM.** 2004. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. J. Bacteriol. **186**:1737–1746.
8. **Deusch O, et al.** 2008. Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. Mol. Biol. Evol. **25**:748–761.
9. **Domain F, Houot L, Chauvat F, Cassier-Chauvat C.** 2004. Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. Mol. Microbiol. **53**:65–80.
10. **Ducat DC, Way JC, Silver PA.** 2011. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. Trends Biotechnol. **29**:95–103.
11. **Garcin P, et al.** 2012. A transcriptional-switch model for Slr1738-controlled gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis*. BMC Struct. Biol. **12**:1. doi:10.1186/1472-6807-12-1.
12. **Ghirardi ML, Dubini A, Yu J, Maness PC.** 2009. Photobiological hydrogen-producing systems. Chem. Soc. Rev. **38**:52–61.
13. **Griese M, Lange C, Soppa J.** 2011. Ploidy in cyanobacteria. FEMS Microbiol. Lett. **323**:124–131.
14. **Grigorieva G, Shestakov S.** 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. FEMS Microbiol. Lett. **13**:367–370.
15. **Gutekunst K, et al.** 2005. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. Mol. Microbiol. **58**:810–823.
16. **Hawley DK, McClure WR.** 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Nucleic Acids Res. **11**:2237–2255.
17. **Heckman KL, Pease LR.** 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nat. Protoc. **2**:924–932.
18. **Houot L, et al.** 2007. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the metabolism of *Synechocystis* PCC6803, under the control of the Slr1738 regulator. BMC Genomics **8**:350. doi:10.1186/1471-2164-8-350.
19. **Ishii A, Hihara Y.** 2008. An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Physiol. **148**:660–670.
20. **Kanesaki Y, et al.** 2012. Identification of substrain-specific Mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. DNA Res. **19**:67–79.
21. **Kiss E, Kos PB, Vass I.** 2009. Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. J. Biotechnol. **142**:31–37.
22. **Kruse O, Rupprecht J, Mussgnug JH, Dismukes GC, Hankamer B.** 2005. Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. Photochem. Photobiol. Sci. **4**:957–970.
23. **Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P.** 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. J. Bacteriol. **171**:3449–3457.
24. **Lieman-Hurwitz J, et al.** 2009. A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO2 by modulating low-CO2-induced gene expression. Environ. Microbiol. **11**:927–936.
25. **Liu X, Fallon S, Sheng J, Curtiss R III.** 2011. CO_2-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108**:6905–6908.
26. **Maeda T, Sanchez-Torres V, Wood TK.** 2008. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. Microb. Biotechnol. **1**:30–39.
27. **Marraccini P, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Mermet-Bouvier P, Chauvat F.** 1993. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. Plant Mol. Biol. **23**:905–909.
28. **Mazouni K, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 1998. Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. Mol. Microbiol. **30**:1113–1122.
29. **Mazouni K, Domain F, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2004. Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. Mol. Microbiol. **52**:1145–1158.
30. **McIntosh CL, Germer F, Schulz R, Appel J, Jones AK.** 2011. The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H_2 production. J. Am. Chem. Soc. **133**:11308–11319.
31. **Mermet-Bouvier P, Cassier-Chauvat C, Marraccini P, Chauvat F.** 1993. Transfer and replication of RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the genera *Synechocystis* and *Synechococcus*. Curr. Microbiol. **27**:323–327.
32. **Mermet-Bouvier P, Chauvat F.** 1994. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. Curr. Microbiol. **28**:145–148.
33. **Mulkidjanian AY, et al.** 2006. The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**:13126–13131.
34. **Oliveira P, Lindblad P.** 2008. An AbrB-Like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J. Bacteriol. **190**:1011–1019.
35. **Oliveira P, Lindblad P.** 2005. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. FEMS Microbiol. Lett. **251**:59–66.
36. **Oliveira P, Lindblad P.** 2009. Transcriptional regulation of the cyanobacterial bidirectional Hox-hydrogenase. Dalton Trans. **2009**: 9990–9996.
37. **Paumann M, Regelsberger G, Obinger C, Peschek GA.** 2005. The bioenergetic role of dioxygen and the terminal oxidase(s) in cyanobacteria. Biochim. Biophys. Acta **1707**:231–253.
38. **Poncelet M, Cassier-Chauvat C, Leschelle X, Bottin H, Chauvat F.** 1998. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. Mol. Microbiol. **28**:813–821.
39. **Rasmussen B, Fletcher IR, Brocks JJ, Kilburn MR.** 2008. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. Nature **455**:1101–1104.
40. **Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY.** 1979. Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. **111**:1–61.
41. **Schirmer A, Rude MA, Li X, Popova E, del Cardayre SB.** 2010. Microbial biosynthesis of alkanes. Science **329**:559–562.
42. **Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA.** 2006. Amplification of 5′ end cDNA with 'new RACE.' Nat. Protoc. **1**:3056–3061.
43. **Sheng J, Vannela R, Rittmann BE.** 2011. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. Bioresour. Technol. **102**: 1697–1703.
44. **Shi T, Falkowski PG.** 2008. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**:2510–2515.
45. **Soni B, Houot L, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2012. Prominent role of the three *Synechocystis* PchR-like regulators in the defense against metal and oxidative stresses. Open J. Biochem. **1**:1. http://www.rossscience.org/ojbb/articles/2227-7021-1-1.htm.
46. **Sybirna K, et al.** 2008. Shewanella oneidensis: a new and efficient system for expression and maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. BMC Biotechnol. **8**:73. doi:10.1186/1472-6750-8-73.

47. **Tamagnini P, et al.** 2007. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. FEMS Microbiol. Rev. **31**:692–720.
48. **Wang R, Healey FP, Myers J.** 1971. Amperometric measurement of hydrogen evolution in chlamydomonas. Plant Physiol. **48**:108–110.
49. **Waterbury JB, Warson SW, Guillard RRL, Brand JE.** 1979. Widerspread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. Nature **277**:293–294.
50. **Williams PG.** 2009. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. Trends Biotechnol. **27**:45–52.
51. **Yamauchi Y, Kaniya Y, Kaneko Y, Hihara Y.** 2011. Physiological roles of the cyAbrB transcriptional regulator pair Sll0822 and Sll0359 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J. Bacteriol. **193**:3702–3709.
52. **Zehr JP.** 2011. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. Trends Microbiol. **19**:162–173.

1-3- Conclusion

Cet article a permis une meilleure caractérisation d'AbrB2. C'est un auto-régulateur qui agit comme répresseur de l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*. Il s'agit de la troisième protéine identifiée qui interagit avec la région génomique en amont de *hoxE*. Mais surtout, il s'agit du premier régulateur de l'opéron *hoxEFUYH* dont le rôle a pu être décrit de manière détaillée : l'effet d'AbrB2 a ainsi été vu au niveau de l'activité promotrice de *hoxE* et au niveau transcriptionnel dans des mutants dépourvu ou surproducteur d'*abrB2*. L'effet répresseur au niveau de l'activité hydrogénase dans ces deux mêmes mutants a aussi été validé. Tous ces différents résultats sont concordants et permettent de proposer qu'AbrB2 est un répresseur du promoteur de l'opéron *hox* codant pour l'hydrogénase bidirectionnelle.

L'architecture de la région promotrice réalisé avec les données de la littérature, peut donc être mise à jour avec les nouveaux éléments apportés par cet article afin. Par contre certaines informations indiquées par la littérature restent à prendre avec du recul.



Sites remarquables en amont de *hoxE*

La zone intergénique entre les gènes *hoxE* et le gène *ssr2227* s'étend sur 963pb. Les sites de fixation d'AbrB1, AbrB2 et LexA sont indiqués en bleu, violet et vert (respectivement), les + et - indiquent les rôles des régulateurs vis à vis de l'expression de *hox*, les "?" indiquent que les preuves ne sont pas complètes ou qu'aucun rôle n'a été proposé. La petite flèche rouge indique le start de la transcription de *hoxE* en position -168. Les blocs jaunes représentent des ARNs non-codants identifiés (Mitschke et al. 2011), et les blocs noirs les régions très fortement structurées en épingle à cheveux (Oliveira et Lindblad 2009, observations personnelles).

Figure 101

2- Résultats complémentaires

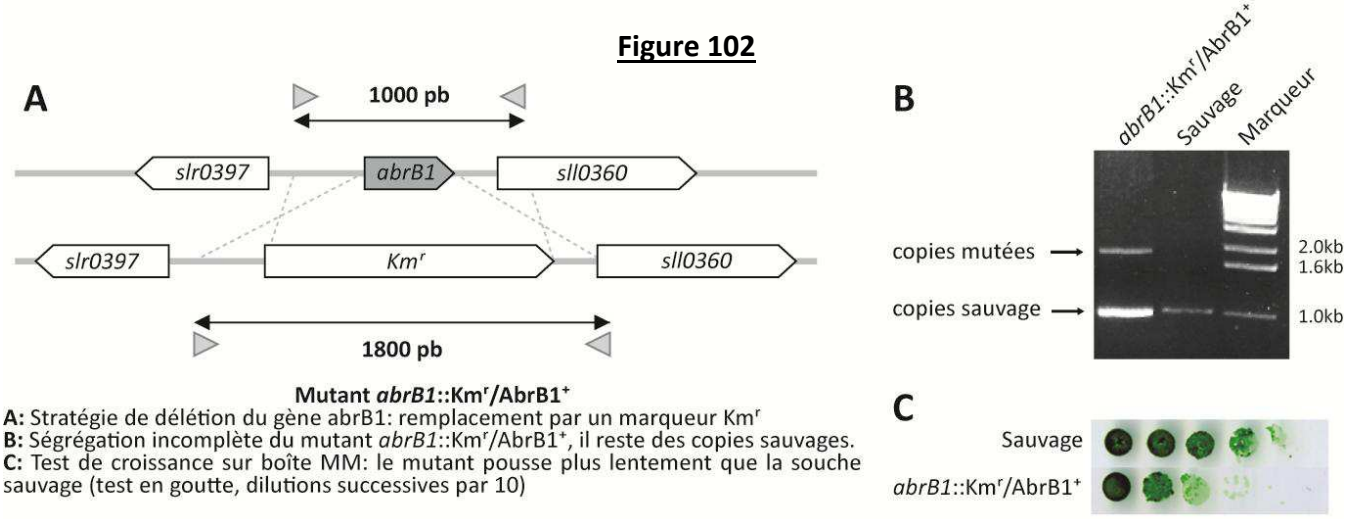
Cette partie comporte des résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse, ainsi que des travaux d'autres personnes du laboratoire qui permettent d'affiner encore la compréhension globale de la régulation de la production d'H_2.

L'enjeu de détailler ces résultats est de mieux caractériser les rôles de chacun des régulateurs entre eux, ou vis à vis de hox, et de permettre la construction d'un réseau de régulation.

2-1- Le mutant *abrB1*::Km^r

J'ai construit une cassette de délétion d'*abrB1*, après transformation dans *Synechocystis* sp. PCC6803, seuls des clones ayant gardé des copies sauvages ont été obtenus, confirmant qu'*abrB1* est un gène essentiel à la croissance, comme ce fut le cas dans les quelques revues relatant la construction de ce mutant (Oliveira et Lindblad 2008 pour *Synechocystis* sp. PCC6803, Ishii et Hihara 2008 pour *Synechocystis* tolérante au glucose, Agervald et al. 2009 pour *Nostoc* sp. PCC7120).

Figure 102



Mutant *abrB1*::Km^r/AbrB1$^+$
A: Stratégie de délétion du gène abrB1: remplacement par un marqueur Km^r
B: Ségrégation incomplète du mutant *abrB1*::Km^r/AbrB1$^+$, il reste des copies sauvages.
C: Test de croissance sur boîte MM: le mutant pousse plus lentement que la souche sauvage (test en goutte, dilutions successives par 10)

Δ*abrB1*::Km^r/AbrB1$^+$ a un temps de génération supérieur à la souche sauvage (non montré) et une moins bonne capacité à former des cellules en croissance sur boîte (Fig 102). Le clone déplété en *abrB1*, *abrB1*::Km^r/AbrB1$^+$ possède également moins de phycocyanines et chlorophylles et une quantité de caroténoïdes similaire à la souche sauvage (Fig 103). Ce résultat indique une déficience de l'appareil photosynthétique pouvant être la cause de son incapacité à croître aussi rapidement que la souche sauvage. Si AbrB1 intervient sur le processus de la photosynthèse, c'est normal qu'on ne puisse pas totalement le déléter de *Synechocystis* dans ces conditions. Les cellules peuvent croître en absence de photosynthèse (mixotrophie), notamment en présence de glucose et sous faible lumière (conditions où des mutants sans photosystèmes peuvent être obtenus). Cela n'a toutefois pas permis d'obtenir un mutant complètement ségrégé. Ainsi, AbrB1 n'est pas uniquement essentiel à la croissance en photoautotrophie.

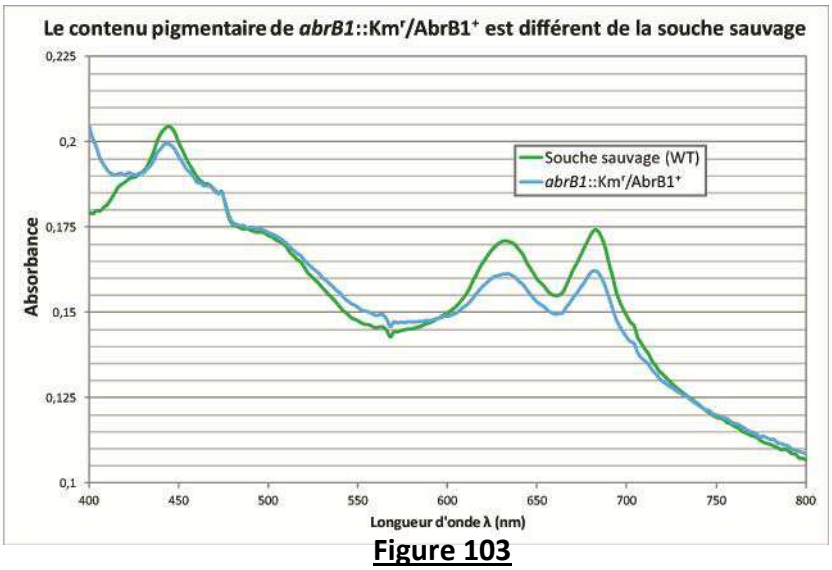
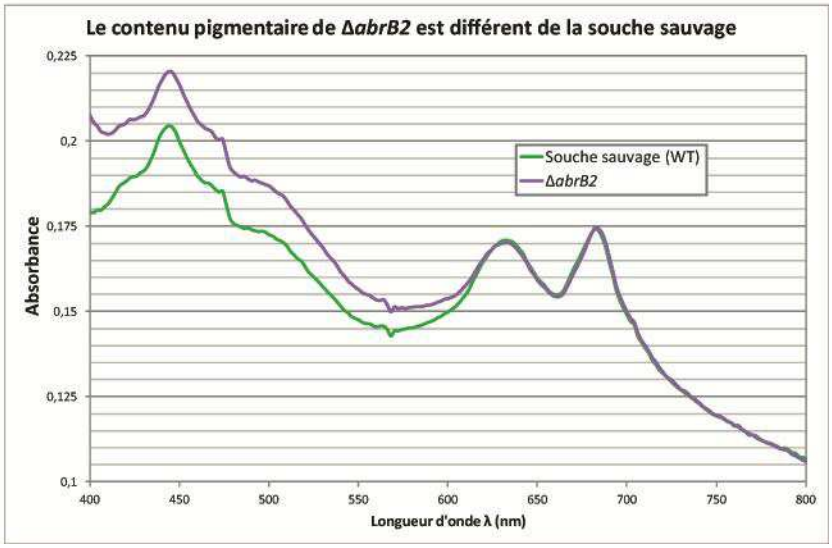


Figure 103

2-2- Le mutant Δ*abrB2*

2-2-1- Le contenu pigmentaire de Δ*abrB2* est différent de la souche sauvage

Figure 104



Comme indiqué dans l'article Dutheil et al. 2012, notre mutant Δ*abrB2* présente un phénotype différent de celui présenté par Ishii et Hihara 2008. Notre mutant présente une croissance identique à la souche sauvage, mais une composition pigmentaire différente, notamment, on observe que notre mutant possède plus de caroténoïdes, tandis que le mutant décrit par les japonais possède moins de chlorophylles et de phycocyanines (resp. -20% et -25%, ils ne font pas mention des caroténoïdes). Nous proposons dans l'article que la différence pourrait être due au caractère mutant « glucose tolérante » de la *Synechocystis* japonaise, car dans notre cas ce sont tous nos Δ*abrB2,* même issus de transformations très espacées dans le temps qui nous ont donné des résultats similaires, il ne peut donc s'agir du phénotype d'un clone isolé en particulier.

Les caroténoïdes sont généralement liés à la protection contre le stress oxydant dans le vivant. Le fait d'en détecter davantage dans le mutant Δ*abrB2* pourrait indiquer que cette souche subit plus de stress oxydant dans les conditions de culture du laboratoire, ou que son système de synthèse des caroténoïdes particulièrement déréglé.

2-2-2- Phénotypes de résistance de *ΔabrB2*

Plusieurs tests physiologiques ont été menés par Panatda Saenkham lors de son passage au laboratoire, ils nous indiquent sur le rôle biologique que tient ce régulateur dans la cellule (ces résultats sont encore non publiés).

Ces résultats sont *a priori* consistants avec l'augmentation de la quantité de caroténoïdes dans les cellules : nous relevons en effet une bien meilleure résistance du mutant *ΔabrB2* à toute une série de stress métalliques et oxydants qu'il s'agit de tenter d'expliquer.

Grâce à la comparaison des transcriptomes *ΔabrB2*/souche sauvage effectué au laboratoire (Leplat et al. 2013), on sait qu'AbrB2 est majoritairement un régulateur négatif des gènes qu'il contrôle directement ou indirectement et que plusieurs gènes liés à la défense contre le stress oxydant sont sous sa dépendance et sont induits dans le mutant *ΔabrB2*. Ainsi, même si les cellules sont en conditions standard de croissance, deux hypothèses sont envisageables :

- La relation entre AbrB2 et les gènes liés à la défense contre le stress oxydant est directe et les gènes sont constitutivement surexprimés dans le mutant, conférant une résistance permanente à la souche. (Ce caractère de surexpression « permanente » d'un gène inutile en conditions de non stress constitue probablement un gaspillage énergétique et un désavantage évolutif en milieu naturel).
- La relation entre AbrB2 et ces gènes est indirecte, et ils sont induits en réponse à un stress oxydant constitutif que ressentirait la cellule à cause de la mutation. Dans ce cas les gènes de défense contre le stress oxydant sont surexprimés afin d'assurer la survie de la

souche. Sans doute qu'en conditions moins favorables qu'en laboratoire le mutant se comporterait moins bien.

Nous reviendrons plus loin sur d'autres phénotypes du mutant

2-3- Les mutants Δ*lexA* et Δ*cymR (construits par Panatda Saenkham et Sandrine Farci)*

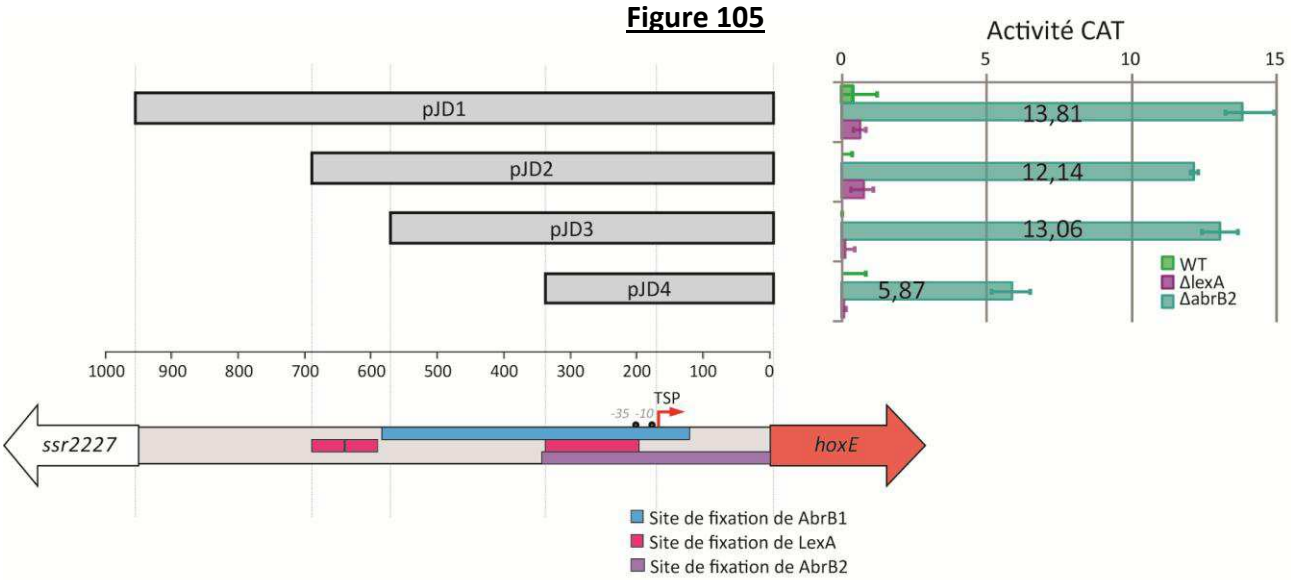
Au laboratoire, ces 2 mutants ont pu être construits selon la même technique que les 2 précédents. *cymR* (*slr0846*) est le gène en opposition d'*abrB2*, codant pour un régulateur transcriptionnel qui pourrait être impliqué dans l'homéostasie du soufre et qui a récemment été identifié comme jouant un rôle encore non clair vis à vis des photosystèmes I et II, particulièrement en se fixant en amont des gènes *psaAB*, sous-unités cruciales du PSI (Midorikawa et al. 2009). Les protéines de sa superfamille sont notamment capables de détecter des changements environnementaux et d'agir en conséquence, mais rien n'a été vérifié à ce jour encore chez *Synechocystis*.

Le nouveau mutant Δ*lexA* qui a été reconstruit au laboratoire a pu être obtenu totalement ségrégé cette fois, facilitant d'autant les futures interprétations qui seront faites à partir de celui-ci.

2-4- AbrB2 empêche d'observer l'effet de LexA sur la promotion de *hoxE*

Dans l'article Dutheil et al. 2012, j'ai décrit la construction de 4 fusions transcriptionnelles de la région promotrice de l'opéron hox au gène rapporteur cat qui ont permis de montrer qu'AbrB2 régulait négativement le promoteur. A cours de ma thèse, j'ai également introduit ces 4 fusions transcriptionnelles dans la souche ΔlexA (construite par Panatda Saenkham). La Fig 105 suivante décrit ces résultats :

Figure 105



Effet d'AbrB2 et LexA sur différents promoteurs de *hoxE*

Dans le mutant Δ*lexA*, l'activité promotrice observée est très faible, du même ordre que celle de la souche sauvage. Bien qu'étonnant car LexA est supposé être un régulateur positif de l'opéron *hox* (Oliveira et Lindblad 2005, Gutekunst et al. 2005), ce résultat n'est pas réellement en contradiction avec les résultats déjà apportés, et cela pour deux raisons :

- LexA a été proposé comme activateur transcriptionnel de l'hydrogénase. Si cette description est vraie, alors un mutant *ΔlexA* devrait montrer moins d'activité promotrice que le niveau sauvage. Hors dans les conditions de cette expérience, *hox* est peu

exprimée dans la souche sauvage (Dutheil et al. 2012, Fig 105), ainsi une diminution d'activité promotrice devient impossible à visualiser.

- La deuxième raison possible est une conséquence directe du rôle que l'on vient d'identifier pour AbrB2. Effectivement, AbrB2 vient d'être décrit comme un répresseur direct de l'hydrogénase bidirectionnelle, et, de plus, interagissant sur une zone à cheval autour du start de transcription de *hoxE*. Une telle localisation d'un répresseur peut induire deux conséquences: AbrB2 défavorise fortement la fixation de la RNA polymérase en amont du TSP, mais empêche aussi la progression de cette dernière en interagissant avec la zone 5'non traduite de *hoxE*. Ainsi un site de fixation pour un activateur transcriptionnel, mais qui se situerait en amont de ces deux « postes-contrôles » régis par AbrB2, comme c'est le cas pour LexA, serait rendu totalement muet du fait de la trop forte répression plus en aval. Ainsi tant qu'AbrB2 est présent dans les cellules et en conditions standard de croissance (plus généralement : dans toutes les conditions où AbrB2 est fixé à ce promoteur), il est impossible de voir l'effet d'autres facteurs transcriptionnels tant les variations d'activité promotrice sont inhibées par AbrB2.

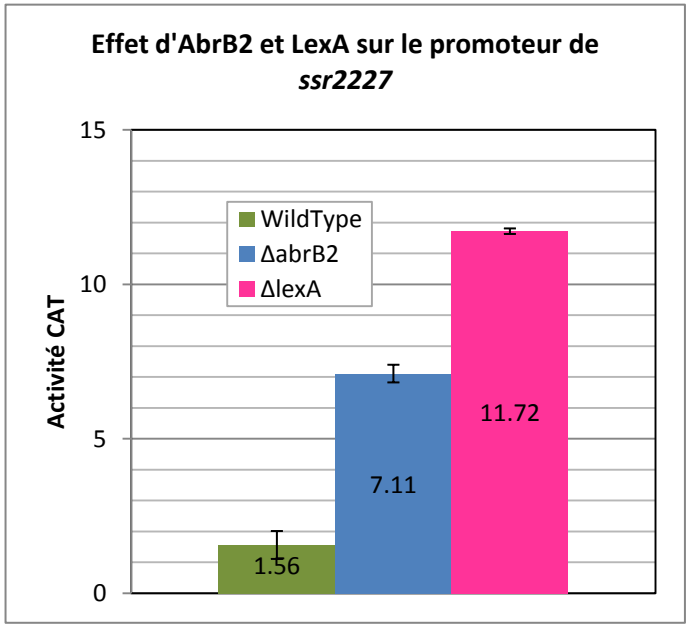
Quoi qu'il en soit, cette série de mesures ne permet ni de valider ni d'invalider le rôle de régulateur positif ou négatif de LexA vis à vis de *hoxE*. Les preuves de la littérature indiquant qu'il s'agirait d'un activateur sont insuffisantes et cette manipulation ne permet pas de répondre à la question pour les raisons explicitées plus haut. La construction d'un double mutant Δ*lexA*Δ*abrB2* pourrait permettre de répondre, mais n'a pas pu être faite pendant ma thèse.

Ce résultat renforce en tout cas davantage l'intérêt de l'identification d'AbrB2 : il semble bien que ce dernier soit un verrou majeur de l'expression de l'hydrogénase.

2-5- Régulation de *ssr2227* par AbrB2 et LexA

Lorsque j'ai étudié la région promotrice de *hox*, j'ai aussi produit un plasmide rapporteur contenant la zone intergénique complète entre *hoxE* et *ssr2227* orientée dans le sens opposé de celui de *hoxE*, de telle manière à obtenir le promoteur du gène en opposition de *hoxE* : *ssr2227* (il s'agit donc du fragment « JD1 » décrit dans l'article, mais orienté vers *ssr2227* plutôt que *hoxE*). J'ai également introduit ce plasmide dans les 3 souches sauvage, Δ*abrB2* et Δ*lexA.*

Figure 106



Les résultats (Fig 106) montrent que *ssr2227* est, à l'instar de *hoxE*, très faiblement actif dans les conditions standards de croissance, résultat pas forcément étonnant étant donné que *ssr2227* est une transposase (et donc naturellement *a priori* peu exprimée). Par contre, les résultats montrent qu'AbrB2 et LexA régulent tout deux négativement *ssr2227*, et LexA plus fortement encore qu'AbrB2. Ceci indique qu'AbrB2 régulerait *ssr2227* directement ou indirectement (éventuellement par le biais d'un site de fixation

autre que « JD4 » qui est très proche de *hoxE*, ou également par un autre effet indirect, évoqué plus loin).

Ce résultat permet en tout cas de proposer que LexA est un répresseur direct de *ssr2227,* éventuellement par les 2 sites de fixation de LexA identifiés de -690 à -569 par rapport à l'ATG de *hoxE* par Gutekunst et al. 2005 : ces sites seraient en effet plus vraisemblablement des sites qui concernent *ssr2227* que *hoxE* en raison de leur éloignement de ce dernier (voir Fig 105).

De manière intéressante, dans cette configuration, la répression due à AbrB2 sur le promoteur de *ssr2227* ne masque pas la répression due à LexA (alors que c'était éventuellement le cas vis-à-vis du promoteur de *hoxE)*. Ce résultat permet donc de faire plusieurs hypothèses :

- L'effet d'AbrB2 sur *ssr2227* est indirect puisqu'il ne masque pas l'effet de LexA, et/ou il est direct, mais le site AbrB2 en question est en amont du site LexA.
- L'effet d'AbrB2 sur l'activité promotrice de *ssr2227* pourrait être indirect par un effet d'AbrB2 sur LexA. Panatda Saenkham a en effet pu prouver par gel shift qu'AbrB2 interagissait directement avec la zone promotrice de LexA (sans pouvoir qualifier la nature de l'effet toutefois).
- Comme les preuves indiquant une régulation positive de LexA vis-à-vis de *hoxE* sont insuffisantes, il est possible que LexA ne régule pas *hoxE* mais uniquement *ssr2227*. Néanmoins, l'existence du site de fixation proposé par Oliveira et Lindblad en 2005 à forte proximité du site d'initiation de la transcription, et le fait que cette interaction LexA-hox a aussi été observée chez *Nostoc* sp. PCC7120 (Sjoholm et al. 2007) plaiderait plutôt en faveur d'un effet direct de LexA vis-à-vis de *hox*, mais la nature positive ou négative n'est pas encore connue et impossible à clarifier pour le moment (chez les deux cyanobactéries).

Les transposases permettent à des portions de génome de changer de place, permettant aux cellules de s'adapter, notamment aux antibiotiques. Qu'un régulateur possédant un domaine AbrB-like puisse réprimer des mécanismes permettant entre autre l'acquisition de résistance aux antibiotiques ou d'évoluer dans des conditions de stress n'est donc pas surprenant. Chez *Microcystis aeruginosa* il y a également un gène codant transposase en opposition de *hoxE*, mais ce n'est pas le cas chez *Nostoc* sp. PCC 7120, *Synechococcus* sp. PCC7002 ou *Synechococcus* sp. PCC7942. Dans certaines cyanobactéries on peut aussi trouver des gènes codant des sous-unités ribosomale ou des DNA ligases en opposition de *hoxE*. Chez *Arthrospira platensis* NIES-39, c'est *hypC* qui se trouve en opposition de *hoxE*. Ainsi *ssr2227* n'est pas conservé chez les cyanobactéries possédant *hox*.

2-6- Effet de LexA et AbrB2 sur *lexA*

Panatda Saenkham, en utilisant un plasmide avec la fusion transcriptionnelle au gène rapporteur *cat* de la zone promotrice du gène *lexA*, a montré que LexA s'autoréprimait tandis qu'AbrB2 n'a pas d'effet (augmentation de l'activité promotrice d'un facteur 35 dans le mutant Δ*lexA* et pas de variation significative dans le mutant Δ*abrB2, résultats non publiés*).

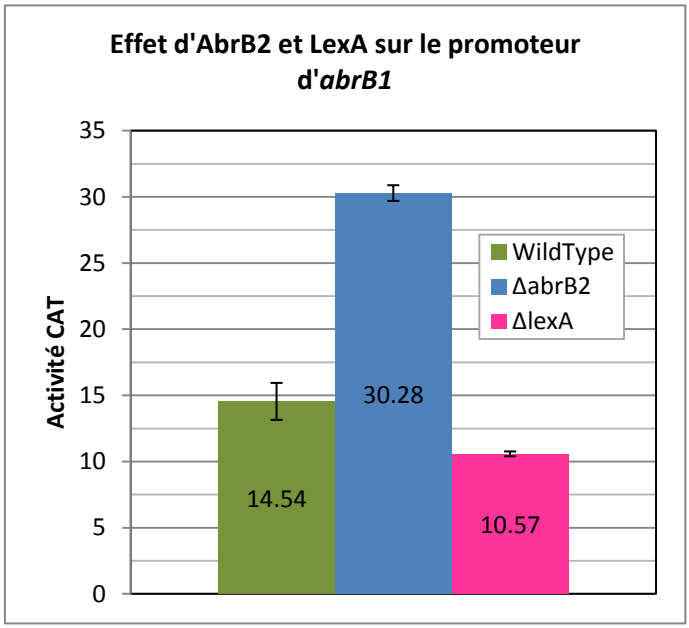
L'interaction directe de LexA sur son promoteur a été vérifiée et validée *in vitro* par retard sur gel. AbrB2 semble également interagir avec le promoteur de *lexA,* bien qu'aucun effet significatif de son absence n'ait pu être décelé sur l'activité promotrice de *lexA (résultats non publiés)*. Ce non-effet apparent d'AbrB2 pourrait par contre être une conséquence d'un « masquage » par LexA qui exerce une répression déjà extrêmement forte sur lui-même, mais cela est difficile à confirmer.

2-7- Effet d'AbrB2, CymR et LexA sur *cymR*

Panatda Saenkham a également fabriqué un plasmide rapporteur de l'activité promotrice du gène *cymR*, le gène en opposition d'*abrB2*, et montré qu'AbrB2 réprime l'expression de *cymR* (activité *cat* triplée dans Δ*abrB2*), de même que LexA (activité *cat* doublée dans Δ*lexA*). CymR semble aussi s'autoréguler légèrement (activité *cat* +50% dans Δ*cymR*) *(résultats non publiés)*. Panatda Saenkham et moi avons effectué des retards sur gel avec le fragment promoteur d'*abrB2* (et donc de *cymR*) avec les protéines LexA et AbrB2 et nous avons ainsi montré que ces deux régulateurs interagissent en amont des deux gènes *abrB2* et *cymR*.

Ce résultat est particulièrement intéressant quand on sait que *cymR* est *a priori* relié directement à la bonne expression de l'appareil photosynthétique (quelques sous-unités du PSI, Midorikawa et al. 2009). Qu'*abrB2* soit relié, à la fois, directement à l'hydrogénase bidirectionnelle et, au moins indirectement, au photosystème I qui l'alimente indirectement montre qu'*abrB2* tient une place particulièrement importante dans le contrôle que fait la cellule sur ses métabolismes, dont celui de l'hydrogène.

Figure 107



2-8- Effet d'AbrB2 et LexA sur *abrB1*

En plus de l'analyse des promoteurs de *hox* et *abrB2,* j'ai également construit une fusion transcriptionnelle au gène rapporteur *cat* avec la région promotrice d'*abrB1*. Afin de visualiser l'effet d'AbrB2 et LexA sur la régulation de ce gène, le plasmide a été introduit dans 3 contextes génétiques différents : la souche sauvage, Δ*abrB2* et Δ*lexA.*

Mes résultats montrent qu'*abrB1* est induit dans une souche dépourvue d'AbrB2 mais pas dans une souche dépourvue de LexA.

abrB1 est décrit comme un auto-régulateur, car il se fixe sur sa région promotrice (Oliveira et Lindblad 2008). AbrB2 régule négativement l'expression d'*abrB1* mais sans savoir si c'est de façon directe ou indirecte. Il est donc possible que l'interaction entre les protéines AbrB1 et AbrB2 joue ici un rôle particulièrement important mais il s'agit d'une hypothèse qui n'a pu être validée par les techniques expérimentales dont nous disposons.

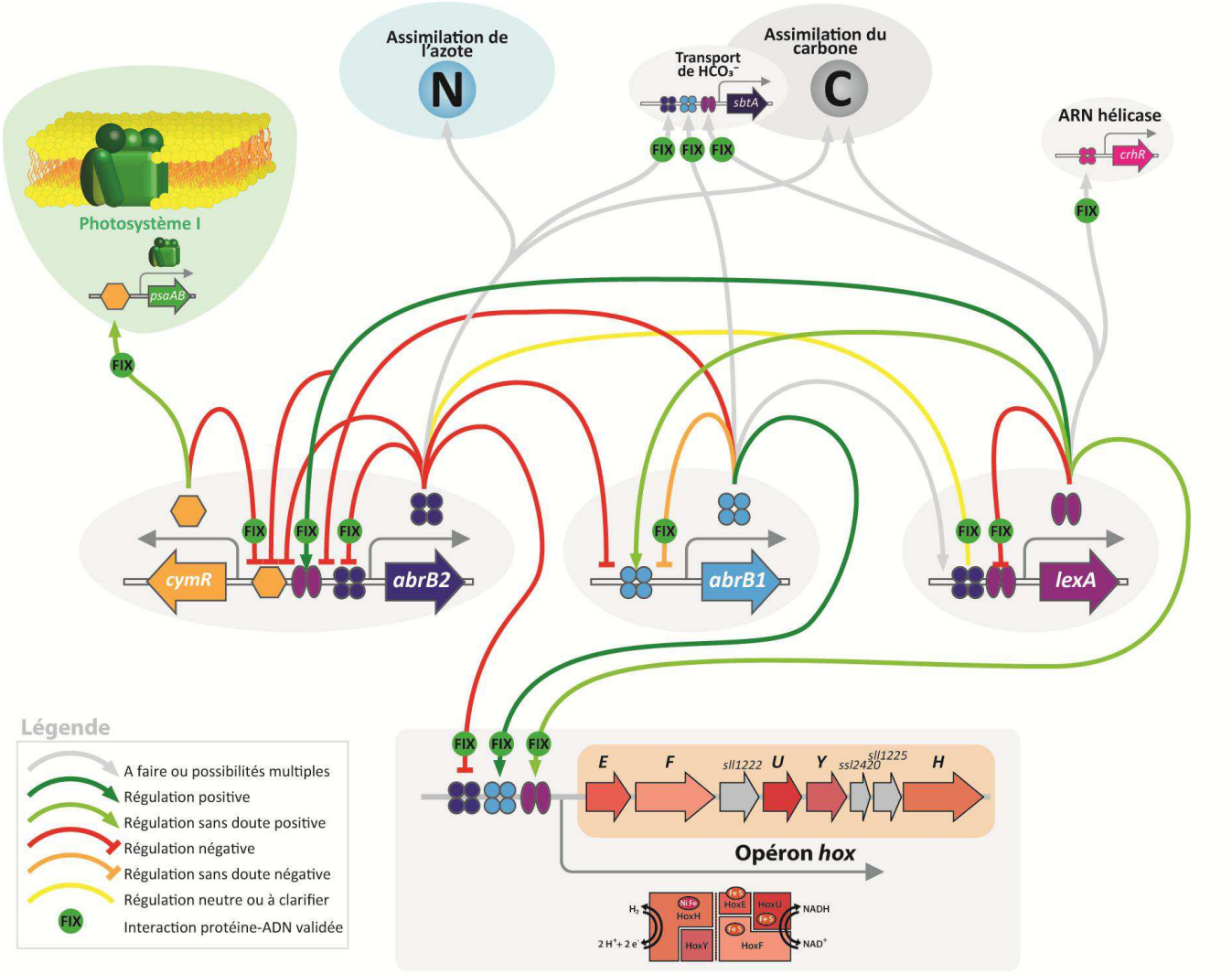
2-9- Effets des paramètres environnementaux et des régulateurs AbrB1, AbrB2, LexA et CymR sur *abrB2*

Panatda Saenkham a construit une fusion transcriptionnelle au gène rapporteur *cat* avec la zone promotrice d'*abrB2* (plasmide pPS2 déjà évoqué dans l'article Dutheil et al. 2012). Nous avons introduit ce plasmide dans différents mutants des régulateurs impliqués dans la production d'H_2, à savoir dans la souche sauvage, *abrB1*::Km^r/$AbrB1^+$, Δ*abrB2,* Δ*lexA* et Δ*cymR,* et Panatda Saenkham a aussi testé différentes conditions environnementales sur la sauvage portant le plasmide pPS2 (tous ces résultats sont encore non publiés et ne sont pas montrés dans la version finale du manuscrit).

2-10- *Constitution du réseau de régulation de hox*

Le modèle proposé (Fig 109) est une synthèse des résultats publiés et non publiés du laboratoire.

La régulation de l'expression de l'opéron *hox* se révèle très complexe, les 3 régulateurs identifiés à ce jour s'autorégulent mais régulent aussi positivement ou négativement l'un des deux autres régulateurs en plus de réguler positivement ou négativement l'opéron *hox*.



Représentation Schématique de la régulation transcriptionnelle exercée sur l'opéron *hox* chez *Synechocystis* sp. PCC6803
Effet des régulateurs AbrB1, AbrB2, LexA et CymR

Avec ce modèle, on peut déjà constater une apparente contradiction : LexA serait un activateur de *hox*, tout en étant également un activateur d'*abrB2*, lui-même répresseur de l'hydrogénase. On comprend donc bien que la quantité d'hydrogénase résultante d'une condition environnementale particulière sera le fruit d'un complexe mécanisme d'ajustement entre les effets combinés de chacun.

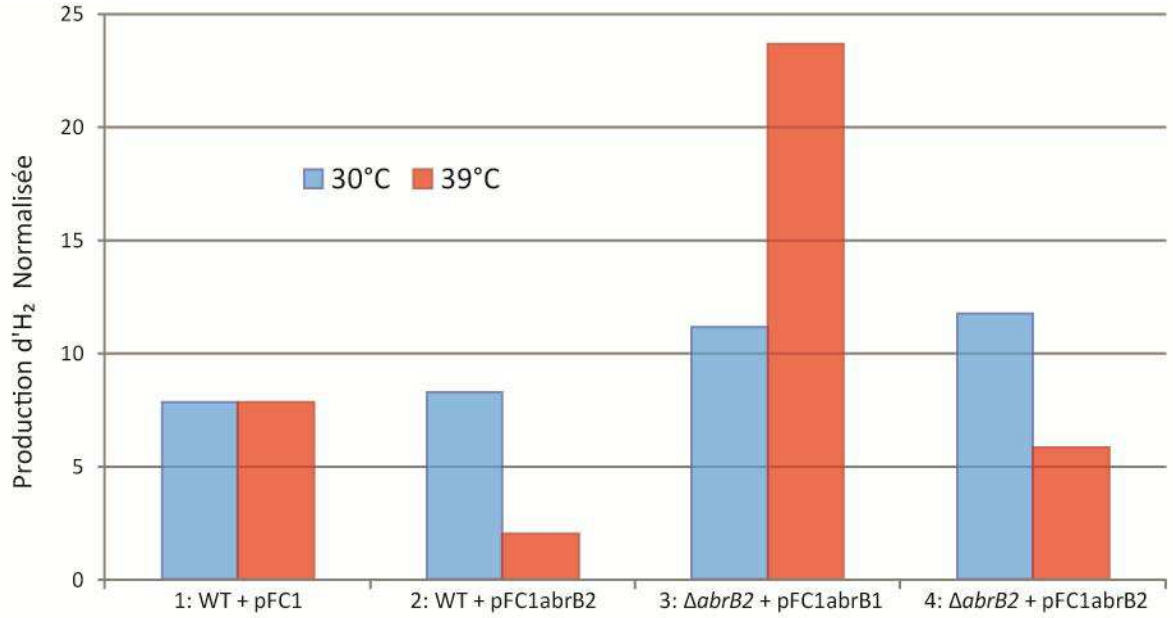
Cette représentation incomplète permet d'illustrer la complexité du réseau de régulation de *hox*, et met en lumière la nécessité de la cellule à contrôler de manière extrêmement étroite la quantité d'hydrogénase. Le coût énergétique très élevé pour la formation d'une seule hydrogénase bidirectionnelle (5 sous-unités, chacune comportant des clusters Fe-S et Ni-Fe, plus 7 protéines de maturation au moins) permet d'expliquer, au moins en partie, pourquoi la cellule n'assemble l'hydrogénase que si cela est vraiment indispensable.

2-11- Construction d'une souche produisant plus d'hydrogénase

Une partie des objectifs du laboratoire était d'identifier les différents facteurs affectant positivement ou négativement la production de dihydrogène par *Synechocystis,* en vue de finalement augmenter cette dernière.

Une des stratégies consiste donc à surproduire les facteurs transcriptionnels positifs et diminuer les facteurs transcriptionnels négatifs. Nous avons donc tenté d'augmenter la quantité d'AbrB1 et de diminuer la quantité d'AbrB2 dans une seule et même souche.

J'ai ainsi construit un plasmide de surexpression thermocontrôlée d'*abrB1* à partir du plasmide pFC1. Le plasmide pFC1abrB1 a ensuite été introduit dans le mutant Δ*abrB2*, (de même que le plasmide pFC1abrB2). L'activité hydrogénase normalisée des différentes souches mutantes a ensuite été mesurée par la technique d'échange H/D au CEA de Cadarache, les résultats sont montrés sur la Fig 110.



Production d'hydrogène de différents mutants des régulateurs de l'hydrogénase à 30°C et 39°C
à 30°C le gène porté par le plasmide pFC1 n' pas exprimé, à 39°C, il est fortement exprimé.

Figure 110

On observe un effet cumulatif de la délétion d'*abrB2* couplée à la surexpression d'*abrB1* : l'activité hydrogénase augmente d'un facteur 3 dans le mutant Δ*abrB2*+pFC1abrB1 à 39°C (~23 U.A.) par rapport à la souche sauvage à 30°C (~7 U.A.). Ces résultats restent cependant à confirmer.

On peut également remarquer à nouveau qu'il est très probable que les régulations générées par les CyAbrBs (et LexA) ne sont pas médiées uniquement par la quantité des protéines au niveau intracellulaire. Les effets de modifications post-traductionnelles doivent être importants, et chercher à n'influer que sur les quantités de régulateurs ne permettra pas forcément, à terme, de contrôler assez précisément le réseau de régulation de *hox* pour obtenir l'effet recherché. Effectivement, contrôler les proportions des régulateurs modifiés ne peut pas se faire en simplement enlevant ou rajoutant des protéines sous leur forme non-modifiée. Ce constat restera d'autant plus vrai que nous ne savons toujours pas quelles sont toutes les modifications post-traductionnelles encourues par les CyAbrBs dans la cellule, ni les rôles de chacunes de ces formes. Cette dernière question fera l'objet du prochain chapitre.

2-12- Le transcriptome d'*abrB2*

Durant mon travail de thèse, le design de puces à oligos couvrant, pour la première fois, l'ensemble des gènes portés par le chromosome et les plasmides de *Synechocystis* ainsi qu'une centaine de ses ARN non-codants a été réalisée (voir Leplat et al. 2013).

Christophe LEPLAT a utilisé ces puces pour comparer le transcriptome du mutant Δ*abrB2* à celui de la souche sauvage. Plus de 350 gènes sont dérégulés par l'inactivation de ce régulateur en conditions standard. Parmi ces 354 gènes, 299 sont dérégulés négativement, montrant qu'AbrB2 fonctionne majoritairement comme un répresseur chez *Synechocystis*.

L'opéron *hoxEFUYH* codant pour l'hydrogénase est induit dans le mutant Δ*abrB2* d'un facteur similaire à celui détaillé par RT-PCR quantitative dans l'article Dutheil et al. 2012 (entre x3 et x5) ainsi que HypF.

La quantité d'ARN de nombreux gènes impliqués dans les métabolismes de l'azote et du carbone est aussi modifiée dans la souche Δ*abrB2*, notamment le transport d'urée et la nitrate réductase. Ces résultats confirmant en partie les résultats d'Ishii et Hihara 2008 pour la souche mutante de *Synechocystis* tolérante au glucose. L'analyse de Leplat et al. 2013 montre très clairement et pour la première fois qu'une grande partie des gènes sous la dépendance d'AbrB2 sont portés par des plasmides.

Les 20 gènes les plus induits dans la souche Δ*abrB2* par rapport à la souche sauvage sont tous des gènes plasmidiques (facteurs de variations allant de x10 à x77). Ce résultat très intéressant révèle le rôle primordial d'AbrB2 dans l'expression des gènes plasmidiques dont l'immense majorité sont de fonction totalement inconnue. Certains pourraient donc être impliqués d'une manière ou d'une autre dans le métabolisme de l'hydrogène.

L'effet positif de la mutation Δ*abrB2* sur le niveau de transcrit du régulateur *cymR* confirme ce qui a été vu par fusion transcriptionnelle. De même la non régulation de *lexA* par *abrB2* est également confirmée.

De manière intéressante, plusieurs gènes liés à la tolérance au stress oxydant sont également induits en absence d'*abrB2*. Il s'agit de *norB* (nitric oxyde réductase, x8,48) qui évacue l'excès d'oxyde nitrique NO (Busch et al. 2001), et de *cydA* (Cytochrome D quinol oxydase, x2,95), un accepteur terminal d'électron de la chaîne respiratoire. Ce résultat semble indiquer qu'*abrB2* agit comme un répresseur de la réponse au stress oxydant en général, ceci pourrait indiquer que l'hydrogénase bidirectionnelle joue un rôle dans la tolérance au stress oxydant métabolique.

Un autre effet non attendu concerne la régulation du transport des métaux. En effet, la quantité d'ARN *fecBCDE* (import de citrate ferrique), *feoB* (import d'ions ferreux) ainsi que *futA1*A2BC (import de fer) est diminuée d'un facteur allant de /1,6 à /3 ainsi que *coaT* (cobalt, /5,45) et *hupE* (probable transporteur de métaux, /3,78 Hoffman et al. 2006). Ceci peut paraître paradoxal car dans un mutant Δ*abrB2* il y a une augmentation de la quantité d'hydrogénase, métalloenzyme à centre [NiFe] avec de nombreux clusters [FeS], une hydrogénase complète contiendrait ainsi 27 atomes de fer (54 lorsqu'elle est arrangée en dimère).

L'expression d'autres gènes régulés par la quantité de fer dans le milieu est modifiée, parmi ceux-ci : *mrgA* (slr1894, /2,3), *isiA* (sll0247 /4), *isiB* (sll0248 /8,4) et d'autres.

Des gènes participant à la gestion du flux cyclique d'électrons de la photosynthèse varient, traduisant éventuellement une redirection du flux vers la production d'hydrogène :

- Les ARNS des gènes *pgr5* (ssr2016) et *ndhD2* (slr1291), impliqués dans la réduction du pool de plastoquinones, voient leur quantité réprimée (respectivement /4,2 et /2,3), indiquant de probables changements du pool de NADPH.
- A l'inverse, la quantité d'ARN *petC2* (slr1185), une sous-unité à FeS de Rieske alternative du *cytb6/f* impliquée dans l'adaptation au stress lumineux subit quant à elle une forte induction (x4,6 voir Tsunoyama et al. 2009 pour réf).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'AbrB2 contrôle les reprogrammations métaboliques qui conduisent à une production d'hydrogène.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE 5

Le stress oxydant, le glutathion & les mécanismes de résistance

ARTICLE II

La régulation exercée par le répresseur de l'opéron *hox* AbrB2
est dépendante de son unique cystéine
qui est modifiée post-traductionnellement.

CHAPITRE 5

Le stress oxydant, le glutathion & les mécanismes de résistance

*Ce **cinquième chapitre** traite de la deuxième partie de mes travaux de thèse, qui décrivent un mécanisme nouveau de régulation post-traductionnelle du régulateur AbrB2. Cette modification de son unique cystéine module son activité régulatrice en fonction du niveau de stress oxydant auquel est soumis la cellule. Ces résultats seront préliminairement introduits par plusieurs généralités sur le stress oxydant et les mécanismes de résistance qui y sont liés - notamment les phénomènes de glutathionylation – puis vient finalement le deuxième manuscrit issu de mes travaux.*

1- Stress oxydant : le dioxygène n'oxyde pas la matière vivante.

Contenant près de 20% de dioxygène (O_2), l'atmosphère terrestre dans laquelle nous vivons est largement oxydante. Cependant, contrairement à une idée reçue, le dioxygène n'est pas assez réactif pour réagir spontanément avec la matière organique (l'oxygène et la vie tome 1 C.Deby et G.Deby-Dupont), la raison en est principalement la barrière énergétique forte qui empêche la réaction de se produire. Ainsi, pour pouvoir réagir avec les matière organiques, le dioxygène fondamental nécessite des catalyseurs qui abaissent l'énergie d'activation de la réaction. Dans le vivant, ces catalyseurs, souvent des enzymes, comportent généralement des métaux de transition au sein de leur site actif, lui-même constituant un microenvironnement d'acides aminés qui contribuent tout autant à l'abaissement de la barrière énergétique.

Les organismes vivants ont très tôt dû apprendre à gérer les dégâts inévitables que pouvait causer un tel type de stress. Le stress oxydant est en effet inévitable puisqu'il s'agit d'un simple transfert d'électron médié par une des plus petites molécules existantes : le dioxygène (O_2) (Imlay 2008).

2- La photosynthèse et le stress oxydant

Les cyanobactéries sont les premiers organismes photosynthétiques apparus sur Terre et font partie des premiers à avoir dû lutter contre le stress oxydant. L'appareil photosynthétique génère en effet de l'O_2 directement au niveau intracellulaire. Ainsi, avant même que l'atmosphère Terrestre ne devienne significativement oxydante pour toute la biosphère, les cyanobactéries étaient déjà confrontées à un stress oxydant intracellulaire. En conséquence ce sont elles qui ont, il y a environ 3 milliards d'années, développé les premières des stratégies de résistance au stress oxydant ; stratégies qui se sont ensuite répandues et diversifiées dans la plupart des espèces vivantes actuelles, conservées par l'évolution.

Certaines plantes et organismes ont appris à exploiter la vulnérabilité de leurs compétiteurs aux espèces réactives de l'oxygène (ROS, voir paragraphe suivant pour une description). Afin de les attaquer, elles excrètent des composés redox-cycliques (Redox-Cycling Compounds RCCs), tels les quinones, phenazines et viologènes, qui diffusent jusqu'aux microorganismes à proximité à l'intérieur desquels ils oxydent les enzymes rédox de la cellule, transférant dans le mouvement des électrons à l'oxygène moléculaire et générant $O_2^{\bullet -}$. Ces RCCs sont capables d'augmenter la génération naturelle de ROS intracellulaire de plusieurs ordres de magnitude (Imlay 2008)

3- Les Espèces Réactives de l'Oxygène (Reactive Oxygen Species en anglais ou ROS)

3-1- Les ROS

Les ROS sont des molécules dérivées du dioxygène, hautement plus réactives. On en répertorie plusieurs, dont les principales sont ici détaillées:

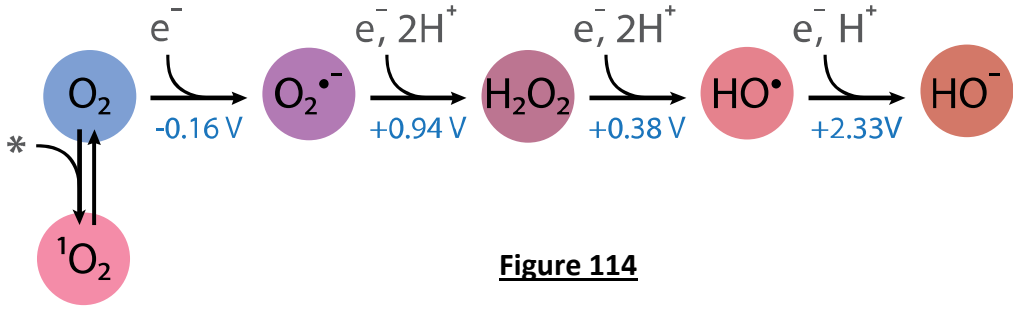


Figure 114

- O_2, le dioxygène : Cette molécule compose près de 20% de notre atmosphère, beaucoup d'organismes la respirent afin de tirer de l'énergie de sa réactivité intrinsèque. Le dioxygène peut traverser les membranes librement, de telle sorte que sa concentration intracellulaire équivaut généralement celle de l'extérieur. La chaîne de respiration et les enzymes qui assurent généralement des transferts électroniques d'une espèce à l'autre sont par contre aussi susceptibles de transférer des électron au dioxygène et de faire changer sa structure vers des espèces hautement plus réactives et problématique pour la cellule (Imlay 2008).
- $^1O_2$, l' « oxygène singulet » : aussi noté $^1\Delta_g$, c'est un état excité de O_2. Là où le dioxygène « standard » a ses 2 électrons les plus externes répartis dans 2 orbitales moléculaires avec des spins parallèles, $^1O_2$ est caractérisé par ses 2 électrons les plus externes présentant des spins opposés et occupant une même orbitale moléculaire. Cet état excité de la molécule est particulièrement instable et réactif. Il a été caractérisé pour la première fois par Herzberg en 1934 qui a attribué la couleur rouge de certaines aurores polaires à cet état excité des molécules de dioxygène. La durée de vie de cette espèce chimique est de l'ordre de 2 µs dans l'H_2O.

Chimiquement, l'oxygène singulet est susceptible de réagir directement avec beaucoup d'espèces chimiques présentes dans le vivant, notamment en s'additionnant sur des cycles polyinsaturés à la manière d'une cyclo-addition de Diels-Alder d'éthylène sur un diène et d'entrainer différents dommages irréversibles, mais aussi par d'autres mécanismes bien plus complexes. On notera par exemple :

- l'addition de $^1O_2$ sur les acides aminés comportant des cycles comme l'histidine ou le tryptophane. Les acides aminés étant les briques élémentaires de toutes les protéines et enzymes de la cellule, on comprend que l'effet de $^1O_2$ peut être particulièrement toxique pour la cellule.
- l'addition de $^1O_2$ sur les bases nucléiques (A, T, G, C ou U) qui impliquées dans la synthèse de l'ADN, l'ARN mais aussi dans d'autres voies métaboliques. En pratique, $^1O_2$ réagit presque exclusivement avec la guanosine, produisant ainsi la molécule 8-oxo-7,8-dihydro-2'désoxyguanosine (8oxodGuo) utilisable comme un biomarqueur du stress oxydant.
- l'addition de $^1O_2$ sur les acides gras insaturés, constituant les membranes cellulaires, peut également être très dommageable pour la cellule.
- la réaction de $^1O_2$ avec la vitamine C (l'acide ascorbique) qui conduit à l'oxalate est bien connue et constitue un des premiers mécanismes découvert de résistance au stress oxydant.(source : l'Oxygène singulet et la vie C Deby)

- $O_2^{\bullet -}$, « l'anion superoxyde » : Cette espèce se forme par ajout d'un électron à la molécule de O_2 (Fig 114). Elle se forme à une vitesse d'environ 5 µM.s^{-1} et majoritairement suite à la respiration cellulaire (Imlay 2008). Etant chargée négativement, donc ionique, elle traverse difficilement les membranes à pH neutre. Elle est connue notamment pour pouvoir désestérifier les phospholipides membranaires (voir Fig.III 3 (chap7 du livre DEBY), cette déstabilisation peut notamment conduire à la lyse cellulaire et donc à la mort de l'organisme. En conditions plus acides, le radical superoxyde est également susceptible d'accrocher un proton supplémentaire pour former $HO_2^{\bullet}$,
- H_2O_2, le peroxyde d'hydrogène : Cette espèce se forme successivement à la précédente par récupération d'un électron supplémentaire et de 2 protons à une vitesse moyenne d'environ 15 µM.s^{-1}. Elle peut aussi être formée par réactions photochimiques naturelles (pouvant atteindre de 1 à 20µM dans un milieu stérile conservé à la lumière). L'espèce n'est pas réactive en tant que telle. En tant qu'espèce non chargée, elle peut très facilement traverser des membranes (comme O_2) et affecte donc les cellules directement dès qu'on la retrouve dans le milieu.

NB : $O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2 sont formés suite aux collisions naturelles de la molécule de dioxygène avec les enzymes type flavodoxine, le taux d'apparition de ces espèces est donc directement proportionnel à la concentration oxygénique ambiante, et par voie de conséquence, les organismes microaérobies et les cellules mammifères sont naturellement plus protégées contre ces stress que les autres organismes. Les bactéries sont généralement suffisamment pourvues en défenses naturelles pour se protéger contre ces deux espèces, des mécanismes additionnels ne sont induits que lorsque les microbes sont confrontés à des stress artifiels assez rarement rencontrés dans la nature (Imlay 2008)

- $HO^{\bullet}$, le radical hydroxyle et HO^- l'anion hydroxyde : Ces deux espèces sont les plus réactives des ROS et en ce sens n'ont pas vraiment le temps de s'accumuler dans l'organisme, leur caractère basique et nucléophile en font des espèces particulièrement dangereuses pour les cellules.

3-2- Autres dommages générés par les ROS

Outre les dégâts possibles déjà évoqués plus haut, $O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2 sont susceptibles d'endommager des clusters [FeS] exposés aux solvants (comme par exemple ceux des ferrédoxines ou des hydratases. Au site actif, les deux espèces se lient à l'atome de fer et oxydent le cluster dans un état redox instable. $O_2^{\bullet -}$ oxyde ainsi un cluster $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ en $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$ (degrés d'oxydation du fer augmenté de un) qui va ensuite perdre irréversiblement son fer catalytique: $[3Fe\text{-}4S]^{+}$. De la même manière, H_2O_2 entraîne la dégradation du cluster mais en oxydant le cluster de manière divalente en entrainant le départ d'un ion ferrique. Même dans les conditions « standards », naturelles et dites non-stressantes, ces réactions se produisent très fréquemment. Le maintien des activités enzymatiques affectées est assuré par les procédés qui reconstruisent les clusters en permanence (Imlay 2008).

3-3- Les systèmes de protection contre les ROS et le stress oxydant

3-3-1- Systèmes passifs de récupération du stress oxydant

De nombreux métabolites comme les α-tocophérols (vitamine E), les caroténoïdes (β-carotènes, myxoxanthophylles, zéaxanthine etc...) ou le glutathion (un tripeptide) sont impliqués dans la capture du stress oxydant et en particulier des ROS, de manière passive (Latifi et al. 2009, Masip et al. 2006, Narainsamy et al. 2013). Ces molécules, souvent présentes à des concentrations de l'ordre du mM, agissent comme des boucliers qui piègent les ROS avant que ceux-ci n'atteignent d'autres molécules/protéines de la cellule.

3-3-2- Systèmes actifs de récupération des ROS

Outre les systèmes « passifs », les organismes disposent également d'enzymes capables d'évacuer un stress oxydant excessif. Ces systèmes sont généralement induits par des conditions particulièrement stressantes, mais sont naturellement très abondants en conditions normales.

- La Superoxyde Dismutase (SOD) : L'anion superoxyde est capable de dismutation spontanée. Cependant la cinétique de cette réaction chimique étant du deuxième ordre, le processus ne permet pas de descendre à des concentrations suffisamment basses de $O_2^{\bullet -}$(la vitesse de réaction diminue au fur et à mesure que la concentration en $O_2^{\bullet -}$ diminue).
  La superoxyde dismutase est une métalloenzyme (il en existe plusieurs type, les plus communes étant à Fe, Mn ou V) capable de catalyser cette réaction avec une haute efficacité. Sa concentration dans les cellule est également élevée, jusqu'à 20 µM chez *E.coli* (Imlay 2008) et permet de maintenir la concentration de $O_2^{\bullet -}$ à environ 0,1 nM dans les cellules (Imlay et Fridovich 1991) soit environ (on retrouve ainsi environ 10000 fois plus de SOD que de son substrat dans les cellules de *E.coli*). Pourtant même ce très faible taux de $O_2^{\bullet -}$ suffit à inactiver les enzymes possédant des cluster FeS labiles (demi-vie : 30 minutes) et une diminution de la quantité de SOD intracellulaire affecte drastiquement la survie cellulaire (Gort et Imlay 1998).
  Il semblerait que les microorganismes anaérobies stricts ne possèdent pas de superoxyde dismutase , cette particularité impliquerait leur incapacité à survivre en milieu aérobique. Cependant elles possèdent des Superoxyde Réductases (ou SOR), moins efficace que les SOD qui leur permettent par exemple de survivre lorsque de l'eau contenant de l'O_2 dissout pénètre ponctuellement les habitats anaérobies (Jenney et al. 1999, Imlay 2008).
  Les cyanobactéries possèdent des superoxyde dismutases. Par ailleurs, il faut noter qu'un CyAbrB (AbrB1) régule la SOD de la cyanobactérie *Nostoc* sp. PCC7120 (Agervald et al. 2010).

- Les peroxidases et les catalases : Ces deux enzymes catalysent la consommation d'H_2O_2:
  Les peroxidases catalysent la réaction : $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$
  Les catalases : $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$
  Les peroxidases/peroxirédoxines sont oxydées par une de leur cystéine, qui va ensuite former un pont disulfure avec d'autres résidus cystéines et finalement une flavoprotéine au NADH va permettre de régénérer l'enzyme. Ces enzymes permettent de maintenir la concentration de H_2O_2 intracellulaire aux environs de 20 nM, cependant lorsque la concentration de H_2O_2 est trop importante (dépasse 0,1 µM), ces enzymes qui consomment beaucoup de NADH saturent, et la catalase s'induit fortement pour devenir la principale enzyme de collecte du H_2O_2 (qui ne nécessite pas de NADH). Ces deux systèmes de collecte de l'H_2O_2 permettent de maintenir sa concentration intracellulaire au moins 20 fois plus bas qu'à l'extérieur.

Il existe bien évidemment d'autres systèmes de résistance et de réparation des dommages liés au stress oxydant. Les mécanismes autour du glutathion en particulier nous intéressent.

4- Le Glutathion GSH

4-1- Qu'est-ce que c'est ?

Le glutathion est un tripeptide (γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-L-glycine) ou GSH, considéré comme un tampon redox.

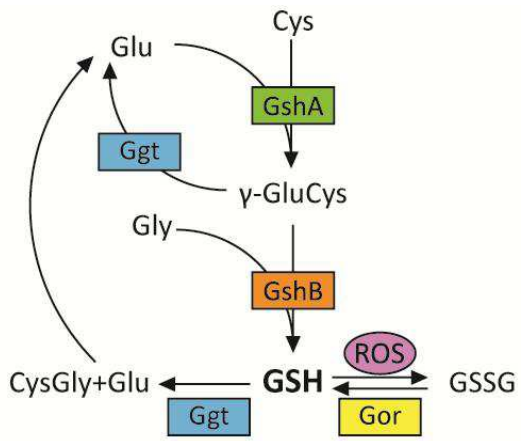
Il constitue l'espèce chimique possédant un résidu thiol la plus abondante des cellules qui en possèdent (entre 0,1 et 10mM). La détoxification des ROS entraîne l'oxydation du GSH en dimère GSSG (liaison disulfure). Le stress oxydant que subit la cellule détermine ainsi le degré d'oxydation du pool de glutathion intracellulaire.

Le glutathion joue un rôle central dans le contrôle redox des thiols de protéines et des ponts disulfures, dans la protection contre des métaboliques toxiques comme le méthylglyoxal ou le formaldéhyde, contre des espèces électrophiles ou xénobiotiques, antibiotiques et les stress osmotique et bien sûr oxydant (Pour revue voir Narainsamy et al. 2013, Masip et al. 2006). Son rôle vis-à-vis de l'homéostasie du fer chez les cyanobactéries (organismes requérant près de 10 fois plus de fer que les autres bactéries afin d'assembler les photosystèmes) est également une question discutée (Houot et al. 2007, Cameron et Pakrasi 2010, Shcolnick et al. 2009)

4-2- Voie de biosynthèse du glutathion

La synthèse du glutathion est assurée par deux enzymes à ATP : la γ-glutamyl-cystéine synthétase (GshA) qui catalyse l'addition d'acide glutamique sur la cystéine pour former l'espèce γ-glutamyl-cystéine (il ne s'agit pas d'une liaison peptidique), et la glutathion synthétase (GshB) qui ajoute la glycine au γ-glutamyl-cystéine pour former le GSH (Masip et al. 2006, Fig 115).

Figure 115



Voie de biosynthèse du glutathion

GSH=Glutathion: Glu=acide glutamique; Cys=cystéine; Gly=glycine; GSSG=glutathion oxydé. GshA=γ-glutamyl cystéine synthetase; GshB=glutathion synthase; Ggt=γ-glutamyl transpeptidase qui peut cataboliser le GSH. ROS=espèces réactives de l'oxygène; Gor=Glutathione réductase (NADPH-dépendante).

D'après Naraimsamy et al. 2013

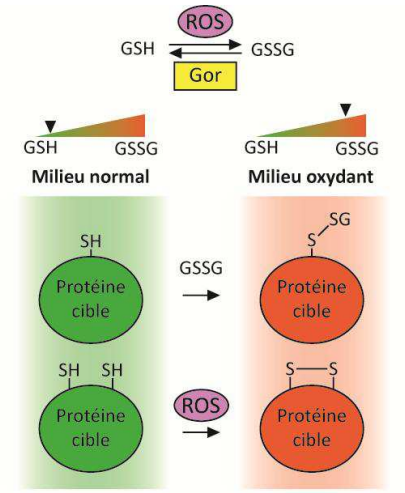
gshA est un gène essentiel à la survie cellulaire, et seul un mutant partiellement déplété a pu être obtenu chez *Synechocystis* sp. PCC6803 (Cameron et Pakrasi 2010, résultats non publiés du laboratoire). A l'inverse un mutant totalement ségrégé de *gshB* a pu être obtenu chez quelques cyanobactéries. Le mutant Δ*gshB* est incapable de synthétiser du GSH, accumule l'espèce γ-glutamyl-cystéine, il pousse lentement et se montre sensible à plusieurs stress (notamment H_2O_2, méthylviologène (oxydant), lumière + glucose et antibiotiques, voir Narainsamy et al. 2013 pour revue).

Le glutathion peut-être catabolisé par l'enzyme γ-glutamyl transpeptidase (Ggt) qui permet de régénérer du glutamate (voir Fig 115).

Le glutathion s'oxyde en GSSG au contact des ROS, et chez de nombreuses cyanobactéries la glutathion réductase (Gor) catalyse la réduction du GSSG en GSH par la consommation de NADPH. Les deux systèmes GSH/GSSG et NAD(P)H/NAD(P) sont incapables d'inter-réagir à une vitesse significative, entrainant ainsi que les potentiels redox de ces deux couples peuvent être maintenus indépendamment l'un de l'autre en fonction des besoins cellulaires (Masip et al. 2006). Le ratio GSH/GSSG chez *E.coli* atteint en conditions standards environ 200 (Masip et al. 2006) et peut même être encore supérieur chez les plantes (Zaffagnini et al. 2012). A noter que *Synechocystis* sp. PCC6803 fait partie des quelques cyanobactéries unicellulaires à ne pas posséder de Gor (Marteyn et al. 2009, Narainsamy et al. 2013).

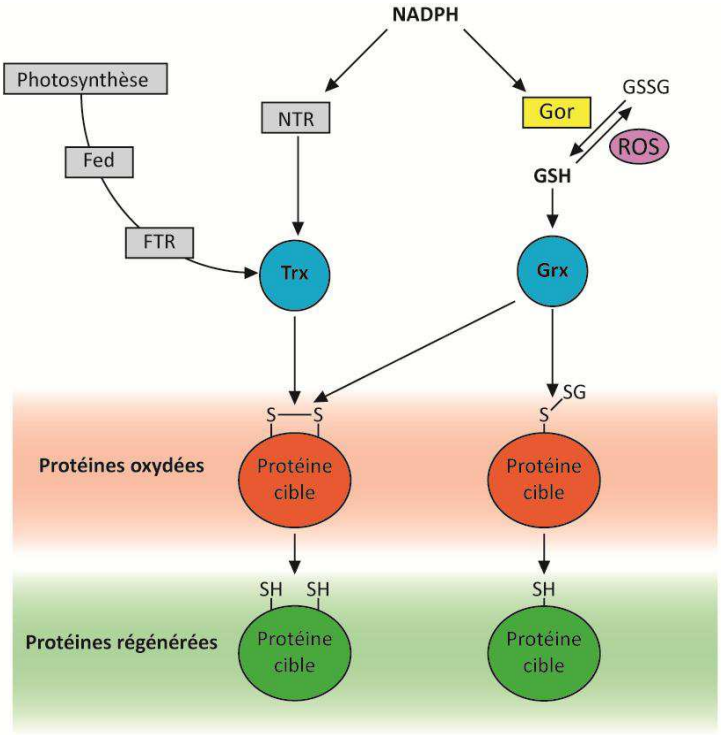
4-3- Maintien de l'homéostasie des thiols de protéines par le glutathion et le système glutarédoxines.

Les ROS peuvent générer 3 types de ponts disulfures en fonction des groupes cysteinyl qui interagissent : GS-SG correspond à l'oxydation du glutathion, protéine-S-S-protéine correspond à la formation d'un pont disulfure inter-moléculaire et protéine-S-SG correspond à ce qu'on appelle la **glutathionylation** des protéines. Plusieurs études protéomiques ont montré qu'un grand nombre de protéines de plantes et mammifères étaient capables de subir une glutathionylation sous l'effet d'un stress oxydant artificiel (Dalle-Donne et al. 2009, Zaffagnini et al. 2012, données non publiées du laboratoire). Chez les cyanobactéries, ces protéines sont impliquées, entre autres, dans la photosynthèse, la réponse au stress oxydant, le repliement des protéines, la biosynthèse d'acides aminés, le métabolisme des lipides, le métabolisme du carbone, la traduction, le métabolisme de l'ATP (Naraimsamy et al. 2013).



Le stress oxydant oxyde le pool de glutathion et oxide/glutathionyle les protéines

Figure 116



Le processus de déglutathionylation

Après retour en milieu non stressant, les thiorédoxines et glutarédoxines catalysent la réduction des thiols des protéines précédemment oxydées. Fed: Ferrédoxine; FTR= ferrédoxine Thiorédoxine réductase; NTR NADPH Thiorédoxine réductase; Gor=glutahion réductase; GSH=glutathion; GSSG=Glutathion oxydé; ROS=Espèces réactives de l'oxygène; Trx=Thiorédoxine; Grx=Glutarédoxine.

D'après Narainsamy et al. 2013

Figure 117

Le processus de glutathionylation peut protéger les cystéines des protéines des dommages irréversibles qu'aurait entrainés l'oxidation par les ROS. Dès lors que les cellules se sont soustraites à l'environnement stressant, les glutarédoxines (Grxs) catalysent la réduction du pont disulfure entre le glutathion et la protéine afin que la protéine retrouve son état réduit originel (Zaffagnini et al. 2012). Ce procédé s'appelle la **déglutathionylation**.

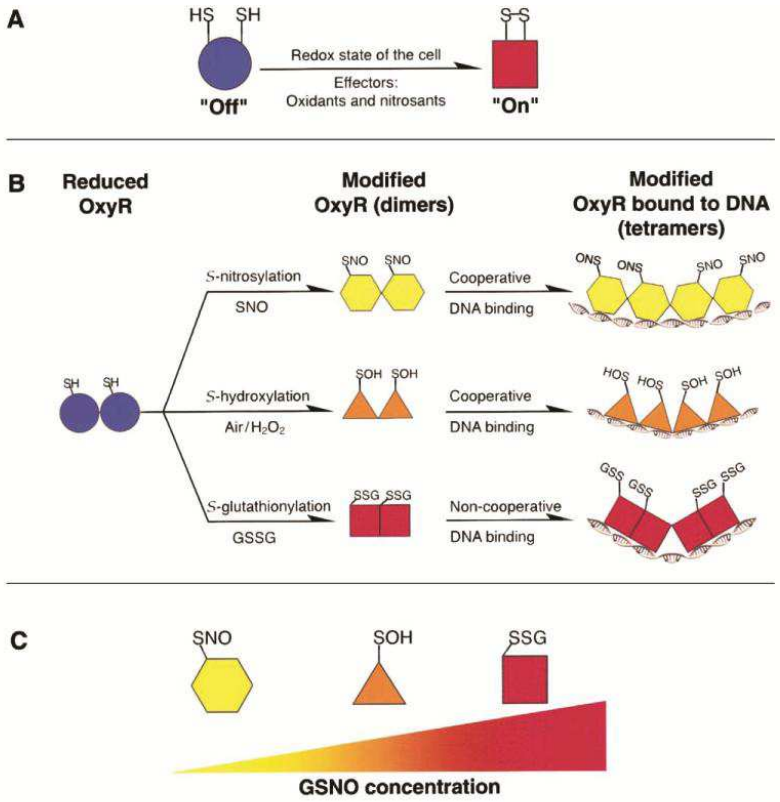
Les thiorédoxines (Trxs) sont des protéines capables de réduire les ponts disulfures intra-protéines (pour revue voir Naraimsamy et al. 2013) tandis que les Grxs, qui partagent une structure tridimensionnelle similaire aux Trxs, sont plutôt susceptibles de catalyser la réduction des ponts mixes protéine-S-SG.

Chez les plantes, on trouve un grand nombre de Grxs et Trxs (respectivement 31 et 19 chez *A.thaliana*, Michelet et al. 2006), rendant l'étude de leur spécificité et particularités particulièrement difficile. Par contre, chez les cyanobactéries on trouve moins de gènes de *trx* et *grx* (respectivement 4 et 3 chez *Synechocystis* par exemple, voir Naraimsamy et al. 2013 pour les autres cyanobactéries).

4-4- Glutathionylation : une modification post-traductionnelle qui affecte l'activité des protéines

Il a été remarqué que le processus de glutathionylation/déglutathionylation peut entrainer une modulation par régulation redox de l'activité enzymatique des protéines cibles (activation, désactivation, variation) (Dalle-Donne et al. 2009). Outre les enzymes Grx et Trx dont la glutathionylation est au centre de leur mécanisme réactionnel, plusieurs enzymes peuvent voir leur activité modulée par cette modification post-traductionnelle. Concernant les régulateurs transcriptionnels, peu de choses sont connues quant aux effets possibles de cette modification sur leur activité, parmi les quelques rares identifiés, OxyR et Stat-3 :

- Chez *E.coli*, le régulateur OxyR, régulateur de la réponse au stress oxydant subit plusieurs modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles la glutathionylation. Ces modifications de la cystéine sont un processus par lequel le régulateur OxyR « sent » l'état rédox auquel est soumis la cellule. Lorsque la protéine est modifiée, cela entraîne un changement de la courbure de l'ADN en amont des gènes où il est fixé, qui se traduit par une réponse transcriptionnelle modulée (Kim et al. 2001, Fig 118)



Modèle de la régulation rédox du régulateur OxyR de E.coli
Le régulateur OxyR peut subir au moins 3 modifications post-traductionnelles différentes, dont la glutathionylation, qui entraîne des changements conformationnels du régulateur, des courbures de l'ADN différentes et des réponses transcriptionnelles des gènes cibles variables.

Figure 118 *Kim et al. 2001*

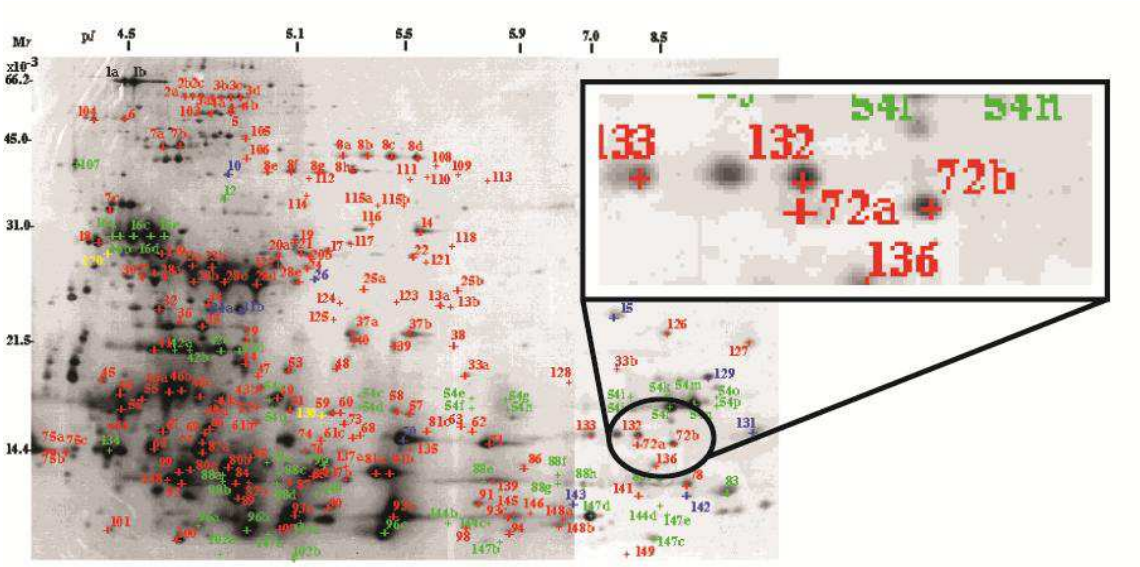
- Chez les cellules du foie humain, le régulateur clé de la croissance cellulaire STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) a été vu subir une S-glutathionylation. Cette modification affecte *in vitro* son affinité pour l'ADN et sa capacité à être substrat d'une tyrosine kinase (Xie et al. 2009). Ces résultats montrent selon les auteurs que la S-glutathionylation de STAT-3 est une modification qui pourrait exercer une fonction régulatoire dans les cellules.

4-5- AbrB2 existe sous au moins deux forme *in vivo*

Le caractère modifié post-traductionnellement des CyAbrBs AbrB1 et AbrB2 a été évoqué à plusieurs reprises dans la littérature et dans cette thèse (Ishii et Hihara 2008, Shalev-Malul et al. 2008, Liemann-Hurwitz et al. 2009, Oliveira et Lindblad 2009, Yamauchi et al. 2011). Ces modifications n'ont que très rarement pu être identifiées avec certitude, seul AbrB1 de *A.ovalisporum* a été vu acétylé et méthylé (Shalev-Malul et al. 2008).

Concernant AbrB2 chez *Synechocystis* sp. PCC6803, les travaux de Liemann-Hurwitz et al. 2009, déjà évoqués plus tôt dans cette thèse, ont montré que l'interaction d'AbrB2 avec le promoteur du gène *sbtA in vivo* était dépendante, non pas de la quantité d'AbrB2 dans la cellule, mais des conditions de culture (la protéine interagit avec le promoteur uniquement en forte concentration de carbone inorganique). Ce résultat montre que AbrB2 subit très probablement une modification post-traductionnelle qui affecte son affinité à l'ADN.

De plus, en 1999, Sazuka et al. ont réalisé une étude protéomique à grande échelle qui a permis d'identifier près de 240 protéines différentes de *Synechocystis*. Parmi les protéines détectées, ils ont repéré Sll0822 sous au moins deux formes différentes (voir Fig.119)



AbrB2 existe sous au moins deux formes différentes chez *Synechocystis* sp. PCC6803
Les spots 72a et 72b correspondent aux deux formes d'AbrB2 (Sll0822), elles possèdent un même poids moléculaire mais des points isoélectriques différents. Les protéines ont été identifiées par microséquençage.

D'après Sazuka et al 1999 - Cyano2Dbase

Figure 119

ARTICLE II

La régulation exercée par le répresseur de l'opéron *hox* AbrB2 est dépendante de son unique cystéine qui est modifiée post-traductionnellement.

1- Introduction & résumé du manuscrit de l'article Dutheil & Sakr et al.

1-1- Préliminaire

Le premier article, dont je suis co-premier auteur, a permis d'identifier un nouveau régulateur transcriptionnel de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* : le répresseur AbrB2 (Dutheil et al. 2012). Dans un deuxième temps de ma thèse, je me suis intéressé aux modifications post-traductionnelles de ce régulateur et à leurs effets sur l'expression de son régulon, et notamment sur *hox*.

AbrB1 et AbrB2 possèdent une cystéine conservée dans toute la famille des CyAbrBs. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les cystéines sont des cibles privilégiées de modifications redox, et j'ai donc analysé avec le post-doctorant Samer Sakr le rôle de la cystéine d'AbrB2 dans ses activités de régulation.

Ensemble, les résultats mettent en avant le rôle de « senseur » du stress oxydant, médié par leur cystéine, que tiennent les régulateurs CyAbrBs chez les cyanobactéries.

Ces découvertes permettent finalement d'apporter une nouvelle dimension et une meilleure compréhension du réseau de régulation de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*.

1-2- Introduction & résumé de l'article Sakr et Dutheil et al.

NB : Le manuscrit suivant est la version soumise au *International Journal of Hydrogen Energy*.
Les résultats que nous avons produit au laboratoire nous ont conduit à intituler cet article :
The activity of the Synechocystis PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation

Comme cela a été évoqué dans les précédents chapitres, des modifications post-traductionnelles des CyAbrBs doivent exister. La sensibilité naturelle des cystéines au stress oxydant et leur importance dans la structure et l'activité des protéines en font souvent des résidus cibles de modifications post-traductionnelles.

De plus, chez les bactéries comme *B.subtilis,* la cystéine des protéines « AbrB-like » est impliquée dans la multimérisation du régulateur afin de permettre son bon fonctionnement. Aucune étude sur le rôle de cette cystéine chez les régulateurs du petit groupe des CyAbrBs, structurellement et fonctionnellement différent des protéines « AbrB-like » (voir chapitres 4 et 5) n'a été publiée.

Ainsi, nous nous sommes naturellement orientés vers l'étude du rôle de ce résidu particulier.

Dans un premier temps, un allèle d'*abrB2* dont la cystéine 34 a été mutée en sérine (SH devenant alors OH), a été construit et introduit dans le plasmide de surexpression thermocontrôlée pFC1 (la construction du plasmide surexprimant l'allèle sauvage a été décrite dans l'article Dutheil et al. 2012).

A 30°C, les souches portant soit le pFC1, pFC1abrB2 ou pFC1abrB2$_{C34S}$ se divisent à la même vitesse (temps de génération d'environ 12h). Par contre, lorsque les cellules sont transférées à 39°C, la souche portant le pFC1abrB2 s'arrête de croître au bout de deux jours tandis que la souche portant pFC1abrB2$_{C34S}$ continue à croître comme une souche sauvage (Fig X de l'article).

A 39°C on observe une augmentation de la quantité d'ARN *abrB2* (x30, mesuré par qRT-PCR) et de la quantité de protéine AbrB2, de plusieurs ordres de grandeur, révélée par un anticorps spécialement dirigé contre AbrB2 (produit à partir d'AbrB2 recombinante purifiée au laboratoire). Par contre, dans la souche pFC1abrB2$_{C34S}$ on observe une augmentation de la quantité d'ARN *abrB2* (x40), mais une augmentation faible de la quantité de protéine AbrB2$_{C34S}$ (environ x5, voir FigX article). Pour comprendre ce phénotype nous avons effectué divers contrôles :

Après expression et purification de la protéine recombinante His6-AbrB2$_{C34S}$ chez *E.coli*, nous avons pu montrer par des expériences de dichroïsme circulaire et de retard sur gel que les deux allèles d'AbrB2 étaient repliées/structurées de manière semblable dans les conditions de notre expérience (à30°C comme à 39°C), et qu'elles reconnaissaient l'ADN avec une affinité similaire *in vitro* (Fig X article). Par ailleurs, une mesure de la quantité d'ARN des gènes *hox* par RT-PCR quantitative dans les souches pFC1abrB2 et pFC1abrB2$_{C34S}$ montre que, bien que les niveaux de protéine AbrB2 et AbrB2$_{C34S}$ accumulées soit différentes, les deux allèles ont un effet sur l'expression de l'opéron *hox*. Ainsi on peut déduire que la protéine AbrB2 peut *a priori* fonctionner sans sa cystéine, mais que celle-ci intervient dans la stabilité de la protéine à 39°C.

Nous proposons en conclusion de cette première partie du manuscrit que la cystéine d'*abrB2* a un rôle important dans l'apparition de ce phénotype létal, parce qu'elle empêche l'accumulation de la protéine à 39°C (instabilité ?) et éventuellement parce qu'elle affecterait aussi la façon dont sont régulés les gènes cibles, responsables de la létalité. Cependant la stratégie de surexpression à 39°C ne permet pas de confirmer le deuxième point.

Afin de mieux caractériser le rôle de cette cystéine, et pour s'affranchir de ces problèmes d'expressions différentes à 39°C, nous avons réintroduit dans la souche Δ*abrB2* soit l'allèle *abrB2*

sauvage, soit l'allèle *abrB2*$_{C34S}$. Cette stratégie de complémentation permet des expressions similaires des 2 allèles, à la fois pour la quantité de transcrits et de protéines (FigX article), l'analyse comparative des phénotypes des deux souches est donc possible. Ainsi, la souche complémentée avec l'allèle muté montre systématiquement des phénotypes intermédiaires entre la souche Δ*abrB2* et la souche complémentée avec l'allèle non muté : que ce soit au niveau de l'effet répresseur sur les gènes *hox*, l'effet sur l'activité hydrogénase ou l'effet sur la tolérance au stress oxydant (voir figX article) : la mutation de la cystéine affecte négativement l'activité du régulateur. Cet effet a pu de plus être généralisé au niveau transcriptionnel sur l'ensemble du régulon d'AbrB2 par une étude transcriptomique qui montre que, en moyenne, les 350 gènes sous le contrôle direct ou indirect d'AbrB2 sont moins affectés par la réintroduction de l'allèle muté que par l'allèle sauvage (voir figX article) : l'allèle sauvage réintroduit permet de retrouver le même niveau d'ARN que dans la souche sauvage initiale pour l'ensemble du régulon tandis que l'allèle ne récupère qu'environ la moitié de cette quantité (voir figX thèse), traduisant l'importance de cette cystéine dans l'activité de régulation d'AbrB2.

Les cystéines étant les cibles de modifications post-traductionnelles dues aux ROS, nous avons testé avec Samer Sakr si la cystéine 34 d'AbrB2 était sujette à une modification redox. Nous avons ainsi montré que les protéines AbrB2 et AbrB1, purifiées chez *E.coli* pouvaient être glutathionylées *in vitro* et que cette modification post-traductionnelle affecte la capacité de la protéine AbrB2 à se fixer à l'ADN (figX article) : dans les conditions standard, AbrB2 et AbrB2$_{C34S}$ ont la même affinité pour la sonde JD4 (promoteur de *hox* Dutheil et al. 2012, voir FigX article) tandis qu'un lot de protéine AbrB2 glutathionylée à environ 80% (vérifié par spectrométrie de masse) fait migrer 35% de la sonde JD4, là où la protéine AbrB2$_{C34S}$ traitée de la même manière, mais non modifiée, en fait migrer 73% (FigX article).

Nous avons également pu valider *in vitro* et *in vivo* l'existence de tétramères d'AbrB2, détectés par western blot sur la protéine purifiée His$_6$AbrB2 (*in vitro*) et sur des extraits protéiques de la souche portant pFC1abrB2 induite 24H à 39°C (FigSupX article). Ces tétramères disparaissant après traitement au DTT des échantillons (figX thèse).

Ensemble, ces résultats indiquent que la cystéine des CyAbrBs est un résidu par lequel le régulateur peut « sentir » le stress oxydant auquel est soumis la cellule, et que les modifications post-traductionnelles encourues à cet endroit affectent la multimérisation et la façon dont les gènes cibles sont régulés. Nous proposons en fin de notre étude un modèle sur la façon dont le régulateur AbrB2 sent le stress oxydant et module l'expression des gènes *hox* (Fig.120 thèse).

The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation

Samer SAKR[1,a], Jeremy DUTHEIL[1,a], Panatda SAENKHAM[a], Hervé BOTTIN[b], Christophe LEPLAT[a], Marcia ORTEGA-RAMOS[a], Jean-Christophe AUDE[c], Violaine CHAPUIS[d], Genevieve GUEDENEY[e], Paulette DECOTTIGNIES[d], Stéphane LEMAIRE[f], Corinne CASSIER-CHAUVAT[2,a] and Franck CHAUVAT[2,a,*]

[a] UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LBBC, Bat 142 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette CEDEX, France
[b] UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LMB, Bat 532 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette CEDEX, France
[c] FRE3377, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LSOC, Bat 142 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette CEDEX, France
[d] CNRS/Université Paris-Sud, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR8619 Bâtiment 430, Orsay 91405, CEDEX, France
[e] UMR7265, CEA, CNRS, Aix Marseille Université, iBEB, LB3M, CEA-Cadarache, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France
[f] CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Institut de Biologie Physico-Chimique, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, FRE3354, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

[1]: These authors contributed equally to this work
[2]: These authors contributed equally to this work

* Corresponding author. UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec -S, LBBC, Bat. 142 CEA -Saclay, F -91191 Gif sur Yvette CEDEX, France. Tel. 33 (0) 1 69 08 35 74; Fax: 33 (0) 1 69 08 80 46
Email addresses: sam.sakr@gmail.com (S. Sakr); jeremy.dutheil@enscm.fr (J. Dutheil); saenkham_p@yahoo.com (P. Saenkham); herve.bottin@cea.fr (H. Bottin); christophe.leplat.01@gmail.com (C. Leplat); marcia.ortega-ramos@cea.fr (M. Ortega-Ramos); jean-christophe.aude@cea.fr (J-C. Aude); violaine.chapuis@u-psud.fr (V. Chapuis); genevieve.guedeney@cea.fr (G. Guedeney); paulette.decottignies@u-psud.fr (P. Decottignies); stephane.lemaire@ibpc.fr (S. Lemaire); corinne.cassier-chauvat@cea.fr (C. Cassier-Chauvat); franck.chauvat@cea.fr (F. Chauvat).

Abstract

We show that the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 (Sll0822) repressor of hydrogen production, down regulates the defence against oxidative stress as well. We also report that the single widely conserved cysteine of AbrB2 plays a crucial role in the oligomerisation of AbrB2, as well as in the AbrB2-mediated repression of the hydrogenase encoding operon (*hoxEFUYH*) and of a wealth of other genes. Very interestingly, our results indicate that this cysteine is the target of glutathionylation, which affects the binding of AbrB2 on the *hox* operon-promoter DNA, as well as the stability of AbrB2 at the non-standard temperature of 39°C. These novel findings will certainly stimulate the in depth analysis of the influence of glutathionylation on the production of hydrogen, a field totally overlooked so far. Our data also emphasize on the evolutionary conservation of the glutathionylation process, so far mostly described in eukaryotes.

Keywords:

Hydrogen; Bioproduction; Cyanobacteria; Oxidative stress; Regulation; Cysteine oxidation

1. Introduction

Energy production and consumption has become a major environmental issue [1]. In this context, cyanobacteria, the only known prokaryotes capable of oxygenic photosynthesis, are receiving a growing attention for the sustainable production of the clean fuel hydrogen [2], due to their (i) simple nutritional requirements, (ii) robustness, (iii) metabolic plasticity, and (iv) the powerful genetics of some model strains. This is the case of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (hereafter *Synechocystis*), which possesses a small genome (about 4 Mb; CyanoBase: http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase) easily manipulable [3-5]. In *Synechocystis*, the pentameric hydrogenase complex (HoxEFUYH), matured by the HoxW protease and assembled using the six-subunits HypABCDEF complex, uses a nickel-iron center and several iron-sulfur clusters as redox cofactors to produce hydrogen from the electrons provided by the NAD(P)H generated by photosynthesis and/or sugar catabolism [2].

Besides the assembly and activity of the Hox enzyme is also important to thoroughly study the mechanisms controlling the expression of the *hox* operon, in order to better understand the role of the Hox enzyme in the global metabolism of the cell, and possibly develop novel tools to enhance the photoproduction of H_2. The *hox* operon is weakly expressed [6], under the control of at least three transcription factors, the positive regulators LexA (Sll1626; in CyanoBase) [7, 8] and

AbrB1 (Sll0359) [9], and the negative regulator AbrB2 (Sll0822) [6, 10]. These AbrB transcriptions factors have homologues in a variety of prokaryotes, where they regulate various processes (sporulation, biofilm formation, antibiotic resistance, *etc*) needed for growth and survival [11]. In cyanobacteria, all 58 sequenced genomes possess at least one AbrB-encoding gene. These genes define three paralogous clades, clades A and B, and a clade specific to marine cyanobacteria [12]. All cyanobacterial AbrBs regulators have their putative DNA-binding domain in their C-terminal region, instead of in the N-terminal region as occurs in AbrB regulators from other bacteria [10]. Like their bacterial counterparts, cyanobacterial AbrB regulators are involved in the regulation of many cellular processes. They were shown to bind to the upstream region of the Rubisco-encoding *rbc* operon in *Synechococcus* PCC7002; the *sodB* gene encoding the iron superoxide dismutase [13]; the *hypC* gene involved in hydrogen production in *Anabaena* PCC7120 [14] and *aoaC*, a hepatotoxin synthesis gene in *Aphanizomenon ovalisporum* [15, 16]. In *Synechocystis* PCC6803, the clade A protein AbrB1 (Sll0359) was shown to be indispensable to cell life [9, 10], and to bind to the promoter regions of its own gene and of the *hoxEFUYH* hydrogenase operon [9]. The clade B protein AbrB2 (Sll0822) was found to be dispensable to the growth of both the glucose-tolerant mutant [10] and the wild-type strain [6]. In the glucose-tolerant mutant, AbrB2 appeared to regulate numerous genes involved in nitrogen and carbon assimilation [10, 16, 17]. In the wild-type strain, we showed that AbrB2 represses its own gene and the *hoxEFUYH* operon [6], and regulates (mostly negatively) a large number of chromosomal genes (tolerance to metal and oxidative stresses) and plasmid genes (unknown functions) [18]. In this *abrB2*-deleted mutant, the increased expression of the anti-oxidant genes *cydAB* (cytochrome bd-quinol oxidase) and *norB* genes (nitric oxide reductase) are consistent with the increased production of hydrogen [6], which is regarded as an anti-oxidant process evacuating excess electrons to prevent the reduction of molecular oxygen that produce the toxic reactive oxygen species [2, 19].

A few lines of evidence indicated that cyanobacterial AbrB regulators can be post-translationally modified, though the nature and/or the influence of these modifications on their regulatory activity remained unclear. The *Aphanizomenon ovalisporum* AbrB1 protein that regulates the production of the cylindrospermopsin hepatotoxin was proposed to undergo N-acetylation and methylation of specific threonine and lysine amino acid residues [15]. Similarly, the *Synechocystis* AbrB2 protein was proposed to exist in at least two uncharacterized forms [20],

possibly involved in the regulation of the carbon assimilation *sbtA* gene [17]. In the present study, we have pursued the analysis of the *Synechocystis* AbrB2 master regulator that represses hydrogen production and down-regulates numerous genes [6, 18]. We show that AbrB2 down regulates the defence against oxidative stress mediated by the thiol oxidizing agent diamide and that this process involves the single, widely conserved, cysteine of AbrB2. Consistently, we report that this cysteine operates in AbrB2 dimerization, which likely involves the formation of a disulfide bridge between two AbrB2 monomers. Furthermore, our results indicate that this cysteine is the target of glutathionylation, a modification occurring under oxidative stress conditions, which consists in the formation of a mixed-disulfide between the cysteines residues of a protein and a molecule of glutathione (the anti-oxidant tripeptide g-glutamyl-cysteinyl-glycine). This glutathionylation event is shown to affect the binding of AbrB2 on the *hox* operon-promoter DNA. To our knowledge, AbrB2 is the first cyanobacterial regulator reported to undergo glutathionylation, emphasizing on the evolutionary conservation of this process, so far mostly described in eukaryotes [21]. These findings will certainly stimulate the analysis of the crosstalk between hydrogen production, which is regarded as an anti-oxidant electron valve [2, 19] and the oxidative stress-responsive glutathionylation-and-deglutathionylation process.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, culture conditions and hydrogenase activity assays

Synechocystis PCC6803 (hereafter Synechocystis) was grown at 30°C or 39°C on mineral medium (MM), as described [22]. For plate assays 10 µl aliquots of four fold serial dilutions of mid-log phase cultures ($2.5x10^7$ cells.mL^{-1}) were spotted onto solid MM with or without the indicated agents. *E. coli* strains used for gene manipulations (TOP10; Invitrogen), production of recombinant proteins (BL21(DE3); Novagen), or conjugative transfer to *Synechocystis* (CM404) of our temperature-controlled expression vector pFC1 [5] and its derivatives (supplementary Table 1) were grown on LB medium at 30°C (CM404 and TOP10 cells harbouring pFC1 derivatives) or 37°C (TOP10 and BL21(DE3)). Antibiotic selections were performed with gentamycin (Gm) 25 µg mL^{-1}, kanamycin (Km) 50 µg mL^{-1}, spectinomycin (Sp) 2.5 µg mL^{-1} or streptomycin (Sm) 2.5 µg mL^{-1} for *Synechocystis* and ampicillin (Amp) 100 µg

mL^{-1}, Gm 15 ⊠g mL^{-1}, Km 50 ⊠g mL^{-1} or Sp 75 ⊠g mL^{-1} plus Sm^r 25 ⊠g mL^{-1} for *E. coli.* Hydrogenase activities in *Synechocystis* cells were measured with a modified Clark-type electrode (Hansatech, UK) in a glove box, under an N_2 atmosphere, as described [6].

2.2. RNA isolation, RT-PCR, quantitative PCR and microarray analysis

RNAs were rapidly isolated and studied as previously described [6, 18]. RNA concentration and purity (A_{260}/A_{280} >1.9) were determined with a Nanodrop (Thermo scientific) and examined through migration on agarose gel to verify the absence of RNA degradation. The absence of contaminant DNA was verified with the *Taq* DNA-dependent DNA-Polymerase (Invitrogen) using primers specific to the control *rnpB* DNA (supplementary Table 2). The RT PCR and quantitative PCR were performed with gene-specific primers that generate DNA fragments of similar length, between 199 bp and 234 bp. For DNA microarray (Agilent Technologies) analysis, one dye swap was carried out for each biological replicates.

2.3. Production and purification of the $AbrB2_{C34S}$ protein from *E. coli*.

The mutant $AbrB2_{C34S}$ protein was produced and purified as previously described for the wild-type AbrB2 protein [6]. Briefly, the $abrB2_{C34S}$ coding sequence was PCR amplified with specific primers (supplementary Table 2) and cloned into the pET14b plasmid for in-frame fusion to the 6xHis tag (supplementary Table 1). The resulting pET14b-$AbrB2_{C34S}$ plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) cells, which were induced with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to produce the 6xHis-$AbrB2_{C34S}$ protein, which was purified by affinity chromatography to yield a purity greater than 95%.

2.4. Western blot analysis of the AbrB2 and HoxF proteins.

20 to 100 µg of *Synechocystis* proteins separated on 12% SDS PAGE (Thermo scientific) were transferred (iBlot system; Invitrogen) to nitrocellulose membrane (Invitrogen), which were blocked for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C with 5% non-fat milk in phosphate

buffered saline (PBS). Immunodetection was performed using the following rabbit antibodies (Eurogentec): anti-AbrB2 (this work, dilution 1:1000) and anti-HoxF (dilution 1:5000). R800 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) were used as secondary antibodies (dilution of 1:1000), and immune complexes were visualized by fluorescence imaging (Odyssey Li-Cor).

2.5. Electromobility shift assays (EMSA).

The *hox* promoter region JD4 [6] was PCR amplified from *Synechocystis* DNA with specific primers (supplementary Table 2) purified, 3′-end-labeled with digoxigenin (DIG gel shift kit, 2nd generation; Roche), incubated with AbrB2 or $AbrB2_{C34S}$, migrated on a Novex 6% DNA retardation gel (Invitrogen), blotted on a positively charged nylon membrane (Roche) with a semidry transfer apparatus (Apelex), and cross-linked onto the membrane with a 2-min UV-C (254 nm) exposure (Stratalinker). The DNA bands were revealed with anti-DIG antibodies by chemiluminescence, using Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia) and Kodak developer. The DTT was omitted in the reaction buffer for EMSA experiments performed with AbrB2 or $AbrB2_{C34S}$ proteins that had been treated with oxidized glutathione (GSSG).

2.6. *In vitro* glutathionylation of AbrB2 using oxidized glutathione (GSSG) or biotinylated glutathione (bioGSSG).

The water-soluble biotinylation reagent EZ link sulfo-NHS-Biotin (Perbio Science) was used to couple biotin to the primary amino group of oxidized glutathione (GSSG), according to [23]. The biotinylation reagent (40 µL, 48 mM) was incubated with GSSG (40 µL, 32 mM) in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) for 1 h at room temperature, generating BioGSSG. Then, free biotin was quenched by adding 28 µL of 0.6 M ammonium carbonate (NH_4HCO_3). AbrB2 or $AbrB2_{C34S}$ proteins were treated or not with alkylating agents (100 mM iodoacetamide (IAM) and 20 mM N-ethylmaleimide (NEM)) for 30 min in the dark, and then incubated for 1 hour with 2 mM of BioGSSG in 30 mM Tris-HCl pH 7.9. All treatments were performed at room temperature. Proteins were then loaded on 12% non-reducing SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-biotin antibodies as described [23]. For analysis of GSSG-

glutathionylated AbrB2 by MALDI-TOF mass spectrometry, recombinant protein at a concentration of 20 ⊠M was incubated with 5 mM GSSG in 80 mM Tris-HCl pH 7.9 at 25°C. Aliquots were withdrawn at intervals and analysed by MALDI-TOF mass spectrometry as described [24]. As indicated, the reversibility of the glutathionylation treatment was checked with a 30 min incubation with 50 mM DTT.

3. Results and discussion

3.1. Construction of the *abrB2*-Gm^r and *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r DNA cassettes for *in vivo* analysis of the role of the single, highly conserved, cysteine of AbrB2

In proteobacterial AbrB regulators, it is known that the conserved cysteine lying downstream of their « AbrB-like » domain is involved in the formation of AbrB dimers and tetramers that operate in DNA binding and regulation [25]. By contrast, little is known concerning the regulatory mechanism of the cyanobacterial AbrB regulators, which were observed only under their monomeric and dimeric forms [9, 10, 13, 14, 16, 17]. Thus, we decided to pursue the analysis of the *Synechocystis* AbrB2 regulator (Sll0822 in CyanoBase), which we previously showed to repress the *hoxEFUYH* hydrogenase operon [6] and regulate (mostly negatively) a wealth of other genes [18]. In this study we investigated the role of the single cysteine residue of AbrB2 (hereafter C34 for cysteine at position 34 of the aminoacid sequence) because it is highly conserved in cyanobacterial AbrB regulators (data not shown). Therefore, to replace the C34 residue of AbrB2 by a serine (S), we constructed the *abrB2-Gm^r* (control) and the *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r DNA cassettes (supplementary Fig. 1), using specific primers (supplementary Table 2). After transformation in our *abrB2*-null mutant (⊠*abrB2::Km^r*; [6]), selecting for gentamycin resistance, we verified through PCR and DNA-sequencing (data not shown) that the *abrB2-Gm^r* and the *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r cassettes had properly replaced the ⊠*abrB2::Km^r* locus (Fig. 1, panel A) in all copies of the *Synechocystis* chromosome, which is polyploid [26]. All strains grew as fit as the wild-type strain in standard photoautotrophic conditions, in agreement with AbrB2 being dispensable to cell growth [6]. We verified that the *abrB2*-Gm^r and *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r cells produce

similar levels of the respective *abrB2* and *abrB2*$_{C34S}$ transcripts on one hand, and AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ proteins on the other hand. The *abrB2* and *abrB2*$_{C34S}$ transcripts were amplified from total RNAs and quantified through quantitative RT-PCR using with the same *abrB2*-specific primers (data not shown). In parallel experiments, antibodies specifically recognizing the AbrB2, not the AbrB1 paralog protein (data not shown), were generated and used for western blot analyses, which showed equal abundance of the AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ proteins (Fig. 1, panel B). Furthermore, circular dichroism analysis of the AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ proteins confirmed that the C34S mutation did not alter the overall AbrB2 protein structure (supplementary Fig. 2).

3.2. The single highly-conserved cysteine of AbrB2 is required for the AbrB2-mediated down regulation of the *hoxEFUYH* hydrogenase operon

Quantitative RT-PCR was used to analyze the influence of the C34S mutation of AbrB2 on its repression of the *hoxEFUYH* hydrogenase operon. Total RNAs isolated from the *abrB2*-Gm^r, *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r and Δ*abrB2*::Km^r cells were hybridized with the gene specific RT-PCR primers designed to amplify an internal segment of each five genes *hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY* and *hoxH* (supplementary Table 2). The abundance of the five transcripts, which was arbitrarily set to 1.0 in the case of Δ*abrB2*::Km^r cells, was lower in *abrB2*-Gm^r cells as compared to *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r cells (Fig. 1, panel C). Consistently, the levels of the hydrogenase activity encoded by the *hoxEFUYH* operon (Fig. 1, panel D), and of the HoxF protein (Fig. 1, panel B) were found to decrease when the strains Δ*abrB2*::Km^r, *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r and *abrB2*-Gm^r were compared in that order. Collectively, these findings confirm that AbrB2 down-regulates the *hoxEFUYH* operon [6], and they show that the cysteine of AbrB2 is involved in this process.

3.3. The single highly conserved cysteine of AbrB2 is involved in the AbrB2-mediated regulation of a wealth of genes

Using new tools for global transcriptome analyses, we previously reported that AbrB2 is a master regulator that regulates (mostly negatively) a large number of chromosomal genes operating in protection against metal and oxidative stresses, as well as numerous plasmid genes of as yet unknown function [18]. Hence, to test the influence of the C34S mutation of AbrB2 in these

regulations, we compared the changes in expression of the AbrB2 down-regulated genes in *abrB2*-Gm^r versus Δ*abrB2*::Km^r cells on one hand, and *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r versus Δ*abrB2*::Km^r cells on the other hand. The data, analyzed with the standard transcriptome criteria (fold change of transcript abundance higher than 2.0, and p-value lower than 0.01%), showed that the changes in gene expression were more important when comparing *abrB2*-Gm^r versus Δ*abrB2*::Km^r cells than *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r versus Δ*abrB2*::Km^r cells (Fig. 1, panel E). These results indicate that the single cysteine of AbrB2 operates in numerous AbrB2-mediated down regulations, thereby emphasizing on the interplay between hydrogen production and the global cell metabolism.

3.4. Confirmation that the highly conserved cysteine of AbrB2 is involved in the AbrB2-mediated down regulation of the cell defences against oxidative and metal stresses

To confirm that AbrB2 down-regulates many genes operating in the protection against metal and oxidative stresses, we compared the resistance of the three strains *abrB2*-Gm^r, *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r and ΔabrB2::Km^r to an excess of nickel, and to the presence of the thiol oxidizing agent diamide (Fig. 2). As expected, the absence of the AbrB2 repressor was found to increase the tolerance of *Synechocystis* to both metal and oxidative stresses. Interestingly, the *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r also exhibited a higher tolerance to both stress treatments compared to *abrB2*-Gm^r. This finding confirmed that the C34 cysteine of AbrB2 is required for the AbrB2-mediated down regulation of the protection against both metal and oxidative stresses.

3.5. The glutathionylation of its highly-conserved cysteine impairs the binding of AbrB2 to the promoter of the *hoxEFUYH* hydrogenase operon

Cyanobacteria are continuously challenged with the toxic reactive oxygen species generated by photosynthesis and respiration, which can oxidize the thiol group (SH) of two cysteinyl residues to form disulfide bonds (-S-S-) between proteins, or between a protein and a molecule of the anti-oxidant tripeptide glutathione (glutathione-protein mixed disulfide, also termed glutathionylation). As glutathionylation is poorly studied in cyanobacteria [27], in comparison to eukaryotes [21], we have tested whether the cysteine of AbrB2 might be glutathionylated. Therefore, following standard glutathionylation procedures [23], we independently incubated the

AbrB2 or AbrB2$_{C34S}$ proteins with biotinylated glutathione (BioGSSG) and analyzed the possible presence of glutathione adducts on these proteins by western blot using an anti-biotin antibody (Fig. 3). A clear glutathionylation signal was observed in the case of AbrB2, but not the cysteine-less AbrB2$_{C34S}$ protein that cannot be glutathionylated. To confirm AbrB2 glutathionylation, we verified that it was prevented by a pre-treatment of AbrB2 with the cysteine-alkylating agents iodoacetamide (IAM) and N-ethylmaleimide (NEM) which impair glutathionylation, or reversed by a post-treatment with the disulfide reducing agent DTT (Fig. 3). The glutathionylation of AbrB2 incubated with oxidized glutathione (GSSG) was further confirmed by direct visualization by MALDI-TOF mass spectrometry analysis. A clear increase of the AbrB2 mass of approximately 306 Da, consistent with the formation of one glutathione adduct per AbrB2 monomer, was observed (supplemental Fig. 3). The area corresponding to the shifted peak increased with treatment duration and reached more than 80% after 2 h incubation with GSSG. We verified that it could be reversed by a DTT treatment. Furthermore, the absence of glutathionylation of the cysteine free AbrB2$_{C34S}$ protein was also verified (data not shown). These data showing that the unique cysteine of AbrB2 can be glutathionylated are significant because many cysteine-containing proteins have been shown to be totally refractory to glutathionylation [28].

The influence of the C34 cysteine of AbrB2, before or after glutathionylation, on the AbrB2 binding to the *hoxEFUYH* operon promoter was studied with electrophoretic migration shift assays, which were performed as described [6]. The AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ proteins displayed a similar DNA binding ability, which was reduced by the glutathionylation pretreatment in the case of AbrB2, not of the cysteine-less AbrB2$_{C34S}$ protein that cannot be glutathionylated (Fig. 4). Together, these results suggest that the DNA-binding activity of AbrB2 is influenced by steric hindrance of its amino-acid residues at position 34 (the lower, the better). They also suggest, for the first time, that the activity of a cyanobacterial transcription factor might be controlled by glutathionylation, a process that has been overlooked in cyanobacteria [27]. To our knowledge, in prokaryotes only the OxyR regulator, has been shown to be controlled by glutathionylation yet [29]. Consequently, we think that our findings will stimulate the in-depth study of the relationships between hydrogen production and glutathionylation (oxidative stress).

3.6. The high-level production of AbrB2 is detrimental to cell growth at 39°C

To fully investigate the role of the AbrB2 C34 cysteine we also studied the influence of the C34S mutation with our pFC1 plasmid vector for temperature-controlled protein production [5]. We previously showed that *Synechocystis* cells propagating the pFC1-abrB2 replicating plasmid (designated as WT/pFC1-abrB2) tightly control the production of AbrB2, i.e. no production at 30°C (the standard growth temperature) and strong production after 24h of induction at 39°C [6]. During the time course of the present study, we noticed that WT/pFC1-abrB2 cells stopped growing after two days at 39°C (supplementary Fig. 4, panel A) and turned yellowish due to loss of photosynthetic pigments (supplementary Fig. 4, panel B), unlike WT cells that retained healthy growth and normal blue-green colour. By contrast, at 30°C both the WT/pFC1-abrB2 and WT strains grew similarly well because they both only expressed the chromosomal WT *abrB2* gene. These results show that the 39°C-induced accumulation of AbrB2 (Fig. 5) impairs cell fitness by an unknown process, which likely results from the altered expression of the numerous genes (more than 300) regulated by AbrB2 [18].

3.7. The cysteine to serine mutation of AbrB2 abolishes the cell killing effect promoted by the accumulation of AbrB2 driven by a heat-inducible expression vector

To study the influence of the AbrB2 C34 cysteine on the lethality triggered by the accumulation of AbrB2 at 39°C, the $abrB2_{C34S}$ gene (supplementary Fig. 1) was cloned into pFC1 by the same procedure as we used for the WT *abrB2* allele [6]. The resulting pFC1-$abrB2_{C34S}$ plasmid was introduced in *Synechocystis*, yielding the WT/pFC1-$abrB2_{C34S}$ strain. At 30°C, where only the chromosomal WT *abrB2* alleles are expressed, all three strains WT, WT/pFC1-abrB2 and WT/pFC1-$abrB2_{C34S}$ displayed the same healthy growth, as well as normal blue-green colour and pigment abundance (supplementary Fig. 4, panels A and B). At 39°C, where similar high-level expression of the plasmid *abrB2* and $abrB2_{C34S}$ alleles were induced (supplementary Fig. 4, panel C), only WT and WT/pFC1-$abrB2_{C34S}$ cells retained normal levels of growth, colour and pigments (supplementary Fig. 4), whereas WT/pFC1-abrB2 cells died rapidly (supplementary Fig. 4).

3.8. The single, highly-conserved, cysteine of AbrB2 is critical to *in vivo* stability of the AbrB2 protein at 39°C, not at 30°C

To study why similar high-quantities of the plasmid-driven *abrB2* and *abrB2*$_{C34S}$ transcripts (supplementary Fig. 4, panel C), either impaired (*abrB2*) or not (*abrB2*$_{C34S}$) cell growth at 39°C (supplementary Fig. 4, panel A), we used western blot to analyze the abundance of the AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ protein in WT/pFC1-abrB2 and WT/pFC1-abrB2$_{C34S}$ cells, respectively. The AbrB2 protein was highly abundant in WT/pFC1-abrB2 cells incubated at 39°C, where it occurred as both monomers and dimers of similar abundances (Fig. 5). By contrast, the AbrB2$_{C34S}$ protein was not accumulated in WT/pFC1-abrB2$_{C34S}$ cells where no AbrB2$_{C34S}$ dimers could be observed (Fig. 5). The difference in abundance of the AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ proteins cannot be ascribed to cell death and lysis, because it is the WT/pFC1-abrB2 cells, not the WT/pFC1-abrB2$_{C34S}$ cells that were killed by prolonged incubations at 39°C. The findings that similarly abundant *abrB2* and *abrB2*$_{C34S}$ transcripts translated from the same, pFC1-encoded, efficient ribosome binding site [5, 30] yielded different steady-state levels of the AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ proteins indicate that the lower abundance of AbrB2$_{C34S}$ is due to its reduced stability, as compared to AbrB2. Consequently, we tested the influence of the temperature on the global protein structure of AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$, using the recombinant AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ proteins produced and purified from *E. coli*. All circular dichroism spectra monitored at either 30°C or 40°C were similar (supplementary Fig. 2). These results indicate that the single mutation C34S did not alter the global protein structure of AbrB2.

Together, these data show that the 39°C-induced accumulation of AbrB2, directed by the pFC1 expression vector, permitted the observation of the dimeric form of AbrB2, and led to cell death. This lethality likely results from the altered expression of the numerous genes (more than 300) regulated by AbrB2 [18]. Our data also indicate that the single highly conserved cysteine of AbrB2 is critical to *in vivo* stability of the AbrB2 protein at 39°C, not at 30°C the standard growth temperature.

4. Conclusion

In the prospect of using cyanobacteria for the biological production of hydrogen it is important to thoroughly study the regulation of the hydrogen-production machine in order to better understand its role in the global cell metabolism and identify bottlenecks limiting H_2 production. In this frame we pursued the analysis of the AbrB2 protein, which we showed to negatively regulate the transcription of the hydrogenase-encoding *hoxEFUYH* operon as well as of numerous genes involved in stress protection [6, 18]. We presently confirmed that the absence of AbrB2 increased the tolerance to metal and oxidative stresses triggered by nickel and diamide. Furthermore, we show that the single, widely conserved, cysteine of AbrB2 plays a crucial role in all these processes (repression of *hoxEFUYH*; down-regulation of stress-responsive genes and sensitivity to Ni and diamide). Moreover, we show that this cysteine is the target of glutathionylation, which affects the binding of AbrB2 on the promoter of the *hoxEFUYH* operon, as well as the stability of AbrB2 at the non-standard temperature of 39°C. We view the role of the AbrB2 as follows. In cells growing under standard laboratory conditions, *i.e.* in absence of stress, AbrB2 down-regulates hydrogen production and other stress defences. By contrast, in cells facing oxidative stresses, triggered by light excess or metal availabilities (for review see [27]), AbrB2 is oxidized and its single cysteine is glutathionylated. Thereafter AbrB2 is no longer able to repress hydrogen production (which evacuate extra electrons out-pacing their need) and other protection mechanisms against oxidative stress. After recovery from oxidative stress, AbrB2 activity is restored (likely through deglutathionylation) and starts to repress hydrogen production and other anti-oxidant process, which are no longer required.

We think that our novel findings, which emphasize on the evolutionary conservation of the glutathionylation process, so far mostly described in eukaryotes [21], will certainly stimulate the in depth analysis of the influence of glutathionylation in the production of hydrogen, a field totally overlooked so far.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-09-BIOE-002-01 (EngineeringH2cyano) and ANR Blanc08-0153 (GLUTAPHOTO), and CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) Programme Interdisciplinaire Energie PIE2 (Reprogramhydrogen). J.D., S.S., P.S., C.L. and S.S were recipients of fellowships from the CEA (J.D.) and ANR (S.S.; C.L.; M.O-R; V.C. and P.S.). We also thank Cécile Fairhead for access to the «ArraySud transcriptome plateau technique».

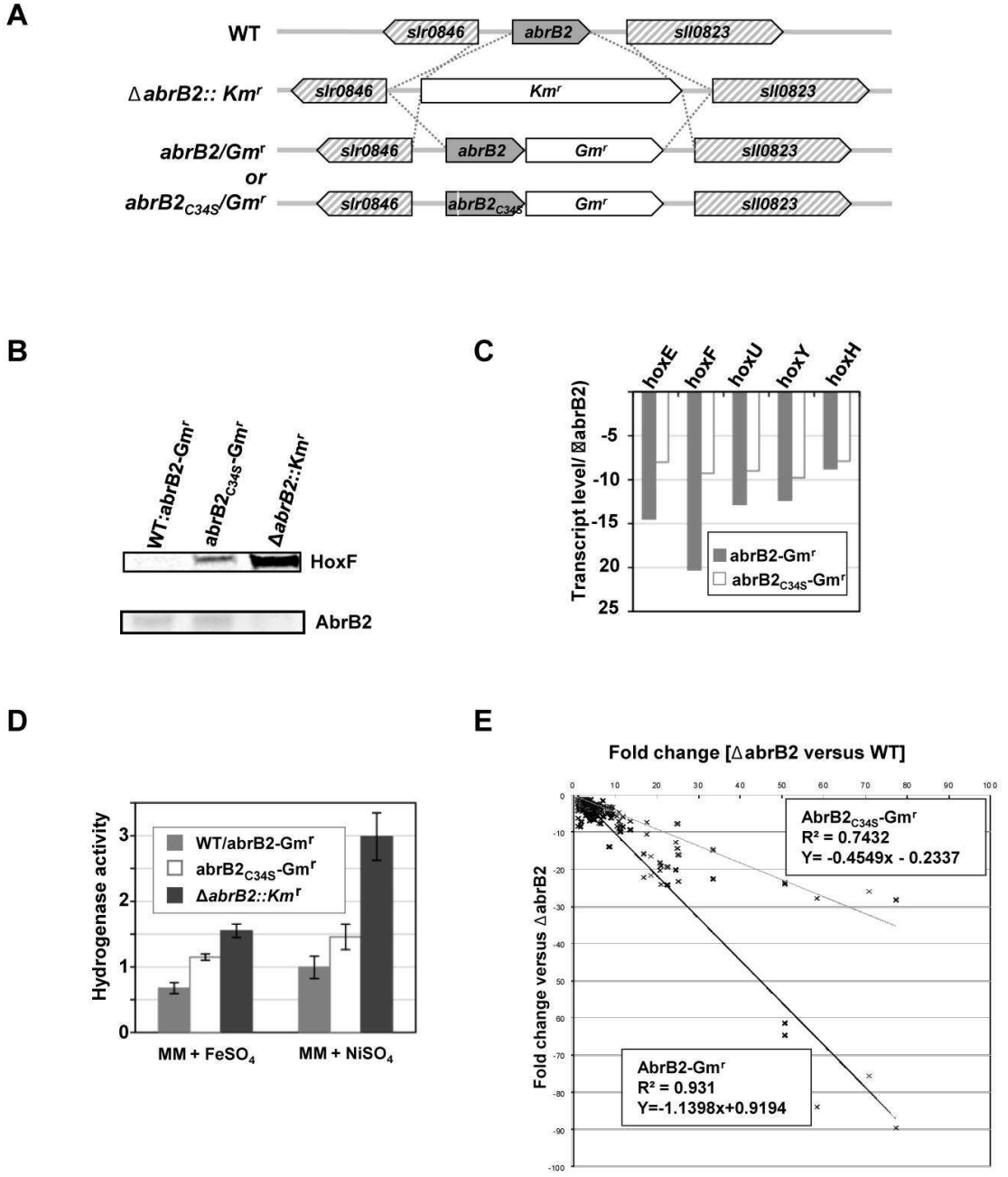
References

[1] Armaroli N, Balzani V. The hydrogen issue. ChemSusChem. 2011;4:21-36.
[2] Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu J, Maness PC. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. Bioresource technology. 2011;102:8368-77.
[3] Grigorieva G, Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp 6803. FEMS Microbiol Lett. 1982;13:367-70.
[4] Marraccini P, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Mermet-Bouvier P, Chauvat F. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. Plant molecular biology. 1993;23:905-9.
[5] Mermet-Bouvier P, Chauvat F. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. Current microbiology. 1994;28:145-8.
[6] Dutheil J, Saenkham P, Sakr S, Leplat C, Ortega-Ramos M, Bottin H, et al. The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. Journal of bacteriology. 2012;194:5423-33.
[7] Gutekunst K, Phunpruch S, Schwarz C, Schuchardt S, Schulz-Friedrich R, Appel J. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. Molecular microbiology. 2005;58:810-23.
[8] Oliveira P, Lindblad P. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. FEMS Microbiol Lett. 2005;251:59-66.
[9] Oliveira P, Lindblad P. An AbrB-Like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Journal of bacteriology. 2008;190:1011-9.
[10] Ishii A, Hihara Y. An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant physiology. 2008;148:660-70.
[11] Chumsakul O, Takahashi H, Oshima T, Hishimoto T, Kanaya S, Ogasawara N, et al. Genome-wide binding profiles of the Bacillus subtilis transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. Nucleic acids research. 2011;39:414-28.

[12] Larsson J, Nylander JAA, Bergman B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. Bmc Evol Biol. 2011;11.
[13] Agervald A, Baebprasert W, Zhang X, Incharoensakdi A, Lindblad P, Stensjo K. The CyAbrB transcription factor CalA regulates the iron superoxide dismutase in *Nostoc* sp. strain PCC 7120. Environmental microbiology. 2010;12:2826-37.
[14] Agervald A, Zhang XH, Stensjo K, Devine E, Lindblad P. CalA, a Cyanobacterial AbrB Protein, Interacts with the Upstream Region of hypC and Acts as a Repressor of Its Transcription in the Cyanobacterium *Nostoc* sp Strain PCC 7120. Appl Environ Microb. 2010;76:880-90.
[15] Shalev-Malul G, Lieman-Hurwitz J, Viner-Mozzini Y, Sukenik A, Gaathon A, Lebendiker M, et al. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. Environmental microbiology. 2008;10:988-99.
[16] Yamauchi Y, Kaniya Y, Kaneko Y, Hihara Y. Physiological roles of the cyAbrB transcriptional regulator pair Sll0822 and Sll0359 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Journal of bacteriology. 2011;193:3702-9.
[17] Lieman-Hurwitz J, Haimovich M, Shalev-Malul G, Ishii A, Hihara Y, Gaathon A, et al. A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO2 by modulating low-CO2-induced gene expression. Environmental microbiology. 2009;11:927-36.
[18] Leplat C, Champeimont R, Saenkham P, Cassier-Chauvat C, Jean-Christophe A, Chauvat F. Genome-wide transcriptome analysis of hydrogen production in the cyanobacterium Synechocystis: Towards the identification of new players. Int J Hydrogen Energ. 2013;38:1866-72.
[19] Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. Journal of bacteriology. 2004;186:1737-46.
[20] Sazuka T, Yamaguchi M, Ohara O. Cyano2Dbase updated: Linkage of 234 protein spots to corresponding genes through N-terminal microsequencing. Electrophoresis. 1999;20:2160-71.
[21] Zaffagnini M, Bedhomme M, Marchand CH, Morisse S, Trost P, Lemaire SD. Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. Antioxidants & redox signaling. 2012;16:567-86.
[22] Domain F, Houot L, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. Molecular microbiology. 2004;53:65-80.
[23] Bedhomme M, Zaffagnini M, Marchand CH, Gao XH, Moslonka-Lefebvre M, Michelet L, et al. Regulation by glutathionylation of isocitrate lyase from *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biol Chem. 2009;284:36282-91.
[24] Augusto LA, Decottignies P, Synguelakis M, Nicaise M, Le Marechal P, Chaby R. Histones: a novel class of lipopolysaccharide-binding molecules. Biochemistry. 2003;42:3929-38.
[25] Olson AL, Liu F, Tucker AT, Goshe MB, Cavanagh J. Chemical crosslinking and LC/MS analysis to determine protein domain orientation: Application to AbrB. Biochemical and biophysical research communications. 2013;431:253-7.
[26] Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. Journal of bacteriology. 1989;171:3449-57.

[27] Narainsamy K, Marteyn B, Sakr S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. Genomics of the pleïotropic glutathione system in cyanobacteria. In: Cassier-Chauvat C, Chauvat F, editors. Genomics of Cyanobacteria: Academic Press, Elsevier; 2013. p. 157-88.
[28] Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, et al. Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102:16478-83.
[29] Masip L, Veeravalli K, Georgiou G. The many faces of glutathione in bacteria. Antioxidants & redox signaling. 2006;8:753-62.
[30] Poncelet M, Cassier-Chauvat C, Leschelle X, Bottin H, Chauvat F. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. Molecular microbiology. 1998;28:813-21.
[31] Alexeyev MF. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. BioTechniques. 1999;26:824-6, 8.

Figure 1



Sakr et al. Fig.1

Figure 1 caption

Figure 1

A. Schematic representation of the *Synechocystis abrB2* chromosome locus in the WT strain (CyanoBase), the *abrB2*-deleted mutant (Δ*abrB2*::Km^r, [6]) and the two *abrB2*-Gm^r, *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r mutants constructed in this study. The genes are represented by boxes, which point in the direction of their transcription. They are coloured in grey (*abrB2*) or white (Km^r and Gm^r markers), or indicated by hatched arrows (*slr0846* and *sll0823*).

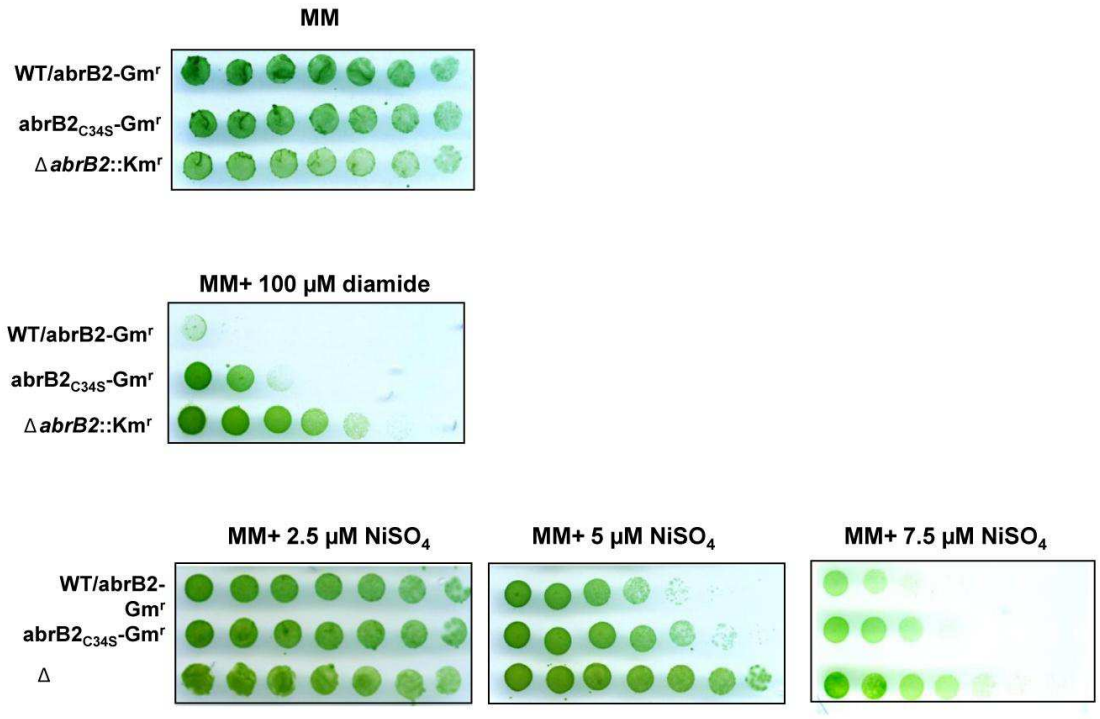
B. Western blot analysis of the abundance of the AbrB2 and HoxF proteins in the strains *abrB2*-Gm^r, *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r and Δ*abrB2*::Km^r. Equal amounts of soluble proteins were migrated on a non-reducing SDS-PAGE, transferred to membrane for western blotting with the indicated anti-AbrB2 or anti-HoxF antibodies. These experiments were performed at least twice.

C. Typical histogram plots of the ratios of transcript abundance (measured by quantitative real-time PCR) of each five *hoxEFUYH* genes in the *abrB2*-Gm^r and *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r strains over the Δ*abrB2*::Km^r mutant. These experiments were performed at least two times.

D. Typical histograms showing hydrogenase activity in Δ*abrB2*::Km^r, WT/abrB2Gm^r and WT/abrB2$_{C34S}$Gm^r cells measured with a reversed Clark-type electrode, in the presence of either 500 µM $FeSO_4$ or 2.5 µM $NiSO_4$ to increase hydrogenase activities. These experiments were repeated twice.

E. Global comparison of the level of expression of AbrB2-regulated genes in *abrB2*-Gm^r versus Δ*abrB2*::Km^r cells on one hand (black regression line), and *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r versus Δ*abrB2*::Km^r cells on the other hand (grey regression line). These experiments were performed at least twice.

Figure 2

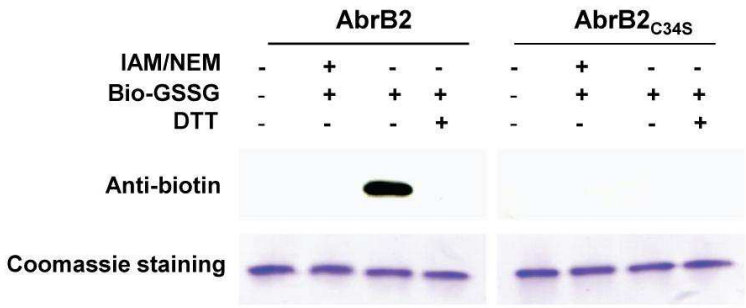


Sakr et al. Fig.2

Figure 2

Influence of nickel and diamide on the growth of the strains *abrB2*-Gm^r, *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r and Δ*abrB2*::Km^r. Five-fold serial dilutions of mid log phase liquid cultures were spotted onto MM plates with or without the indicated agents, incubated for 4-5 days and scanned (Methods). These experiments were done at least three times.

Figure 3



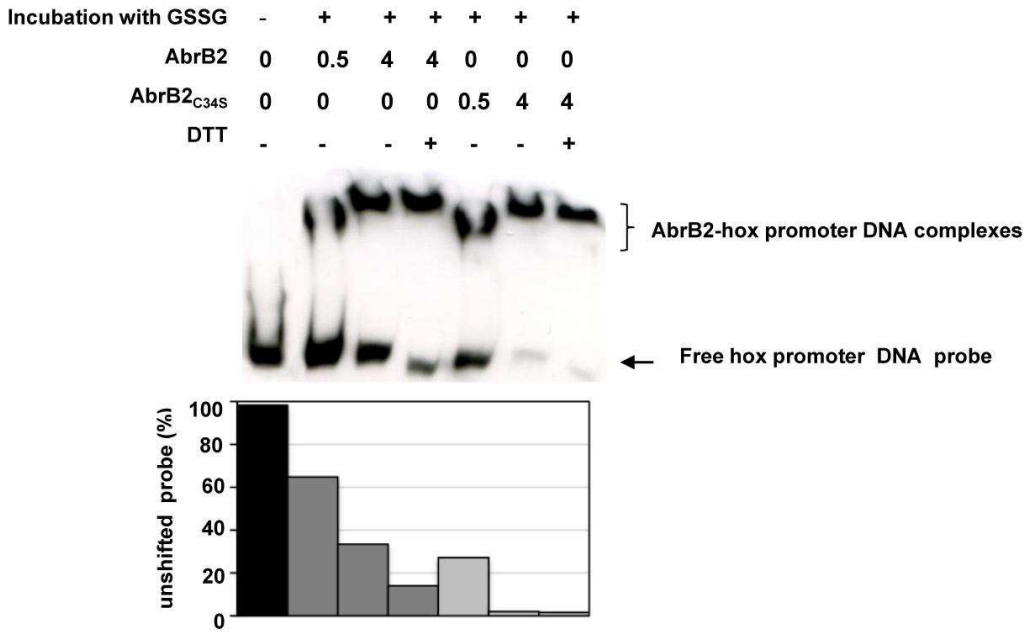
Sakr et al. Fig.3

Figure 3 caption

Figure 3

Analysis of AbrB glutathionylation with biotinylated glutathioneBioGSSG. Pre-reduced 6xHis-AbrB2 and 6xHis-AbrB2$_{C34S}$ proteins, treated or not with 2-iodoacetamide(IAM) and N-ethylmaleimide(NEM), were incubated with biotinylated glutathione (BioGSSG) prior to SDS-PAGE electrophoresis and western blot analysis with anti-biotin antibodies. The reversibility of AbrB2 glutathionylation was assessed by treatment with dithiothreitol (DTT). Proteins were resolved by non-reducing SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for western blotting with anti-biotin antibodies. These experiments were carried out at least twice.

Figure 4

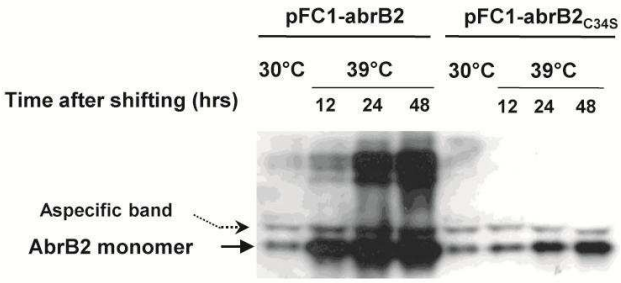


Sakr et al. Fig.4

Figure 4

Electrophoretic migration-shift assay of the binding of the 6xHis-AbrB2 and 6xHis-AbrB2$_{C34S}$ proteins to the promoter of the *hoxEFUYH* operon. Analysis of the electrophoretic mobility of the DIG-labelled *hoxEFUYH* promoter DNA, following incubation with increasing amounts of purified 6xHis-AbrB2 and 6xHis-AbrB2$_{C34S}$ proteins, which were pre-treated or not for 6 h with 5 mM GSSG, leading to the glutathionylation of 80% of the 6xHis-AbrB2 protein, not of His$_6$-AbrB2$_{C34S}$ that has no cysteine. Arrows and brace brackets indicate the positions of the free DNA probes and the retarded DNA-protein complexes, respectively. Histogram bars show relative intensities between shifted and unbound DNA signals, quantified using ImageJ software. These experiments were performed at least two times.

Figure 5



Sakr *et al*. Fig.5

Figure 5 caption

Figure 5

Western blot analysis of the abundance of the AbrB2 protein in the strains WT/pFC1-abrB2 and WT/pFC1-abrB2$_{C34S}$ cultivated at 30°C and then shifted to 39°C for 12h, 24h or 48h. 20µg of soluble proteins were migrated on a non-reducing SDS-PAGE, transferred to membrane for western blotting with the indicated anti-AbrB2 antibody. The arrows show AbrB2 monomer (lowest signal 14 kDa) an aspecifically detected protein of about 20 kDa (probably pigmentary) and AbrB2 dimer (about 35 kDa). These experiments were performed at least two times.

Supplemental Table 1 Characteristics of the plasmids used in the present study

Plasmids	Relevant features	Reference
Targeted deletion of the *abrB2* gene in *Synechocystis*		
pGEMT	AT overhang Amp^r cloning vector	Promega
pUC4K	Source of the Km^r marker gene	Pharmacia
pKNOCK Gm	Source of the Gm^r marker gene	[31]
pΔsll0822	pGEMT with the *Synechocystis sll0822* flanking sequences, where the *sll0822* coding sequence (CS, from 7 bp to 384 bp) was replaced by a *Sma*I site	[6]
pΔsll0822::Km^r	pΔsll0822 with the Km^r marker inserted into the unique *Sma*I site	[6]
psll0822	pGEMT with the *Synechocystis sll0822* CS, harbouring an *Hpa*I site downstream of the *sll0822* stop codon, and flanking regions	This study
psll0822-Gm^r	psll0822 with the Gm^r marker inserted into the unique *Hpa*I site	This study
psll0822$_{C43S}$-Gm^r	psll0822-Gm^r harbouring the cysteine to serine mutation at position 34	This study
High- level expression of *abrB2* in *Synechocystis*		
pFC1	Replicating plasmid for heat-inducible gene expression in *Synechocystis*	[5]
pFC1-abrB2	pFC1 with *sll0822* CS cloned between the *Nde*I-*Bsp*EI restriction sites	This study
pFC1-abrB2$_{C34S}$	pFC1 with *sll0822*$_{C34S}$ mutant CS cloned between the *Nde*I-*Bsp*EI sites	This study
Production of AbrB2 and AbrB2$_{C34S}$ in *E. coli*		
pET14b	Amp^r *E.coli* plasmid for the production of 6His-tagged proteins	Novagen
pET14b-abrB2	pET14b with *sll0822* CS cloned between the *Nde*I- *Bam*HI sites	[6]
pETA4babrB2$_{C34S}$	pET14b with *sll0822*$_{C34S}$ CS cloned between the *Nde*I-*Bam*HI sites	This study

Supplemental Table 2: Sequence of the PCR primers used in this study

Gene inactivation of *sll0822*

sll0822_M-Fw	GCCTGGGCCAATTGATATCC	
sll0822_M-Rv	GCTGCCATCCTGTTGCCATT	
sll0822_R4	GGGCTTGGTTGCGTTCCCGGGAGCCATTCAAGTTTTC	*Sma*I
sll0822_A4	AGGTGGGGGCTTGGCTCCCGGGAACGTAAGGCTAATT	*Sma*I
KmHinCFW	GGCGCTGAGGTCGACCTCGTGAAGAAG	*Hinc*II
KmHinCRV	ACCTGCAGGGGGTCGACGGAAAGCCAC	*Hinc*II

Introduction of *sll082-Gm^r* or *sll0822$_{C34S}$-Gm^r* in Δ*sll0822*

sll0822_mutCys_Fw	GAAGTTACATAACCG**g**AGATTTTAGCTTTCT	
sll0822_mutCys_Rv	AGAAAGCTAAAATCT**c**CGGTTATGTAACTTC	
sll0822_UP_ApaI_Rv	AGATAGGGCCCAGGGATATTCT	*Apa*I
sll0822_DW_SpeI_Fw	GTTGTATTTTGCAAACTAGTTC	*Spe*I
sll0822_HpaI_Fw	TTAGTCCCAGCAAATTAG**ttaa**CCTTACTCTTCTTCGTCGTCA	*Hpa*I
sll0822_HpaI_Rv	TGACGACGAAGAAGAGTAAGG**ttaa**CTAATTTGCTGGGACTAA	*Hpa*I
GmR pKNOCK *Fw*	TGACATAAGCCTGTTCGG	
GmR pKNOCK *Rv*	CGAATTGTTAGGTGGCGG	

Cloning of *sll0822* and sll0822$_{C34S}$ coding sequences at *Nde*I-*Eco*RI sites of pFC1 for heat inducible overexpression of AbrB2 or AbrB2$_{C34S}$

sll0822_NdeI_Fw:	GAATTCCATATGGCTAAATCAAACGCAACC	*Nde*I
sll0822_BspEI_Rv:	TTTTTTTCCGGATTACTCTTCTTCGTCGTCAGCCC	*Bsp*EI
sll0822_mutCys_Fw	GAAGTTACATAACCG**g**AGATTTTAGCTTTCT	
sll0822_mutCys_Rv	AGAAAGCTAAAATCT**c**CGGTTATGTAACTTC	

Cloning into pET14b for over-expression and purification of 6His-Sll0822 and 6His-Sll0822$_{C34S}$ from *E.coli*

sll0822_NdeI_Fw	GAATTCCATATGGCTAAATCAAACGCAACC	*Nde*I
sll0822-BamHI-Rv :	CGGGATCCTTACTCTTCTTCGTCGTCAGCCC	*Bam*HI
sll0822_mutCys_Fw	GAAGTTACATAACCG**g**AGATTTTAGCTTTCT	
sll0822_mutCys_Rv	AGAAAGCTAAAATCT**c**CGGTTATGTAACTTC	

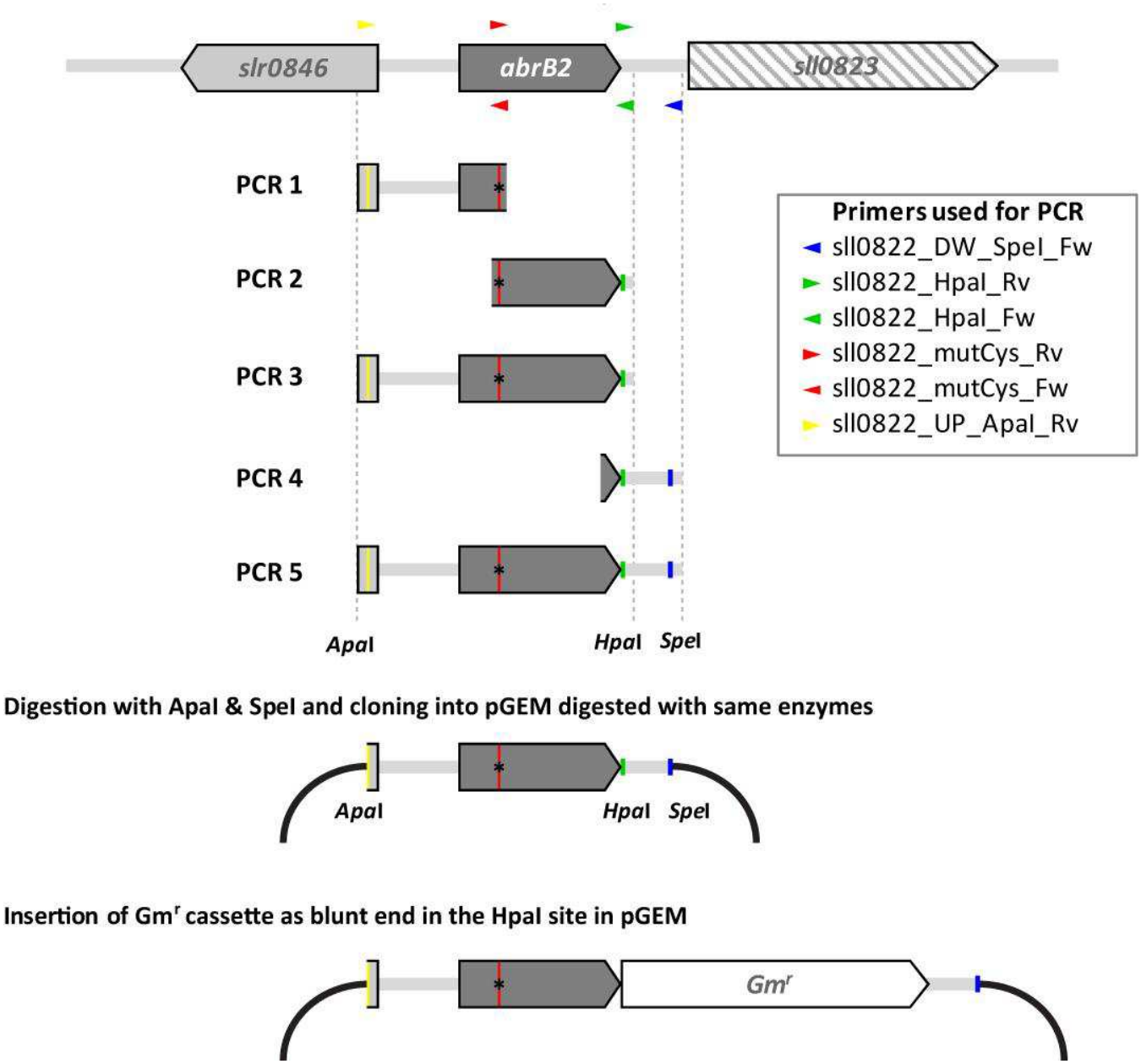
qPCR

HoxE Left	GCCCATCCTAGTGGAGACAA
HoxE Right	GGTAAAAAGTCGCCACTCCA
HoxF Left	TGAAATGACCCCAGAGGAAG
HoxF Right	ATACCTTCGAGGATGCGATG
Hox sll1222 Left	TGCTATGGCTATCCCCTCTG
Hox sll1222 Right	AGCTCCCTTGGTTTTCCATT
HoxU Left	GTTTGTGCATGGTGGAAGTG
HoxU Right	ATTCACAGTTGCCGTTAGCC
HoxY Left	CTCAAGGAATACCCGGACAA
HoxY Right	AGAACCGGATCGCTACCTTT
Hox ssl2420 Left	CCCCAGAGGAGCAAAAGTTA
Hox ssl2420 Right	TCTTGGGTTCTTTCCTCACG
Hox sll1225 Left	TGTCCGACTTCTTGTTGGGTA
Hox sll1225 Right	AGCAATTTGGGCTTGAGTGT
HoxH Left	CTGCGCCGTTTAATGAATTT
HoxH Right	CACTGACCAAGCAGAGTGGA
RnpB Left	GTGAGGACAGTGCCACAGAA
RnpB Right	GGCAGGAAAAAGACCAACCT

Hox promoter fragments for EMSA

Hox_gelshift Fw1	CGATATTAATTTAGTTACGAAATATTAACAAAATCTAGTGC
Hox_gelshift Rv6	GTCATGGAAAAATCCTCAAAAAGGAGC

Supplemental Figure 1



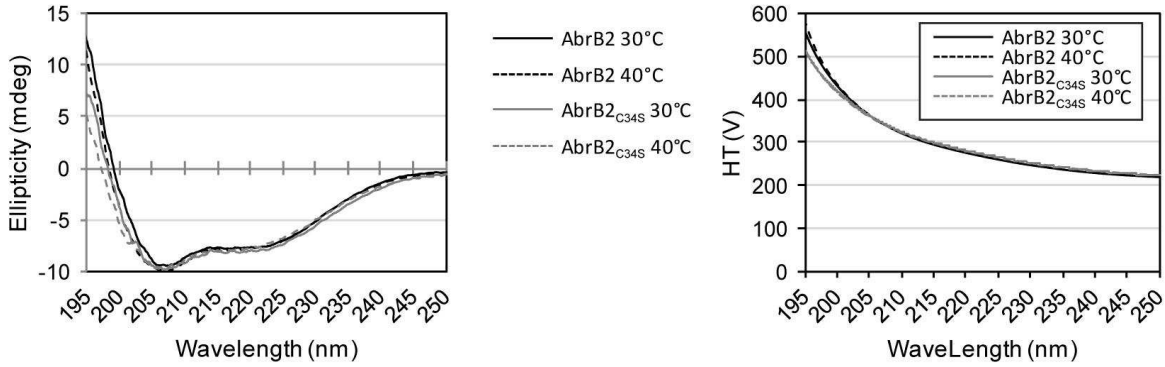
Supplemental figure 1

Construction of the *abrB2*$_{C34S}$-Gm^r and *abrB2*-Gm^r DNA cassettes. The *Synechocystis* genes *abrB2* (*sll0822* in CyanoBase http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase), *slr0846* and *sll0823* are represented by boxes (*abrB2*: dark grey; *slr0846*: light grey; and *sll0823*: hatched), which point in the direction of their transcription. The PCR1 and PCR2 DNA segments were amplified by PCR with the following primers (supplementary Table 2): sll0822_UP_ApaI_Rv (yellow triangle) and sll0822_mutcys_Fw (leftward-pointing red triangle), and sll0822_mutcys_Rv (rightward-pointing red triangle) and sll0822_HpaI_Fw (leftward-pointing red triangle), respectively. The PCR3 DNA segment was assembled using the PCR1 and PCR2 DNA templates and the sll0822_UP_ApaI_Rv and sll0822_HpaI_Fw primers. The PCR4 DNA was amplified from *Synechocystis* DNA using the primers sll0822_HpaI_Rv (rightward-pointing green triangle) and sll0822_DW_SpeI_Fw (blue triangle). The PCR5 DNA segment was assembled using the PCR3 and PCR4 DNA templates and the primers sll0822_UP_ApaI_Rv and sll0822_DW_SpeI_Fw. The PCR5 DNA was subsequently digested with *Apa*I and *Spe*I and cloned into the pGEM-T plasmid opened with the same enzymes. The resulting plasmid was opened with *Hpa*I to introduce the gentamycin resistance cassette (from pKNOCKGm) for selection. For the construction of the *abrB2*-Gm^r DNA cassette (not shown for the sake of brevity), a WT version of the PCR3 DNA segment was generated by PCR amplification of *Synechocystis* DNA with the primers sll0822_UP_ApaI_Rv and sll0822_HpaI_Fw. After mixing with PCR4 DNA a WT version of PCR5 was obtained upon amplification with the primers sll0822_UP_ApaI_Rv and sll0822_DW_SpeI_Fw, and subsequently fused to the Gm^r marker as described above. The sll0822-Gm^r and sll0822$_{C34S}$-Gm^r DNA cassettes were verified by PCR and nucleotide sequencing (BigDye kit; ABI, Perkin-Elmer).

A Sll0822 MAKSNATKPLTGEALLEKVKELGDLPKEEKAKI**C**GYVTSTKKGLPRVNMMKFYNALMDAQGIDLD
SSASGQGRGGRSA**SYRISVQ**SNGN**LLIGAAYTKKM**SLNVGD**EFEITL**GRK**HIHLKQ**VGADDEEE 129AA

β β α β β

B

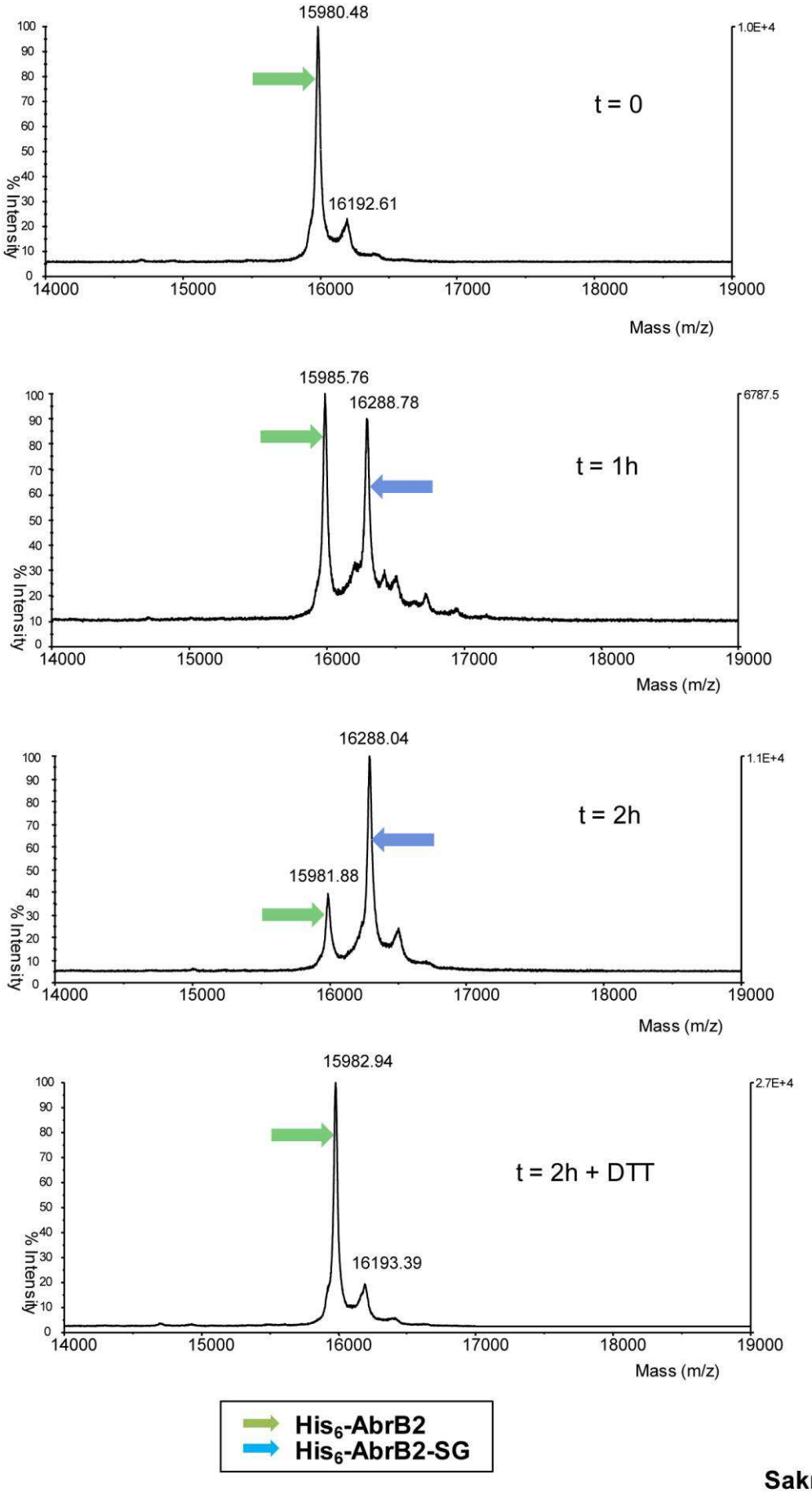


Sakr et al.
Supplemental. Fig.2

Supplemental figure 2

A. Amino-acids sequence of AbrB2 showing its unique cysteine residue, as well as the alpha helix and beta sheets.

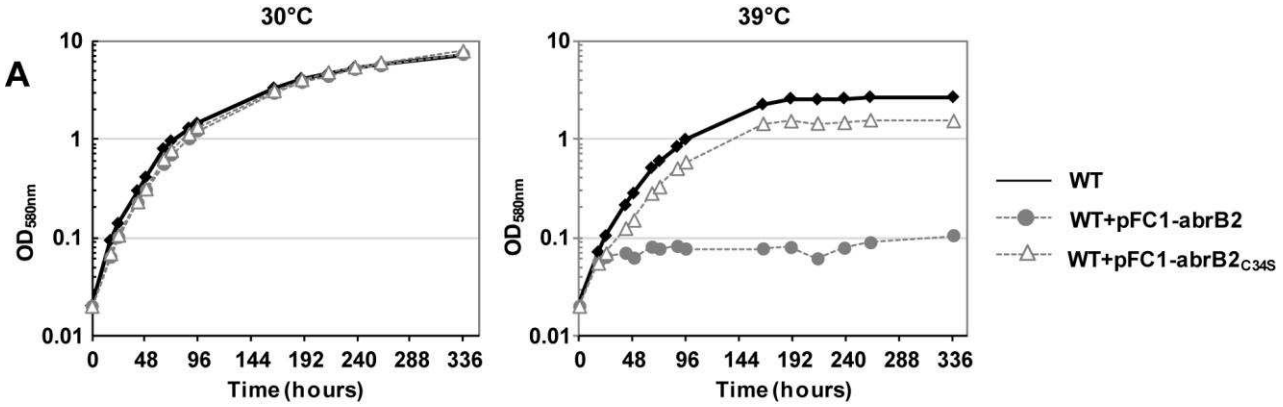
B. Circular dichroism spectra of the recombinant His6-AbrB2 and His6-AbrB2$_{C34S}$ proteins purified from *E. coli* at 30°C and 40°C. Ellipticity was normalized to protein concentration. These experiments were carried out at least twice.

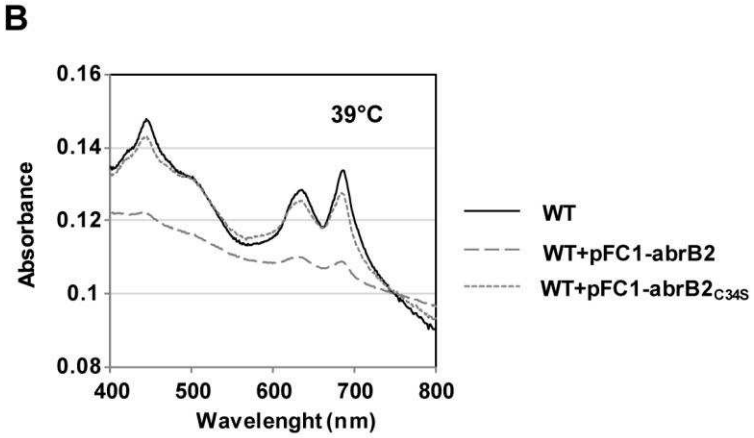


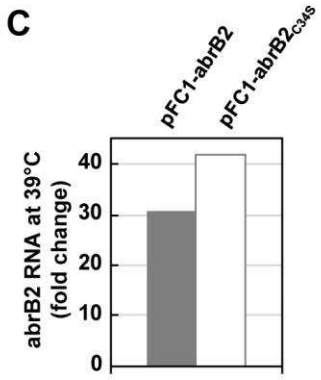
Sakr et al.
Supplemental. Fig.3

Supplemental figure 3

Kinetics of glutathionylation of the 6xHis-AbrB2 protein monitored by MALDI-TOF mass spectrometry. Green arrows show the peak for 6xHis-AbrB2, blue arrows for glutathionylated His_6-AbrB2. Glutathionylation reaches about 80% after 2 h of 5 mM GSSG treatment. Last graph shows reversibility of glutathionylation by treatment with DTT.







Sakr et al.
Supplemental. Fig.4

Supplemental figure 4

A. The growth of the three strains WT, WT/pFC1-abrB2 and WT/pFC1-abrB2$_{C34S}$ cells at either 30°C and 39°C are indicated with black diamonds (WT), grey circles (WT/pFC1-abrB2) and open triangles (WT/pFC1-abrB2$_{C34S}$), respectively. These experiments were repeated three times and yielded statistical deviations too small to be represented.

B. Typical absorption spectra of an equal number (OD_{750}=0.1) of the cells WT (full line), WT/pFC1-abrB2 (large dotted line) and WT/pFC1-abrB2$_{C34S}$ (thin dotted line), which were incubated 192 hours at 39°C prior to analysis. The spectra (normalized to light scattering at 800 nm) were monitored at least three times.

C. Histograms showing the ratio of the *abrB2* transcripts in WT/pFC1-abrB2 and WT/pFC1-abrB2$_{C34S}$ cells over WT/pFC1 cells propagating the empty pFC1 plasmid. The strains were all incubated for 24 h at 39°C prior to qRT-PCR analyses. These experiments were performed three times.

1-3- Conclusion

Ces travaux ont permis une meilleure caractérisation du fonctionnement d'AbrB2. Cet auto-régulateur est susceptible de ressentir le stress oxydant par son unique cystéine et d'y subir des modifications post-traductionnelles qui assurent le bon contrôle de l'ensemble du régulon d'AbrB2.

Cette nouvelle dimension de la régulation de l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle médiée par un contrôle post-traductionnel sur son répresseur AbrB2 peut être modélisée comme illustré par la figure 121 :

- Dans les conditions normales AbrB2 exerce une répression totale sur l'opéron *hox*, la formation de tétramères qui renforcent les structures tridimensionnelles de l'ADN pouvant être en partie responsable (Fig121.A).

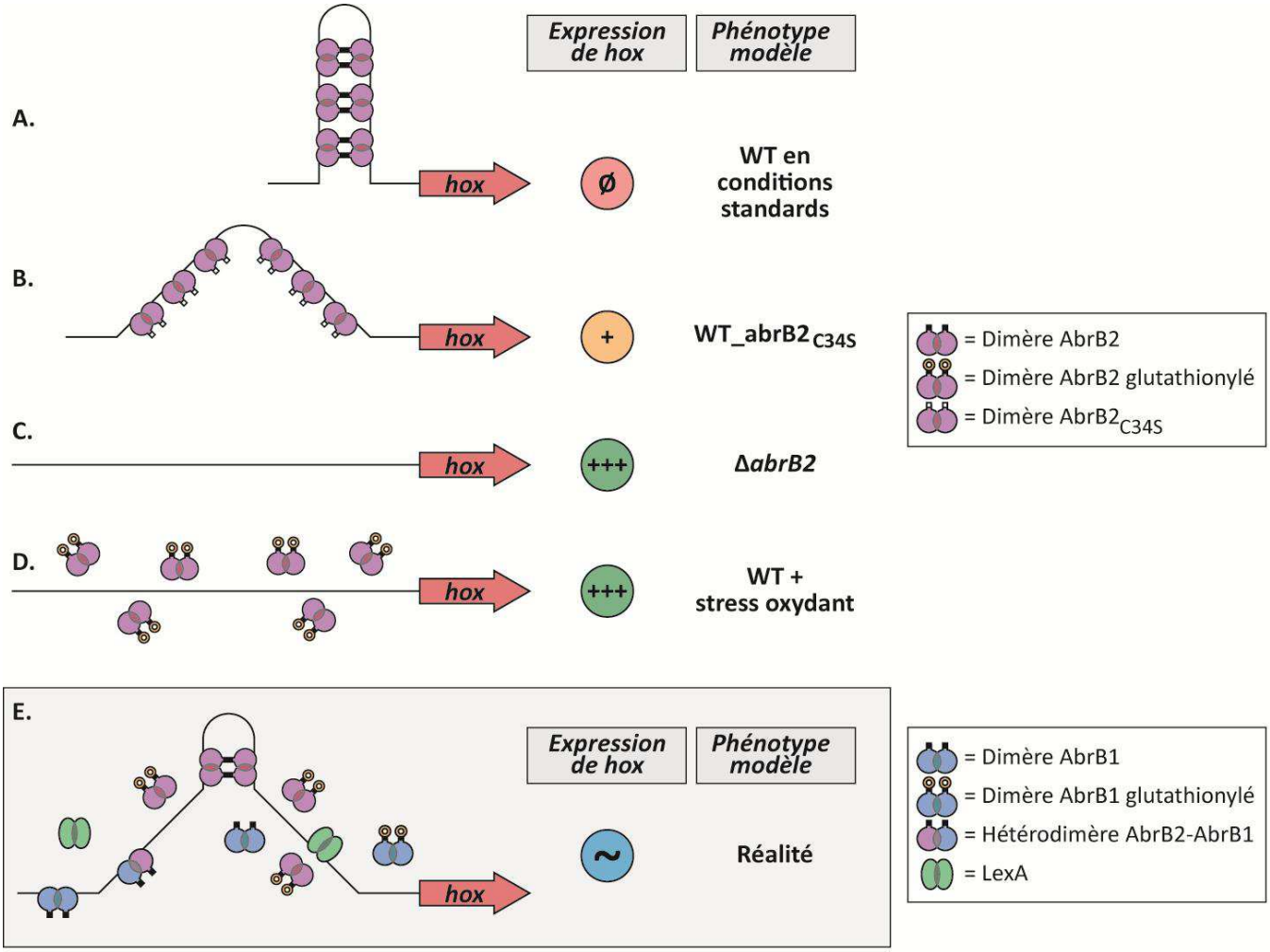
- L'absence d'AbrB2 lève la répression sur *hox* sur dans la souche Δ*abrB2* (Fig121.C).

- Lorsque la cystéine 34 d'AbrB2 est mutée l'expression de *hox* est intermédiaire entre un phénotype sauvage et un phénotype Δ*abrB2*. L'affinité pour l'ADN est similaire (le site de reconnaissance pouvant néanmoins être légèrement différent), mais l'impossibilité de former des tétramères et de ressentir le stress oxydant par la sérine qui remplace la cystéine, affecte la manière dont la répression s'effectue, elle est moitié inférieure sur l'ensemble du génome (Fig125) et perd de sa flexibilité par insensibilité au redox (Fig121.B).

- Lorsque les cellules de *Synechocystis* sont soumises à un stress oxydant, elles encourent une glutathionylation de leur cystéine, cette modification affecte négativement leur capacité à interagir avec l'ADN, levant la répression sur *hox* (Fig121.D).

- Dans les conditions réelles (Fig121.E), AbrB2 doit pouvoir subir différentes modifications qui affectent son fonctionnement, la glutathionylation n'étant qu'une de ces possibilités dont la conséquence est une affinité pour l'ADN inhibée. La régulation de l'hydrogénase est aussi soumises aux deux autres régulateurs transcriptionnels AbrB1 et LexA, les deux étant aussi susceptibles d'encourir des modification post-traductionnelles (Oliveira et Lindblad 2011, Shalev-Malul et al. 2008), Samer Sakr a notamment prouvé le caractère glutathionylable d'AbrB1 par sa cystéine. Sato et al. 2007 et Yamauchi et al. 2011 ont également prouvé qu'AbrB1 et AbrB2 pouvaient interagir, l'existence biologique de cet hétéromultimère pourrait se faire par la cystéine ou par interaction électrostatique des domaines AbrBs, cependant, peu est connu quant au possible rôle de ce complexe.

La transcription de l'hydrogénase bidirectionnelle est la résultante des effets de ces 3 régulateurs (les seuls connus à ce jour) mais aussi des modifications post-traductionnelles qu'ils encourent lorsque les conditions environnementales varient.



Modèle de l'expression de *hox* par contrôle redox du répresseur AbrB2

A. Dans la souche sauvage en condition standard, AbrB2 réprime totalement l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle. La formation de tétramère par la cystéine permet de maintenir des structures tridimensionnelles du promoteur qui empêchent la transcription de *hox*.

B. La mutation C34S d'AbrB2 empêche la formation de tétramères et entraîne une transcription plus forte de *hox*. Le régulateur ne peux plus ressentir le stress oxydant par sa cystéine.

C. L'absence de régulateur AbrB2 dans la souche Δ*abrB2* lève l'inhibition sur *hox*, l'expression est forte constitutivement.

D. Lorsque *Synechocystis* est soumise à un stress oxydant, AbrB2 devient glutathionylée, les structures tétramériques et la fixation à l'ADN sont abolies, l'expression de l'hydrogénase est forte.

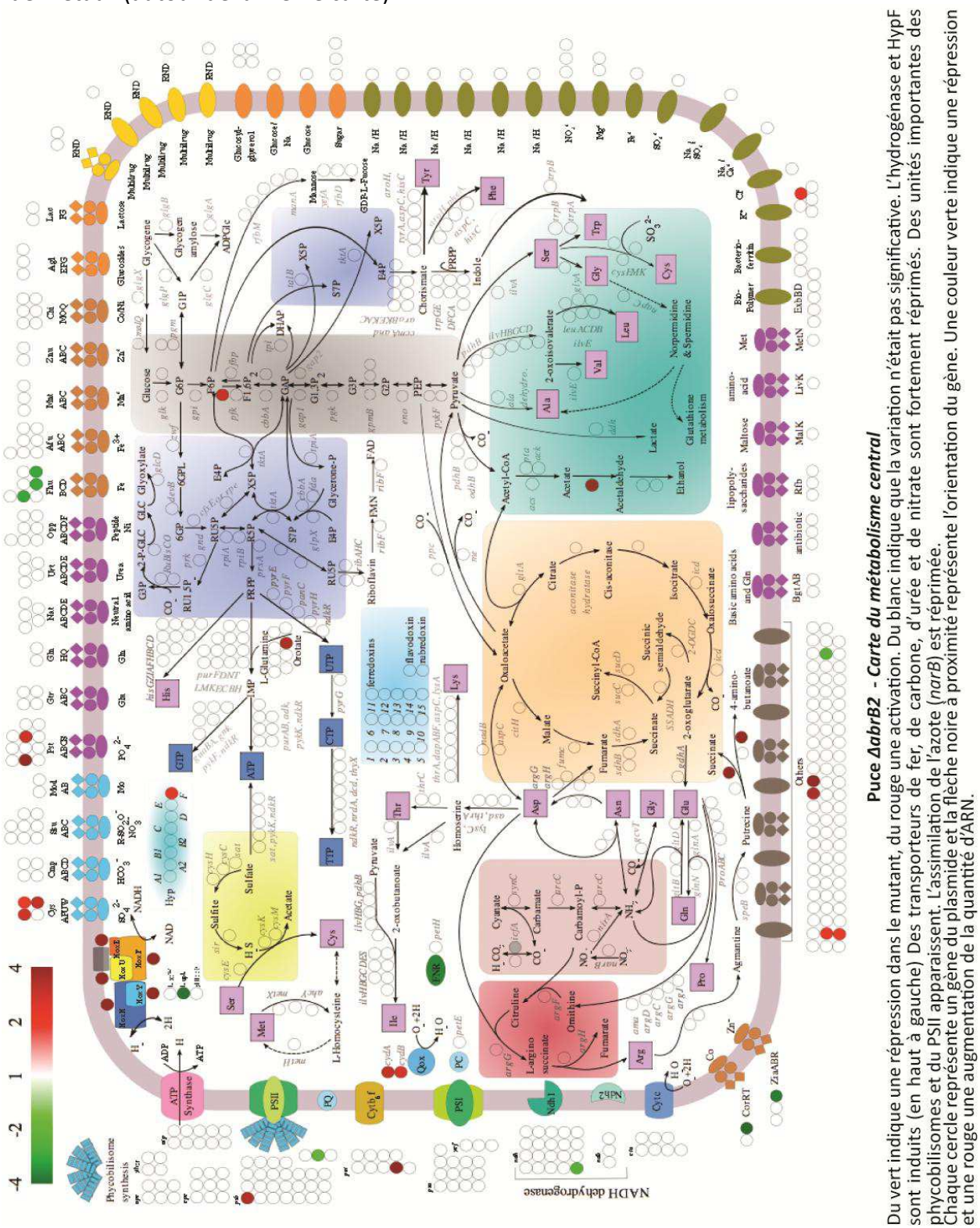
E. Dans les conditions réelles, l'expression de l'hydrogénase est modulée par l'effet d'AbrB2 et de ses modifications post-traductionnelles, mais aussi par les deux régulateurs AbrB1 et LexA. AbrB1 est un activateur, lui-aussi glutathionylable mais on ignore l'effet de cette modification sur son fonctionnement. AbrB1 et AbrB2 sont également susceptibles d'interagir ensemble, on ignore le rôle de ce complexe vis-à-vis de *hox*, ni si il s'agit d'une interaction par la cystéine ou électrostatique entre les domaines AbrBs. LexA interagit avec l'ADN en amont de *hox*, il est lui aussi susceptible d'être modifié post-traductionnellement, mais on ignore la nature et les conséquences de ces modifications.

Figure 120

2- Résultats supplémentaires

2-1- L'unique cystéine d'AbrB2 est importante pour l'expression de l'ensemble de son régulon.

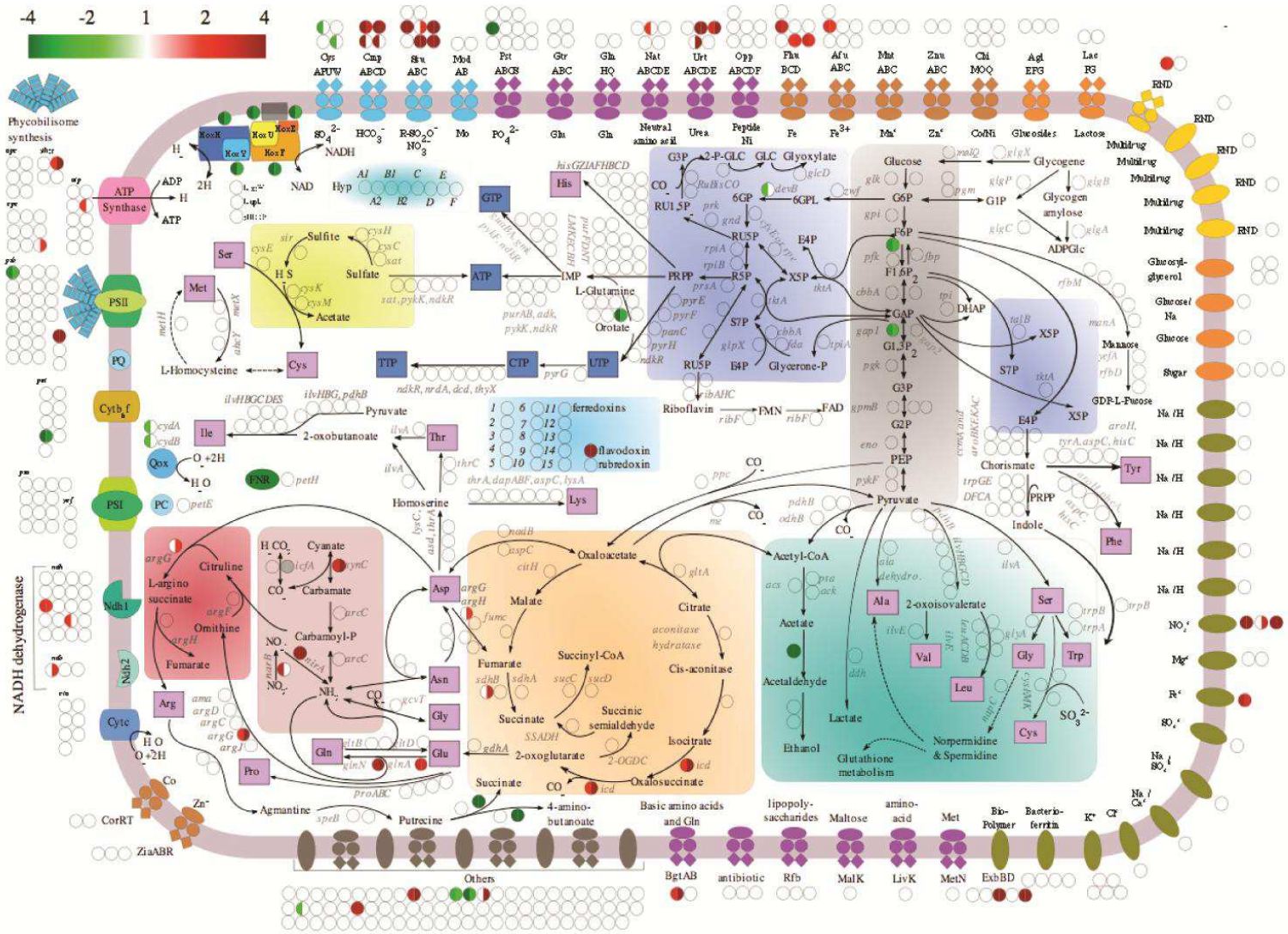
Les gènes dont l'expression variait dans le transcriptome *ΔabrB2* par rapport à la souche sauvage varient de manière inverse dans les transcriptome *abrB2*/*abrB2*$_{C34S}$ réintroduit dans Δ*abrB2* par rapport à Δ*abrB2*. Les images suivantes montrent les cartes du métabolisme central et de quelques plasmides où l'inversion des répressions et inductions est flagrante, particulièrement concernant l'expression des gènes *hox* (hydrogénase bidirectionnelle, en haut à gauche de la carte du métabolisme central (Fig 122 et 123), ce qui confirme les résultats obtenus par qRT-PCR, et quelques transporteurs de métaux (autour de la même carte).



Puce *ΔabrB2* - *Carte du métabolisme central*

Du vert indique une répression dans le mutant, du rouge une activation. Du blanc indique que la variation n'était pas significative. L'hydrogénase et HypF sont induits (en haut à gauche) Des transporteurs de fer, de carbone, d'urée et de nitrate sont fortement réprimés. Des unités importantes des phycobilisomes et du PSII apparaissent. L'assimilation de l'azote (*narB*) est réprimée.
Chaque cercle représente un gène du plasmide et la flèche noire à proximité représente l'orientation du gène. Une couleur verte indique une répression et une rouge une augmentation de la quantité d'ARN.

Figure 121

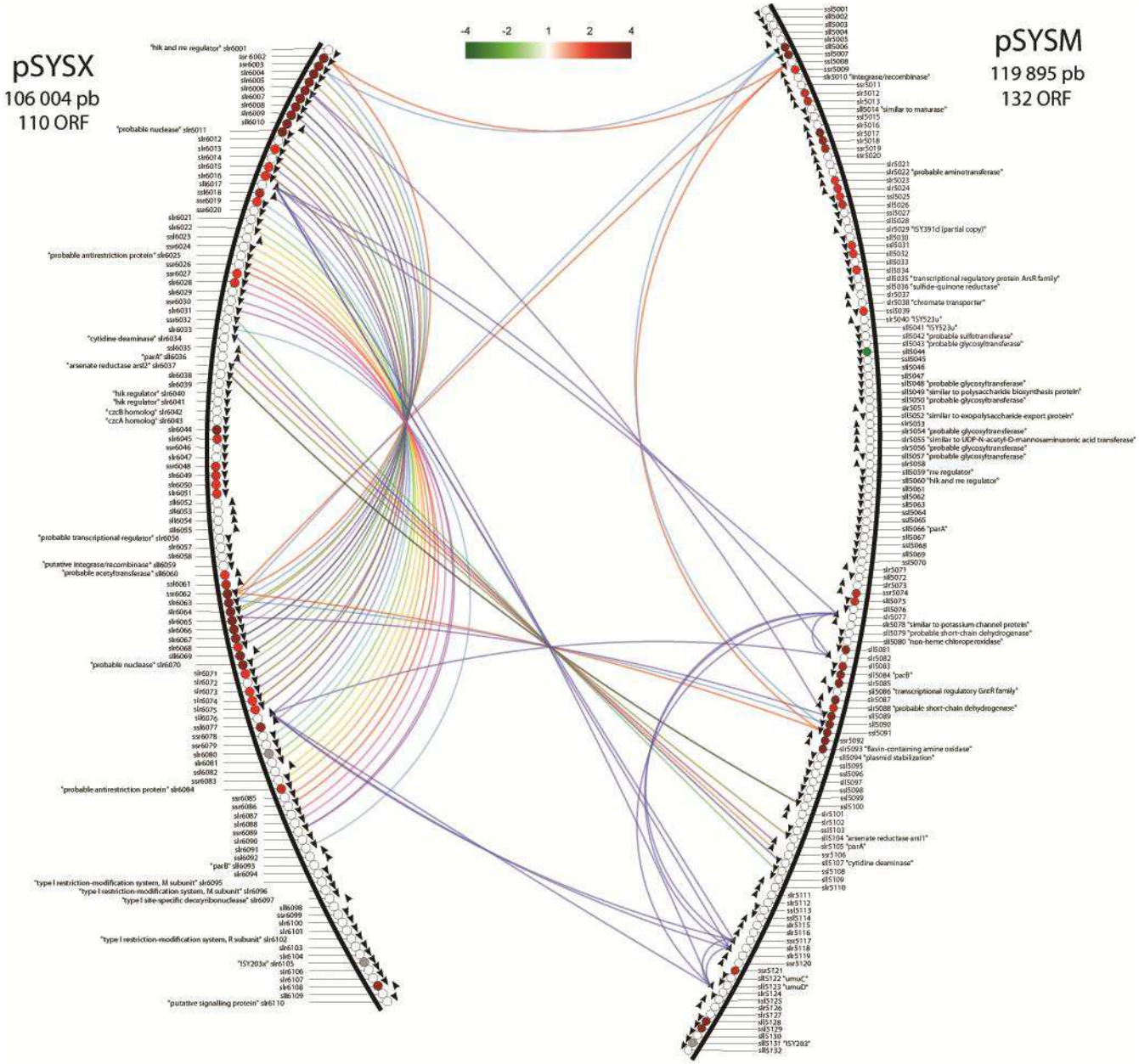


Puce "réintroduction des allèles sauvage et mutés" - *Carte du métabolisme central*

Du vert indique une répression dans le mutant, du rouge une activation. Du blanc indique que la variation n'était pas significative. L'hydrogénase et HypF sont induits (en haut à gauche) Des transporteurs de fer, de carbone, d'urée et de nitrate sont fortement réprimés. Des unités importantes des phycobilisomes et du PSII apparaissent. L'assimilation de l'azote (*narB*) est réprimée.
Chaque cercle représente un gène du plasmide et la flèche noire à proximité représente l'orientation du gène. Une couleur verte indique une répression et une rouge une augmentation de la quantité d'ARN. La moitié gauche du cercle concerne la réintroduction de l'allèle sauvage, la moitié droite, la réintroduction de l'allèle muté.

Figure 122

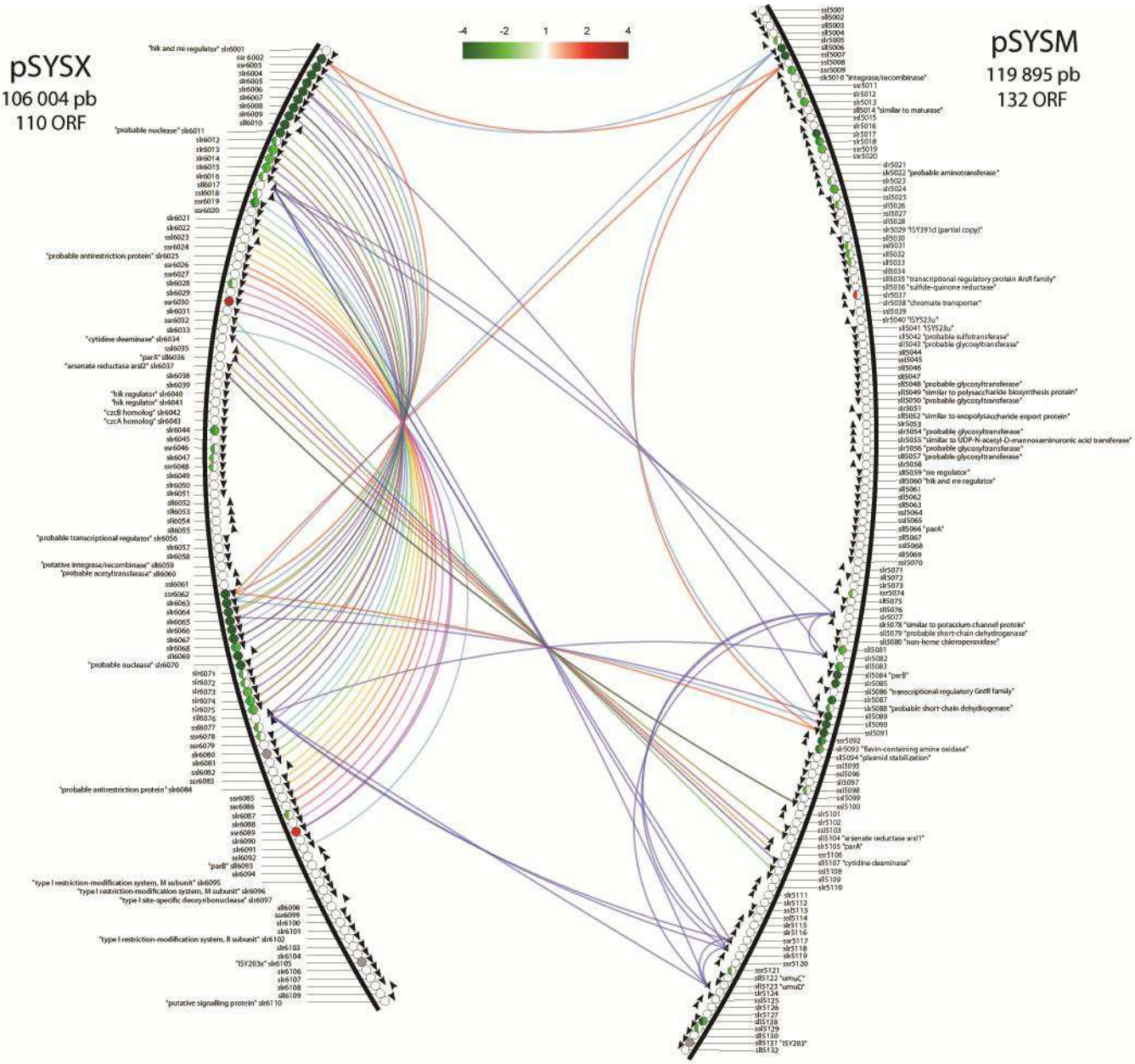
Les deux cartes suivantes montrent également les effets symétriques sur les deux plasmides pSYSX et pSYSM.



Puce *ΔabrB2* - Carte des plasmides pSYSX et pSYSM

Cette carte montre l'effet transcriptomique de la délétion d'*abrB2* dans la souche sauvage par rapport au transcriptome de la souche sauvage. Les deux plasmides pSYSX et pSYSM sont représentés linéarisés avec les gènes homologues reliés par des traits de couleur. Chaque cercle représente un gène du plasmide et la flèche noire à proximité représente l'orientation du gène. Une couleur verte indique une répression et une rouge une augmentation de la quantité d'ARN.

Figure 123



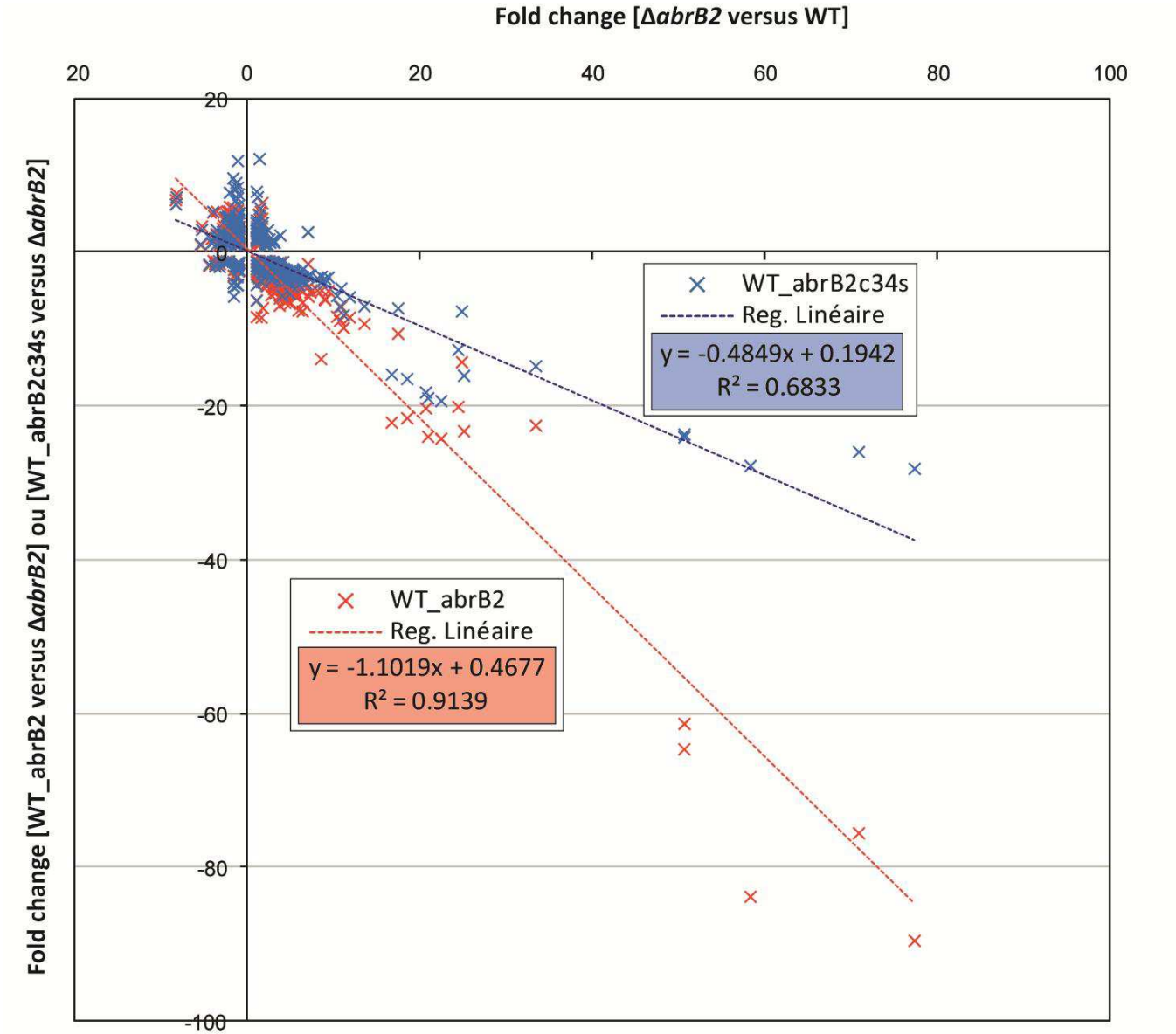
Puce "réintroduction des allèles sauvage et mutés" - Carte des plasmides pSYSX et pSYSM
Cette carte montre l'effet transcriptomique de la réintroduction d'*abrB2* ou *abrB2c34s* dans la souche Δ*abrB2* comparé au transcriptome de Δ*abrB2*. Les deux plasmides pSYSX et pSYSM sont représentés linéarisés avec les gènes homologues reliés par des traits de couleur. Chaque cercle représente un gène du plasmide et la flèche noire à proximité représente l'orientation du gène. Une couleur verte indique une répression et une rouge une augmentation de la quantité d'ARN. La moitié gauche du cercle concerne la réintroduction de l'allèle sauvage, la moitié droite, la réintroduction de l'allèle muté.

Figure 124

D'une manière plus générale, c'est l'ensemble du régulon d'*abrB2* qui est dérégulé de manière symétrique.

Les graphiques suivants illustrent ce phénomène. En abscisse sont indiqués les changements de quantité d'ARNs lors de la comparaison de transcriptomes entre Δ*abrB2* et la souche sauvage (les abscisses positives indiquent les gènes réprimés par AbrB2/induits par l'absence d'*abrB2*). Et en ordonnée sont indiqués les changements de quantité d'ARN des mêmes gènes lors de la comparaison des transcriptomes souches réintroduites avec les allèles sauvage ou muté d'*abrB2* par rapport au niveau Δ*abrB2*, des valeurs négatives indiquent donc une diminution de la quantité d'ARN consécutive à la réintroduction de l'allèle.

Une pente de -1 indiquerait une récupération parfaite du phénotype sauvage. La pente de -1,1 pour la réintroduction d'*abrB2*, mesurée dans les 2 graphiques (Fig 126 et 127), montre donc que l'ensemble des gènes qui variaient dans Δ*abrB2* étaient donc bien dus, directement ou indirectement, à l'absence d'AbrB2 dans la cellule et pas à l'accumulation irréversible d'un suppresseur.

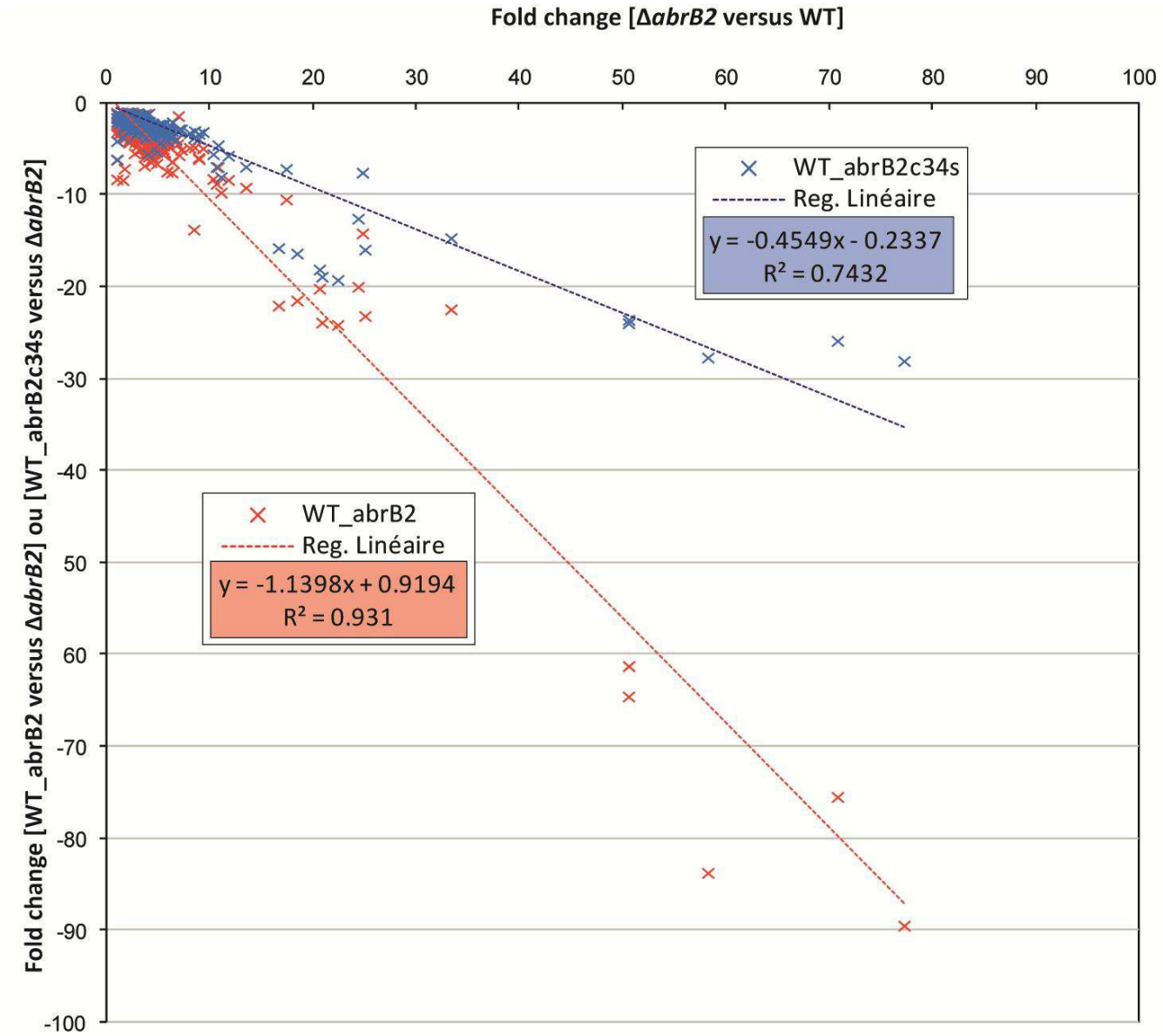


Effet transcriptomique de la réintroduction d'*abrB2* ou *abrB2c34s* dans Δ*abrB2* - Tous les gènes significatifs
Les gènes variant après réintroduction de l'allèle *abrB2* sauvage sont moins réprimés si l'allèle réintroduit est muté.
Chaque gène est représenté avec en abcisse sa variation dans le transcriptome [Δ*abrB2* versus WT] et en ordonnée sa variation dans [WT_abrB2 versus Δ*abrB2*] (rouge) ou [WT_abrB2c34s versus Δ*abrB2*] (bleu). Seuls les gènes qui varient significativement (>2 ou <-2) dans au moins un des 3 transcriptomes [Δ*abrB2* versus WT] , [WT_abrB2 versus Δ*abrB2*] ou [WT_abrB2c34s versus Δ*abrB2*] sont indiqués (524 gènes). La régression linéaire porte sur les seuls gènes représentés sur le graphique (524 gènes).

Figure 125

Ces deux graphiques montrent aussi que la réintroduction de l'allèle muté *abrB2*$_{C34S}$ ne complémente la souche ΔabrB2 vers le phénotype sauvage qu'à 55%. En effet, sur les 529 gènes significatifs analysés (0,4849/1,1019 = 44,0% voir Fig 126), et dans le cas des seuls 329 gènes réprimés par AbrB2 c'est 60% moins efficace (0,4549/1,1398 = 39,8% voir Fig 127).

Considérant que la quantité des deux protéines AbrB2 et AbrB2$_{C34S}$ est similaire dans les deux souches, voire légèrement supérieure pour l'allèle C34S (quantité d'ARN *abrB2*$_{C34S}$ doublée et de protéine visiblement un peu supérieure, voir FigX article), on conclut que cet effet sur le régulon est bien dû à l'absence de cystéine 34 qui a été remplacé par une sérine. La présence de ce résidu conservé est donc importante pour une fonction régulatrice optimale. Les capacités à tétramériser/multimériser, s'oxyder et sentir les conditions environnementales qui disparaissent par la mutation C34S, sont probablement la cause de ce dysfonctionnement sur l'ensemble du régulon.



Effet transcriptomique de la réintroduction d'*abrB2* ou *abrB2c34s* dans Δ*abrB2* - zoom sur les gènes réprimés par AbrB2
Les gènes réprimés par réintroduction de l'allèle *abrB2* sauvage sont moitié moins réprimés si l'allèle réintroduit est muté.
Chaque gène est représenté avec en abcisse sa variation dans le transcriptome [Δ*abrB2* versus WT] et en ordonnée sa variation dans [WT_abrB2 versus Δ*abrB2*] (rouge) ou [WT_abrB2c34s versus Δ*abrB2*] (bleu). Seuls les gènes significativement réprimés (>2 ou <-2) dans au moins un des 3 transcriptomes [Δ*abrB2* versus WT] , [WT_abrB2 versus Δ*abrB2*] ou [WT_abrB2c34s versus Δ*abrB2*] sont indiqués (392 gènes). La régression linéaire porte sur les seuls gènes représentés sur le graphique (392 gènes).

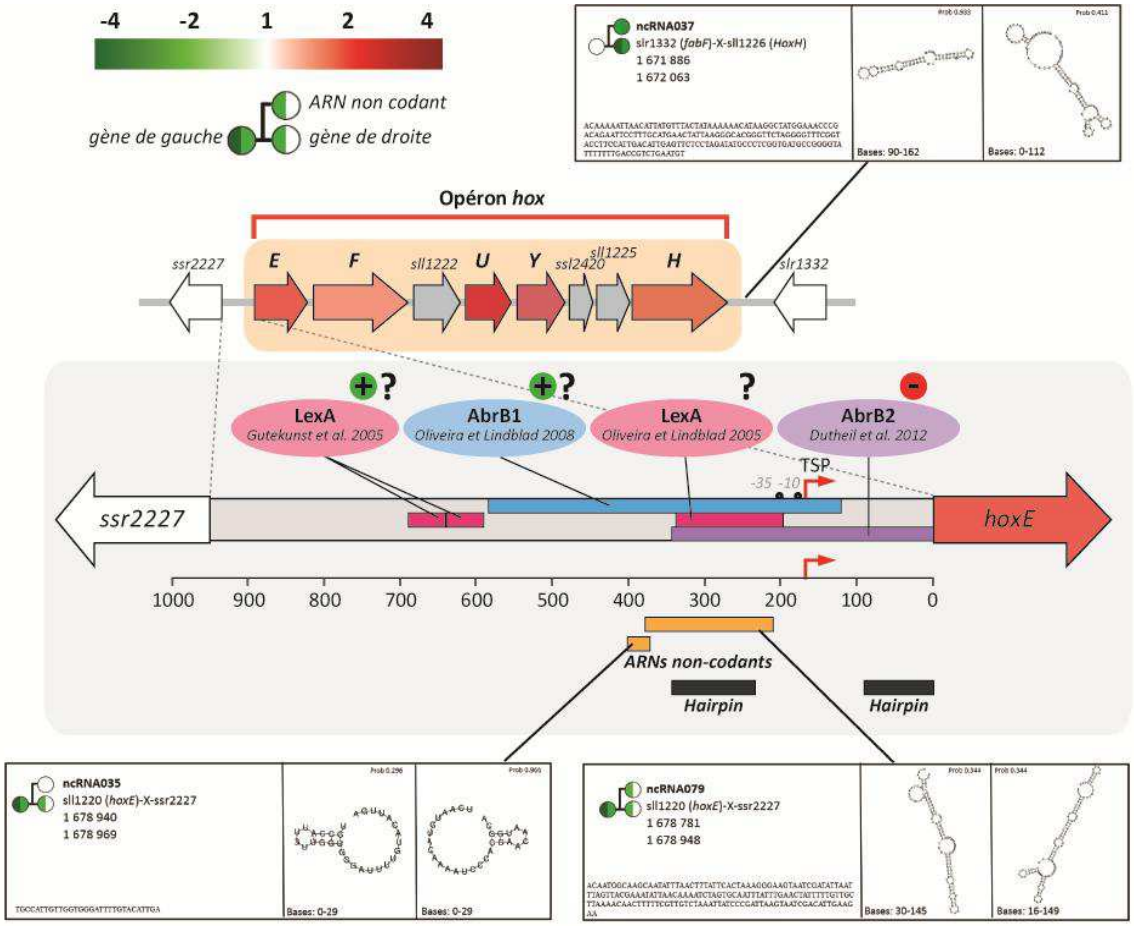
Figure 126

2-2- Les ARN non-codant en amont et aval de l'opéron *hox* sont sensibles à AbrB2

Lors de la comparaison du transcriptome de la souche mutante Δ*abrB2* à celui de la souche sauvage (Leplat et al. 2013), il n'avait pas été observé de différence très significative dans la quantité des 3 ARNs non codants identifiés autour du cluster *hox.* Les 2 ARNs non-codants en amont de *hoxE* (le petit et le long) étaient induits d'un facteurs 1,78 et 2,00 respectivement, et celui en aval de *hoxH* ne bougeait pas.

Dans les souches *abrB2-Gm*^{r} et *abrB2*$_{C34S}$*-Gm*^{r}, nous avons cependant observé des répressions significatives par rapport à la souche Δ*abrB2* de référence pour cette expérience : le grand ARN en aval de *hoxH* est ainsi réprimé d'un facteur -2,96 et -3,11 dans les deux souches (respectivement). Cet ARN était notamment connu pour être fortement induit en conditions de forte lumière ou en déficience de carbone (Mitschke et al. 2011). Ce résultat montrant qu'AbrB2 régule négativement cet ARN non-codant est ainsi compatible avec le fait que l'activité promotrice d'AbrB2 est diminuée par une forte lumière : en forte lumière AbrB2 est moins exprimé et cet ARN non-codant est induit. Cependant ce résultat est à prendre avec du recul, et une étude approfondie serait nécessaire.

L'ARN ncRNA079 en amont de *hoxE* est lui aussi réprimé par réintroduction de l'allèle sauvage d'*abrB2* dans la souche ΔabrB2 mais légèrement (x-2,33) alors qu'il était faiblement induit dans Δ*abrB2* par rapport à la souche sauvage (x1,78).



AbrB2 réprime les ARN non codants autour du cluster *hox*

Les deux plus longs ARNs non codants autour de l'opéron *hox* voient leur quantité diminuer par réintroduction d'*abrB2* ou *abrB2c34s* dans la souche Δ*abrB2*. L'ARN en amont de *hoxE* chevauche presque totalement la zone de fixation d'AbrB2 identifiée par gel-retard.
Symbolique: Du vert indique une répression, du rouge une induction. La partie de gauche du cercle concerne la variation après réintroduction de l'allèle *abrB2* sauvage dans Δ*abrB2* etla partie de droite l'allèle *abrB2c34s*.

Figure 127

2-3- La formation des complexes d'AbrB2 est dépendante de mécanismes redox

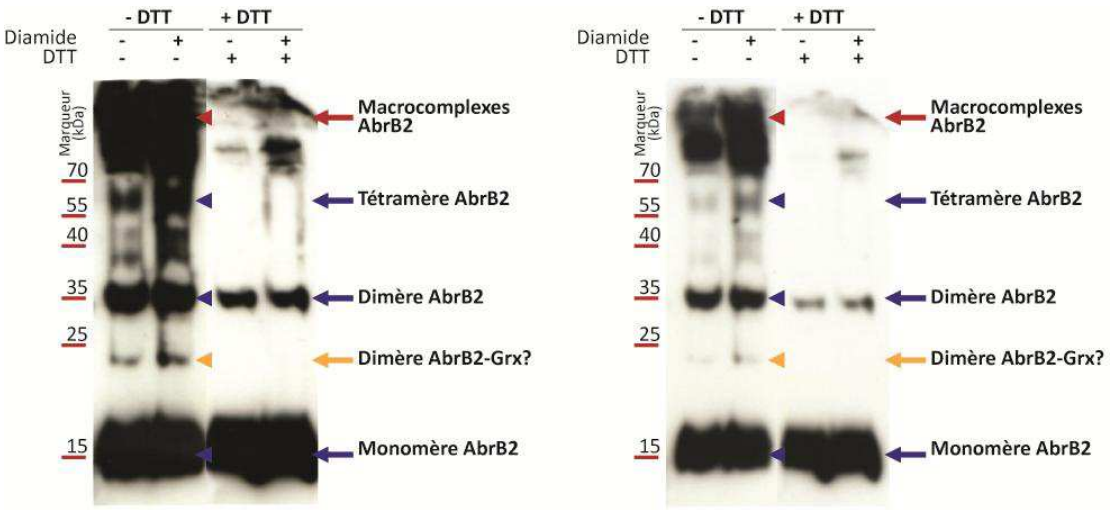
La souche WT+pFC1abrB2, surexprimant AbrB2 à 39°C a été cultivée en phase exponentielle à 30°C puis la culture a été mise à 39°C pendant 24 heures pour induire la surexpression d'AbrB2 en présence ou en absence de diamide (agent de stress oxydant) dans le milieu de culture. J'ai ensuite isolé les protéines en fractions membranaires et solubles, les ai traitées ou non avec du DTT avant de réaliser un gel SDS-PAGE et un western blot (Fig128).

Les résultats montrent plusieurs types de « complexes » contenant AbrB2 : les monomères et dimères nettement visibles, ainsi qu'une bande compatible avec la taille d'un tétramère (vers 60 kDa), mais d'autres signaux de tailles variées également (vers 24 kDa, 40 kDa et un important signal >70 kDa).

De manière intéressante, le traitement au DTT pendant 20 minutes avant migration sur gel SDS-PAGE a permis de dissocier très efficacement les « macrocomplexes » >70 kDa, de faire disparaître les signaux 24 kDa, 40 kDa et 60 kDa, et de diminuer le signal du dimère vers 30 kDa montrant que l'ensemble de ces complexes sont très sensibles au redox et donc que des ponts disulfures ou d'intermédiaires d'oxydation en sont probablement responsables. La disparition quasi totale des macrocomplexes >70 kDa va dans ce sens : il pourrait s'agir de structures polymériques d'AbrB2 maintenues par ponts disulfures multiples entre dimères d'AbrB2 : chaque dimère ayant deux cystéines, il peut s'associer avec deux autres dimères et former une chaîne protéique complexe. Les cellules soumises à un stress oxydant fort possèdent davantage de ces structures complexes, qui sont aisément dissociées grâce au DTT.

Par ailleurs, sans pouvoir le confirmer, nous pouvons remarquer que les deux signaux à 24 kDa et 40 kDa sont également plus intenses dans la souche cultivée en stress oxydant (+ diamide), et disparaissent totalement après le traitement au DTT, sont compatibles avec des complexes AbrB2-Grx (AbrB2=15 kDa, Grx=9 kDa, « AbrB2-Grx » = 24 kDa) ou « $(AbrB2)_2$-Grx » (=30+9~ 40 kDa)(voir Fig.128). Comme évoqué dans l'introduction de ce chapitre, les Grx permettent la régénération des espèces glutathionylées par un stress oxydant, comme nous avons pu vérifier *in vitro* qu'AbrB2 pouvait être glutathionylé, une interaction avec une Grx *in vivo* permettrait de déglutathionyler efficacement AbrB2 en formant des intermédiaires réactionnels covalents (le processus de déglutathionylation nécessite une étape formant un complexe covalent).

Pour confirmer cette hypothèse il faudrait réaliser une expérience similaire dans des souches délétées de *grx* et vérifier l'absence de ce signal.



Les différentes espèces AbrB2 détectées dans la souche WT+pFC1abrB2 cultivées 24h à 39°C
Les cellules WT+pFC1abrB2 ont été cultivées à 30°C jusqu'à DO_{580}=0,5, puis basculées à 39°C, avec ou sans diamide 300µM, pendant 24h pour induire la surexpression d'AbrB2. Les cellules ont été broyées avec une presse de Eaton et la fraction membranaire a été isolée de la fraction soluble. 20µg d'extraits membranaires ont ensuite été traités ou non avec 100mM de DTT pendant 20 minutes, chargées sur gel SDS-PAGE 12%, puis révélés par western blot avec un anticorps primaire AntiAbrB2 et un anticorps secondaire couplé à une peroxidase pour détection avec la technologie ECL. L'image de droite correspond à une durée d'exposition plus courte.
- Le signal vers 30kDa, indiquant le dimère AbrB2, diminue suite au traitement DTT. Révélant que la population d'espèce dimériques est sans doute faite de dimères disulfures et de dimères électrostatiques.
- Le signal vers 60kDa, compatible avec la taille d'un tétramère AbrB2, disparait avec le traitement DTT, pouvant indiquer que le tétramère se forme par pont disulfure.
- Le DTT entraîne la disparition d'un signal vers 24kDa (flèche jaune, taille compatible avec un dimère AbrB2-Grx), cette espèce est plus abondante lorsque les cellules sont cultivées avec du diamide.
- Le signal intense aux hauts poids moléculaires (flèche rouge) disparait après traitement au DTT, révélant que des structures polymériques complexes d'AbrB2 (avec lui-même, ou avec d'autres protéines) peuvent se former par ponts disulfures.

Figure 128

2-4- Une hypothèse de travail : la surproduction d'AbrB2 piègerait AbrB1

Nous avons formulé une hypothèse concernant la létalité de la surexpression d'AbrB2 au laboratoire. Comme déjà évoqué, il a plusieurs fois été rapporté dans la littérature l'existence d'un hétéromultimère AbrB1-AbrB2 (Sato et al. 2007, Yamauchi et al. 2011), de même, il a plusieurs fois été décrite l'impossibilité de déléter le gène *abrB1* du génome (Ishii et Hihara 2008, Oliveira et Lindblad 2008, mes résultats). Ainsi, le phénotype létal de la souche WT+pFC1abrB2 pourrait être une conséquence de cette interaction : AbrB2 titrerait AbrB1 et entrainerait une diminution de la quantité d'AbrB1 « libre » dans la cellule, conduisant à un phénotype « Δ*abrB1*-like » qui est létal. Comme la surexpression de l'allèle muté $abrB2_{c34s}$ n'entraine pas de létalité, on pourrait imaginer que ce multimère mixte se formerait par interaction entre les cystéines.

Nous n'avons toutefois pas pu apporter davantage d'élément qui étayent cette hypothèse.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION

1- Conclusion

Mon travail de thèse participe à une meilleure compréhension du réseau de régulation de l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* sp. PCC6803.

Une bioproduction d'hydrogène durable à partir d'organismes photosynthétiques qui ne nécessiteraient pour croître que de l'eau, de la lumière solaire, du dioxyde de carbone et quelques minéraux, est une perspectives intéressantes. Dans ce contexte, l'hydrogénase bidirectionnelle cyanobactérienne, métalloenzyme à 5 sous-unités HoxEFUYH, est effectivement d'un intérêt particulier car elle présente le meilleur rendement énergétique théorique des différentes enzymes productrices de dihydrogène des cyanobactéries.

Parmi les verrous à lever on peut noter la sensibilité à l'oxygène de cette hydrogénase (phénomène réversible chez certaines cyanobactéries), le fonctionnement faible et transitoire de l'hydrogénase *a priori* en compétition avec les autres voies qui consomment le NAD(P)H produit par la photosynthèse (Cycle de Calvin, assimilation du carbone par exemple), la faible quantité d'enzyme intracellulaire, et une mauvaise connaissance générale du métabolisme de l'hydrogène et du rôle physiologique de la production d'hydrogène.

C'est dans ce contexte que j'ai entrepris de mieux comprendre la façon dont l'expression de la machinerie de production d'hydrogène (l'hydrogénase et le métabolisme l'alimentant) est régulée.

Mieux comprendre sa régulation permettra peut-être de mieux cerner son rôle dans le métabolisme cellulaire, ce qui à terme pourra permettre de proposer des stratégies de reprogrammations métaboliques ? Comme augmenter les effecteurs positifs et diminuer les effecteurs négatifs.

Ainsi, j'ai identifié avec l'aide des post-doctorants Panatda Saenkham et Samer Sakr un nouveau répresseur de l'expression de l'hydrogénase : AbrB2.

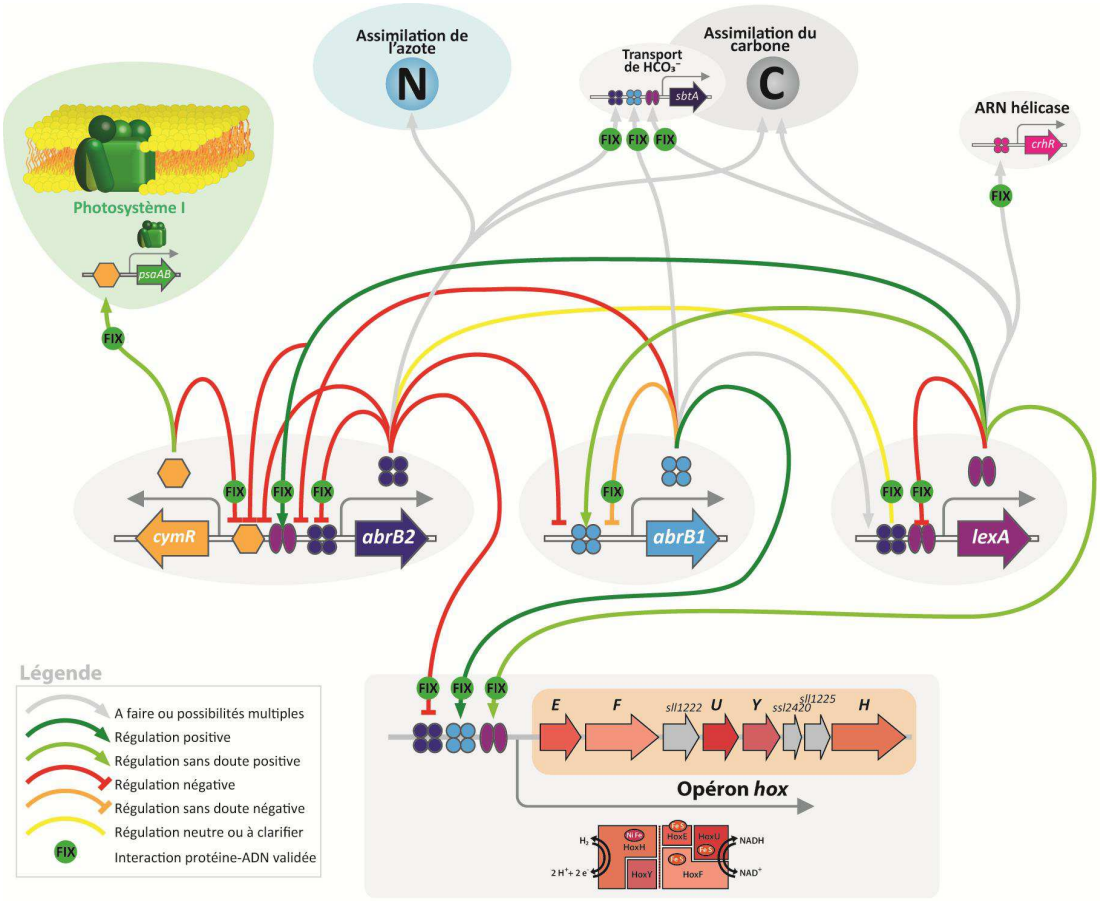
Par une combinaison de techniques *in vivo* et *in vitro*, nous avons décrit le rôle de ce régulateur vis-à-vis de *hox* dans nos travaux détaillés dans l'article Dutheil et al. 2012. Pour cela, nous avons construit un mutant de *Synechocystis* délété du gène *abrB2* et déterminé qu'il pouvait croître aussi bien qu'une souche sauvage dans les conditions standards du laboratoire. Nous avons déterminé qu'AbrB2 est un autorépresseur qui possède un promoteur atypique constitué d'une boîte -10 étendue sans boîte -35. Ensuite, par différentes fusions transcriptionnelles de la région promotrice de l'opéron *hoxEFUYH* au gène rapporteur *cat*, nous avons montré qu'AbrB2 affecte négativement l'activité promotrice de *hox*. Cet effet de régulation négative de l'opéron *hox* a été confirmé par une augmentation du niveau de transcrits des huit gènes de l'opéron *hox* dans le mutant Δ*abrB2* par rapport à la souche sauvage. Effet visible ensuite sur l'activité hydrogénase des même cellules (activité multipliée par 3).

Après production et purification chez *E.coli* de la protéine AbrB2 taguée avec une queue histidine, nous avons pu valider *in vitro* l'interaction de la protéine avec la région promotrice en amont de *hoxE*, confirmant l'effet répresseur direct d'AbrB2.

Pour compléter cette caractérisation nous avons aussi construit un plasmide surproducteur d'*abrB2* par thermocontrôle, qui nous a révélé la symétrie de l'effet répresseur sur *hox* : une

augmentation de la quantité d'AbrB2 dans la cellule entraîne une diminution des niveaux d'ARN des 8 gènes de l'opéron *hox* ainsi qu'une division par 3 de l'activité hydrogénase.

Ces travaux portent à 3 le nombre de régulateurs connus de l'expression de l'hydrogénase, dont les deux premiers (historiques) LexA et AbrB1 avaient été sommairement décrits comme interagissant avec le promoteur de l'opéron *hox* et activant éventuellement son expression (Oliveira et Lindblad 2005, Gutekunst et al. 2005, Oliveira et Lindblad 2008). Grâce aux autres résultats du laboratoire nous avons alors pu détailler le réseau de régulation probable de l'opéron *hox*, comportant les effets des 3 régulateurs entre eux ainsi que quelques-unes des relations entre ces 3 régulateurs :



Représentation Schématique de la régulation transcriptionnelle exercée sur l'opéron *hox* chez *Synechocystis* sp. PCC6803
Effet des régulateurs AbrB1, AbrB2, LexA et CymR

Figure 129

La description de ce réseau nous a ensuite permis de valider une stratégie de surexpression de l'opéron *hox* en se basant sur la diminution des agents qui affectent négativement son expression et sur l'augmentation des agents qui l'affecte positivement. La souche Δ*abrB2*+pFC1abrB1 a ainsi montré une activité hydrogénase supérieure au mutant Δ*abrB2.*

Afin de toujours mieux caractériser la régulation de l'expression de *hox*, j'ai mené dans le deuxième temps de ma thèse l'analyse de l'unique cystéine 34 du répresseur d'AbrB2, très largement conservée au sein des protéines CyAbrBs.

J'ai montré que la surexpression thermocontrôlée de l'allèle sauvage d'*abrB2* conduisait à la mort rapide des cellules, probablement à cause de la dérépression métabolique due à des gènes

appartenant au régulon d'AbrB2 (350 gènes affectés par AbrB2, Leplat et al. 2013). De manière intéressante, la surexpression d'un allèle d'*abrB2* muté sur sa cystéine 34 en sérine ne conduit pas à la mort des cellules. Les différents contrôles que nous avons effectués (RT-PCR quantitative, western blot, dichroïsme circulaire et retard sur gel menés sur les 2 allèles de la protéine AbrB2 produits et purifiés chez *E.coli*) ont permis de montrer que la cystéine 34 n'intervient pas sur l'accumulation de transcrit, ni sur la structure tridimensionnelle de la protéine ou sur sa capacité de fixation à l'ADN, mais plutôt sur l'accumulation de la protéine AbrB2 dans la cellule (turnover, stabilité): nous n'avons pas obtenu une surexpression de la protéine $AbrB2_{C34S}$ comparable à celle d'AbrB2 sauvage alors que la quantité d'ARNm est similaire, et il est difficile de conclure si l'effet létal est une conséquence de l'accumulation d'AbrB2 et si la présence de la cystéine joue un rôle important pour cet effet.

J'ai donc construit de nouveaux mutants dans lesquels la quantité d'AbrB2 n'était pas dépendante de la température et sous le contrôle du promoteur naturel du gène abrB2. A partir de la souche Δ*abrB2* décrite dans mon premier article: j'ai réintroduit les allèles *abrB2* ou $abrB2_{C34S}$ directement dans le chromosome à l'emplacement initial du gène *abrB2* et exprimés par le promoteur naturel d'*abrB2*. L'analyse de ces mutants a montré une expression légèrement augmentée (<2) d'$abrB2_{C34S}$ par rapport à *abrB2*, aux niveaux transcriptionnel (RT-PCR quantitative) et protéique (détection de la protéine par western blot). La protéine $AbrB2_{C34S}$ serait ainsi légèrement affecté dans sa capacité à s'autoréprimer.

L'effet de la mutation C34S a ensuite été mesuré au niveau de l'accumulation des transcrits des gènes *hox* codant pour l'hydrogénase (qRT-PCR), au niveau de la quantité de protéine de la sous-unité HoxF (détectée par western blot grâce à un anticorps donné par Geneviève Guédeney) et au niveau de l'activité hydrogénase (détectée électrochimiquement). Les résultats montrent qu'$AbrB2_{C34S}$ possède une capacité de répression de l'opéron *hox* plus faible que l'allèle sauvage AbrB2 et concluent donc à l'importance primordiale du résidu cystéine du régulateur AbrB2. Ce résultat étant renforcé par la légère, mais plus forte, abondance de la protéine mutée (environ x2).

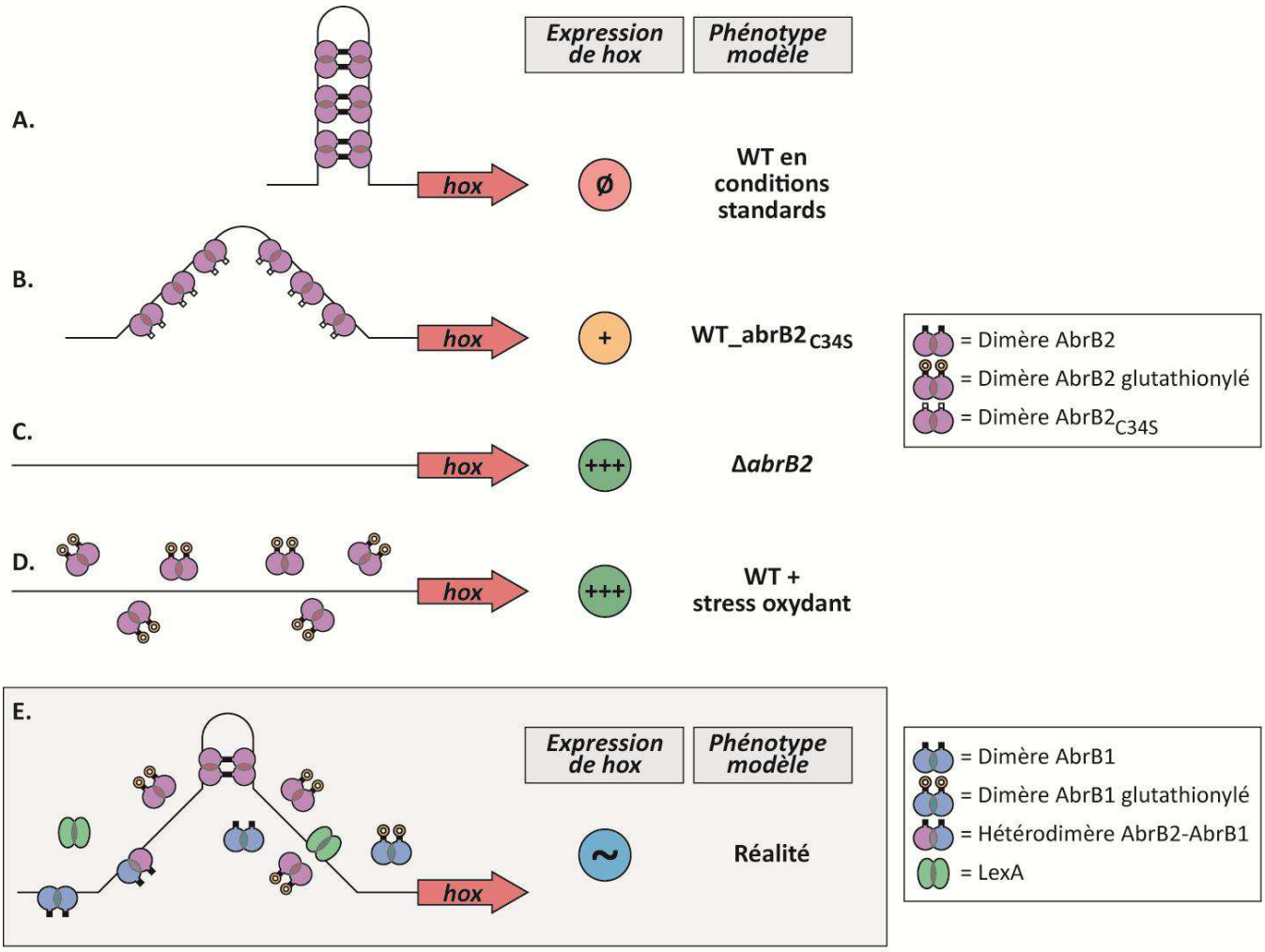
La résistance au stress oxydant due à une exposition au diamide de la souche portant l'allèle muté C34S est également intermédiaire entre la souche Δ*abrB2* et l'allèle sauvage dans le même contexte génomique, indiquant que la résistance au stress diamide (oxydant) est contrôlée par AbrB2 et en partie par son unique cystéine. De plus, l'effet délétère de la mutation C34S d'AbrB2 a pu être confirmé sur le transcriptome : sur l'ensemble de 529 gènes significativement régulés directement ou indirectement par AbrB2. L'allèle $abrB2_{C34S}$ possède une capacité de répression en conditions standards diminuée d'environ 60%, prouvant que la cystéine d'AbrB2 est cruciale pour son activité de répression.

Parallèlement, nous avons démontré avec Samer Sakr que la protéine AbrB2 pouvait être cible de la glutathionylation (pont disulfure entre la cystéine de la protéine et la cystéine du glutathion) *in vitro*. Cette modification post-traductionnelle affecte drastiquement la capacité du régulateur à reconnaître l'ADN. Cette modification de cystéine est un phénomène qui se produit souvent en conditions de stress oxydant et qui permet généralement de protéger les protéines d'une suroxydation irréversible. Dans la plupart des cas, l'activité des enzymes glutathionylées est affectée par la modification et dans le cas d'AbrB2 nous proposons que cette modification joue un rôle de « signaling » du stress oxydant : le régulateur glutathionylé se décroche de ses ADN cibles et modifie alors leur expression (levée d'inhibition dans le cas de l'hydrogénase). Ce mécanisme que nous avons proposé dans un manuscrit en cours de préparation serait compatible avec un rôle de Hox dans l'évacuation du stress oxydant.

Nous avons également montré que le régulateur AbrB2 était susceptible de former des tétramères *in vivo*, très vraisemblablement par pont disulfure entre deux dimères d'AbrB2. La formation d'espèces glutathionylées, ou oxydées par la cystéine, d'AbrB2 conduit donc à la rupture des ponts disulfures de ces tétramères, ce qui modifie de manière importante la manière dont vont être régulés les gènes cibles. L'incapacité à former des tétramères et à ressentir le stress oxydant lorsque la cystéine est mutée en sérine affecte en effet de manière importante la régulation des gènes cibles (voir fig126 et 127).

AbrB1 est aussi susceptible de subir une glutathionylation par son unique cystéine (Sakr et al. non publié). L'ensemble de nos résultats suggère donc fortement que les cystéines des CyAbrBs sont des résidus primordiaux du fonctionnement de ces régulateurs, qui leur confèrent une capacité à sentir le statut redox de l'environnement et à répercuter une réponse transcriptionnelle rapide à ces changements.

Ces travaux constituent la première mise en évidence d'une glutathionylation d'un régulateur cyanobactérien ainsi que d'un régulateur portant un domaine AbrB. Ils permettent également de mettre en évidence l'importance du statut redox de la cellule sur l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle. Une telle description est compatible avec un rôle de l'hydrogénase dans la participation à l'évacuation du stress oxydant, notamment en accord avec l'hypothèse de servir de valve à électrons (Cournac et al. 2004).



Modèle de l'expression de *hox* par contrôle redox du répresseur AbrB2

A. Dans la souche sauvage en condition standard, AbrB2 réprime totalement l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle. La formation de tétramère par la cystéine permet de maintenir des structures tridimensionnelles du promoteur qui empêchent la transcription de *hox*.

B. La mutation C34S d'AbrB2 empêche la formation de tétramères et entraîne une transcription plus forte de *hox*. Le régulateur ne peux plus ressentir le stress oxydant par sa cystéine.

C. L'absence de régulateur AbrB2 dans la souche Δ*abrB2* lève l'inhibition sur *hox*, l'expression est forte constitutivement.

D. Lorsque *Synechocystis* est soumise à un stress oxydant, AbrB2 devient glutathionylée, les structures tétramériques et la fixation à l'ADN sont abolies, l'expression de l'hydrogénase est forte.

E. Dans les conditions réelles, l'expression de l'hydrogénase est modulée par l'effet d'AbrB2 et de ses modifications post-traductionnelles, mais aussi par les deux régulateurs AbrB1 et LexA. AbrB1 est un activateur, lui-aussi glutathionylable mais on ignore l'effet de cette modification sur son fonctionnement. AbrB1 et AbrB2 sont également susceptibles d'interagir ensemble, on ignore le rôle de ce complexe vis-à-vis de *hox*, ni si il s'agit d'une interaction par la cystéine ou électrostatique entre les domaines AbrBs. LexA interagit avec l'ADN en amont de *hox*, il est lui aussi susceptible d'être modifié post-traductionnellement, mais on ignore la nature et les conséquences de ces modifications.

Figure 130

PERSPECTIVES

2- Perspectives

Les perspectives de ce travail sont multiples, pour approfondir davantage la compréhension du métabolisme de l'hydrogène de *Synechocystis* sp. PCC6803.

J'ai tenté de révéler l'existence de l'espèce AbrB2 glutathionylée (AbrB2-SG) *in vivo.* Pour cela, j'ai mis au point un protocole d'immunoprécipitation d'AbrB2 avec les anticorps dirigés contre AbrB2 qui fonctionne bien. Cependant l'anticorps commercial dirigé contre le GSH n'est pas assez sensible pour mettre en évidence la glutathionylation d'AbrB2 dans des extraits de *Synechocystis* cultivée dans les conditions standard ou en présence de diamide (il n'y a pas beaucoup de protéine AbrB2 immunoprécipitée et l'anticorps AntiGSH fonctionne mal même sur des glutathionylations réalisées *in vitro* sur des lots glutathionylés à plus de 80%). J'ai essayé de contourner le problème en convertissant chimiquement la modification « glutathionylation de cystéine *in vivo*» par une « NEM biotinylation » qui serait beaucoup plus efficacement détectée par western blot (procédure connue sous le nom de « Grx-switch » Applegate et al. 2008) mais ce protocole n'est malheureusement pas compatible avec une immunoprécipitation ultérieure. Des techniques de protéomique plus sophistiquées pourraient éventuellement détecter cette modification si la protéine AbrB2 est suffisamment abondante. L'utilisation de la souche WT+pFC1abrB2 cultiver avec du diamide pourrait peut-être aider à obtenir le résultat attendu.

Etudier l'effet sur le transcriptome de divers stress oxydants sur les souches réintroduites avec *abrB2* ou $abrB2_{C34S}$, et valider ces résultats par des expériences *in vivo* et *in vitro* sur des gènes cibles pourrait permettre de mieux comprendre les effets des modifications de cystéines d'AbrB2.

De même, comprendre le processus de déglutathionylation d'AbrB2 permettrait de mieux maitriser le processus de la levée de la répression de l'opéron *hox*. Ralentir la déglutathionylation d'AbrB2 pourrait permettre d'obtenir des souches possédant naturellement une meilleure expression de l'opéron *hox*. En ce sens, il faudrait déterminer quelle(s) glutarédoxine(s) interagit(ssent) avec AbrB2, éventuellement en réalisant un double hybride bactérien, ou en montrant la disparition des bandes de 24 et 40 kDa repérées sur la figure 127 en surexprimant AbrB2 dans des souches délétées de *grx*. *Synechocystis* possède 3 Grx, dont les mutants, doubles mutants et triples mutants ont déjà été construits au laboratoire.

L'effet de la glutathionylation sur la protéine Hox serait également intéressant à regarder, peut-être qu'un tel phénomène se produit et permet une régulation de l'activité de cette hydrogénase ?

L'interaction entre AbrB2 et AbrB1 est également une question intéressante à traiter, notamment pour comprendre pourquoi une souche surexprimant AbrB2 meurt quand il est impossible de déléter le gène *abrB1*. L'hypothèse d'une titration de AbrB1 par AbrB2 a été évoquée, ainsi des plasmides surproduisant les deux protéines conjointement pourraient peut-être inhiber la létalité ? Des manipulation *in vitro* et *in vivo* de « pull down » avec des allèles C34S de AbrB2 et AbrB1 pourrait permettre de déterminer si l'interaction entre ces deux régulateur est cystéine-dépendante ou non

(l'interaction a été décrite par Sato et al. 2008 et Yamauchi et al. 2011 sans proposer de mécanisme d'interaction).

Le rôle d'AbrB2 envers la zone 5' non-traduite des transcrits *hox* serait également une question à traiter pour comprendre si AbrB2 réalise également une régulation traductionnelle en plus de transcriptionnelle sur l'expression de *hox.* Dans l'article Dutheil et al. 2012 nous avions effectivement montré qu'AbrB2 interagissait avec la région du promoteur de *hox* correspondant au domaine 5' non-traduit de l'ARN *hoxEFUYH*.

Le rôle des ARN non-codants, et d'AbrB2 envers ces ARNs serait également intéressant à explorer.

L'identification du composé UV-absorbant inconnu relargué par la souche mutante Δ*abrB2* dans son surnageant de culture serait très intéressante à finaliser. Le protocole de purification sommaire de ce composé inconnu que j'ai pu mettre au point permettra peut-être d'obtenir de meilleurs résultats en analyse GC-MS.

Finalement, et car il s'agit des étapes de la régulation d'une enzyme les plus en aval dans le processus de régulation, l'alimentation en NADPH et la production d'hydrogène elles-mêmes seraient intéressantes à regarder dans les mutants que j'ai construit au laboratoire. Les outils de mesures de photoproduction d'hydrogène sont en cours de mise au moins avec notre partenaire Hervé Bottin.

MATERIELS & METHODES

1- Note

Une grande partie des techniques utilisées au cours de ma thèse a déjà été décrite dans les deux articles déjà présentés. Les techniques qui y sont détaillées ne sont donc pas présentées à nouveau ici.

2- MATERIELS & METHODES

2-1- Inventaire du matériel utilisé au Laboratoire

2-1-1- Matériel informatique & logiciels utilisés

OBJET	MARQUE	MODELE	UTILISATION
Ordinateur	MACINTOSH	IMac MB417*/A	Rédaction, internet et logiciels d'exploitation de résultats
Analyse de séquençage	Gene Codes Corporation	Sequencher™ V 4.7	Exploitation données de séquençage
	DNA Strider	-	-
Internet	Apple	Safari	Photos : http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/ **Génomes :** http://genome.microbedb.jp/cyanobase/ http://mbgd.genome.ad.jp/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ **Programmes utiles :** http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/

2-1-2- Matériel de manipulation

OBJET	MARQUE	MODELE	UTILISATION	REMARQUES
Pipettes	PIPETMAN	P2 à P1000	Prélèvement de liquide	Automatique
Pipettes	RAININ	SL2 à SL1000	Prélèvement de liquide	Automatique
Tips/Embouts	SORENSON	10, 200, 1000 µL	Embouts de prélèvement	Jetables
Pipettes électriques	HIRSCHMANN LABORGERATE	Pipetus®-akku	Prélèvement de liquide	A recharger sur secteur
Stripettes graduées	COSTAR	Stripettes 4485, 4486, 4487, 4488, 4489, 4490	Embouts de prélèvement 1, 2, 5, 10, 25 et 50 mL	Jetables
Eppendorf	EPPENDORF	1,5 et 2 mL	Récipient à liquide	Jetables
Tubes Falcon	FALCON	50 à 100mL	Récipient à liquide	Jetables
Boîtes de Pétri pour *E.coli*	PHOENIX BIOMEDICAL	-	Cultures solides de *E.coli*	-
Boîtes de culture pour *Synechocystis*	NUNC	50mL	Cultures solides de *Synechocystis*	-
Erlenmeyer	PYREX & FischerBrand	25, 50, 100, 250, 500, 1000mL	Cultures liquides de *E.coli* et *Synechocystis*	-
Bécher	PYREX & FischerBrand	5, 10, 25, 50, 100, 250 mL	Récipient à liquide	-
Vortexeur	Scientific Industries	Vortex-Genie 2	mélanger des volumes par vortex	-
Thermocycleur pour PCR	EPPENDORF	MASTERCYCLER	PCR	-
Micro Onde	SCHOLTES	Varion 2065	Fondre les gels d'agar	-
Centrifugeuse (grand modèle)	EPPENDORF	CENTRIFUGE 5804R	-	-
Centrifugeuse (petit modèle)	EPPENDORF	CENTRIFUGE 5415D	-	-
Hotte stérile	ESI FLUFRANCE	ARIANE 12 et ARIANE 15	Manipulations biologiques nécessitant stérilité	-
Hotte chimique	IRIAN Technologies	CVF-400	Pour gels avec BET et autres produits chimique dangereux	-
Bec Bunsen automatique	IBS Integra Bioscience	Fireboy eco	Stérilisation du matériel	-
Stérilisateur	L'AUTO-THERMOS	-	Stérilisation des milieux de culture	-
Etuve	MEMMERT	-	-	30 à 200°C
Incubateur pour *E.coli*	PROLABO	-	Cultures solides de *E.coli*	37°C
Incubateur pour *E.coli*	FisherBrand	DIEMOS	Cultures solides de *E.coli*	30°C
Incubateur pour *E.coli*	INFORS HT	MULTITRON STANDARD	Cultures liquides de *E.coli*	37°C. Pas de lumière
LUMINCUBE pour *Synechocystis*	INFORS HT	MULTITRON	Cultures liquides de *Synechocystis*	30 ou 39°C. Tubes Néons blancs

Réfrigérateurs -20°C	LIEBHERR	-	Stockage du matériel biologique et biochimique en cours	-
Réfrigérateurs -80°C	SANYO	-	Stockage du matériel biologique peu courant	-
Azote Liquide	Air Liquide	ARPEGE 140, ARPEGE 110, TR26	Conservation des souches de *E.coli* et *Synechocystis*	-
Luxmètre	Chauvin-Arnoux	-	Mesure de l'intensité lumineuse pour les cultures de *Synechocystis*	-

2-1-3- Matériel d'analyse

OBJET	MARQUE	MODELE	UTILISATION	REMARQUES
Générateur électrique	SEBIA	GD 251D	-	-
Bac électrophorèse (grand modèle)	HORIZON	11.14	-	250V max
Bac électrophorèse (petit modèle)	AMERSHAM BIOSCIENCE	HE 33 mini horizontal submarine unit	-	-
Spectrophotomètre	SECOMAM	UVIKON XL	Spectre UV-visible complet	Marche sous PC
Spectrophotomètre	BECKMAN	DU 640B Spectrophotometer	Densité Optique à λ fixe	-
Presse	EATON	-	Extraction protéines de *Synechocystis*	6 à 18T de pression

2-1-4- Substances chimiques

2-1-4-1- Milieux de cultures

2-1-4-1-1- Milieu Minéral MM pour *Synechocystis*

Le milieu standard de culture de *Synechocystis* utilisé au laboratoire est celui proposé dans l'article Rippka et al. 1979, et modifié par ajout de carbonate (Domain et al. 2004):

SUBSTANCE	FORMULE	MASSE MOLECULAIRE	MARQUE	PURETE	1L DE MM 1X	RISQUES & SECURITE
Nitrate de Sodium anhydre	$NaNO_3$	84,99 $g.mol^{-1}$	Prolabo	99,5%	1500 $mg.L^{-1}$	O : Comburant Xn : Nocif R : 8-22-36 S : 22-24-41
Hepes Acide	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238,31 $g.mol^{-1}$	Sigma Aldrich	99,5%	715 $mg.L^{-1}$	Xi : Irritant R : 36/37/38 S : 26-36
Hydrogénophosphate de di-Potassium anhydre	K_2HPO_4	174,18 $g.mol^{-1}$	Merck	98,5%	40 $mg.L^{-1}$	- - S : 22-24/25
Sulfate de Magnésium Heptahydraté	$MgSO_4$, $7H_2O$	246,48 $g.mol^{-1}$	Fluka	99,5%	75 $mg.L^{-1}$	- - -
di-Chlorure de Calcium Dihydraté	$CaCl_2$, $2H_2O$	147,02 $g.mol^{-1}$	Merck	99,0%	36 $mg.L^{-1}$	Xi : Irritant R : 36 S : 26
Acide Citrique Hydraté	$C_6H_8O_7$, H_2O	210,14 $g.mol^{-1}$	Prolabo	99,7%	6 $mg.L^{-1}$	Xi : Irritant R : 37/38-41 S : 26-36/37/39
Citrate Ferrique d'Ammonium (Fe: 14,5-16 %)	$C_6H_8O_7$, xFe^{3+}, y NH_3	variable $g.mol^{-1}$	Fluka	95,0%	6 $mg.L^{-1}$	Xi : Irritant R : 36/37/38 S : 26
Acide Tétracétique d'Ethylène Diamine dans Mg et Na	$C_{10}H_{12}MgN_2Na_2O_8$	358,51 $g.mol^{-1}$	Fluka	99,5%	1 $mg.L^{-1}$	- - S : 22-24/25
Carbonate de di-Sodium	Na_2CO_3	105,99 $g.mol^{-1}$	Merck	99,9%	200 $mg.L^{-1}$	Xi : Irritant R : 36 S : 22-26
Acide Borique anhydre	H_3BO_3	61,43 $g.mol^{-1}$	Merck	99,8%	2,86 $mg.L^{-1}$	- - -
di-Chlorure de Manganèse Tétrahydraté	$MnCl_2$, $4H_2O$	197,91 $g.mol^{-1}$	Prolabo	99,0%	1,81 $mg.L^{-1}$	Xn : Nocif R : 22-52 -

Sulfate de Zinc Heptahydraté	$ZnSO_4$, $7H_2O$	287,54 $g.mol^{-1}$	Merck	99,5%	0,222 $mg.L^{-1}$	Xn : Nocif N : Polluant R : 22-41-50/53 S : 22-26-39-46-60-61
Molybdate de di-Sodium Dihydraté	Na_2MoO_4, $2H_2O$	241,95 $g.mol^{-1}$	Prolabo	99,5%	0,390 $mg.L^{-1}$	- - -
Sulfate de Cuivre Pentahydraté	$CuSO_4$, $5H_2O$	249,68 $g.mol^{-1}$	Prolabo	99,0%	0,079 $mg.L^{-1}$	Xn : Nocif N : Polluant R : 22-36/38-50/53 S : 22-60-61
di-Nitrate de Cobalt Hexahydraté	$Co(NO_3)_2$, $6H_2O$	84,99 $g.mol^{-1}$	Prolabo	98,0%	0,049 $mg.L^{-1}$	O : Comburant ; Xn ; N R : 8-22-40-43-50/53 S : 17-36/37-60-61
Eau	H_2O	18,00 $g.mol^{-1}$	Elga	18 MΩ	QSP 1L	-

La composition du milieu a varié lors de certaines expériences:

D-(+)-Glucose	$C_6H_{12}0_6$	180,16 $g.mol^{-1}$	Sigma	99,5%	0,1 à 1%	- - -
Chlorure d'Ammonium	NH_4Cl	53,49 $g.mol^{-1}$	Prolabo	99,5%	0 à 6 mM	Xn : Nocif R : 22-36 S : 22
Bacto ™Agar 214010	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	n x 306 $g.mol^{-1}$	Becton Dickinson	98,5%	0 à 1 % *(pour faire du milieu solide)*	- - -

2-1-4-1-2- Milieu Luria-Bertani LB pour *E.coli*

Le milieu de culture d'*E.coli* est un milieu prêt à l'emploi disponible directement sur le marché. « Milieu Miller » est un synonyme de « Milieu Luria-Bertani » et de « Lysogeny Broth ».

SUBSTANCE	MARQUE	Contenu	COMPOSITION	PROTOCOLE	RISQUES & SECURITE
Difco™ LB Broth, Miller	Becton Dickinson	Tryptone *(Protéines)*	10 $g.L^{-1}$	Dans 1L d'eau purifiée, suspendre 25g de poudre. Autoclaver à 121°C pendant 15minutes	Xi : Irritant R : 36/37/38 S : 7-22-26-36
		Extrait de Levure	5 $g.L^{-1}$		
		Chlorure de Sodium *(NaCl)*	10 $g.L^{-1}$		
Difco™ LB Agar, Miller	Becton Dickinson	Tryptone *(Protéines)*	10 $g.L^{-1}$	Dans 1L d'eau purifiée, suspendre 40g de poudre. Autoclaver à 121°C pendant 15minutes	Xi : Irritant R : 36/37/38 S : 7-22-24/25-26
		Extrait de Levure	5 $g.L^{-1}$		
		Chlorure de Sodium *(NaCl)*	10 $g.L^{-1}$		
		Agar	15 $g.L^{-1}$		

2-1-4-2- Dosage CAT et Bradford

SUBSTANCE	FORMULE	MASSE MOLECULAIRE	MARQUE	PURETE	RISQUES & SECURITE
Chloramphénicol	$C_{11}H_{12}N_2O_5Cl_2$	323,13 $g.mol^{-1}$	Sigma	98%	- R : 45 S : 53-45
Acétyl CoA	$C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S$	809,57 $g.mol^{-1}$	Pharmacia	93%	R : 23/24/25-36/38-39/23/24/25-66-67 S : 24-36/37-45
Acide 5,5'-DiThiobis-2-NitroBenzoïque « DTNB »	$C_{14}H_8NO_8S_2$	396,40 $g.mol^{-1}$	Sigma	98,0%	Xi : Irritant R : 36/37/38 S : 26-36
Réactif deBradford	$MgSO_4$, $7H_2O$	246,48 $g.mol^{-1}$	Fluka	99,5%	- R : 20/21/22-34-68/20/21/22 S : 26-36/37/39-45

2-1-4-3- Autres produits utilisés

SUBSTANCE	FORMULE	MASSE MOLECULAIRE	MARQUE	PURETE	RISQUES & SECURITE
Ethanol	C_2H_5OH	46,07 $g.mol^{-1}$	Prolabo	99,8%	F : Inflammable R : 11 S : 7-16
Acétone	C_3H_6O	58,08 $g.mol^{-1}$	Merck	99,5%	F : Inflammable

					R : 11 S : 9-16-23-33
Tampon TRIS HCl pH 7,5 à 8	-	-	-	-	- - -
Dioxyde de Carbone solide « Carboglace »	CO_2 (s)	44,00 $g.mol^{-1}$	?	100,0%	-70°C - S : 9
TFD 4 détergent manuel	KOH < 5 %		Franklab S.A.	??,? %	C : Corrosif R : 34 S : 1/2-26- 37/39-45
Glycérol	$C_3H_8O_3$	92,09 $g.mol^{-1}$	Sigma	99,0%	- - -
Chlorure de Magnésium	$MgCl_2$	-	Invitrogen	50 mM	- - -
Buffer 10X PCR – $MgCl_2$	-	-	Invitrogen	10 X	Xi : Irritant R : 36/37/38 S : 26-36
Nucléotides *(dNTPs)*, Acides Nucléiques *(ADN et Oligonucléotides)*	-	-	Fluka	-	- - -

Taq Polymerase,	-	-	Invitrogen	-	Xi : Irritant R : 36/37/38 S : 26-36
Ligase T4	*(E.coli)*	-	Promega	-	- - -
SmaI (enzyme de restriction)	*(Serratia marcescens)*	5'-CCC|GGG-3'	BioLabs	-	- - -
pGemT	-	-	Promega	-	-
pSB2A	-	-	Maraccini *et al.*	-	-

Phrases Risques & Sécurité

RISQUES	
R 1	Explosif à l'état sec
R 8	Favorise l'inflammation des matières combustibles
R 11	Facilement inflammable
R 22	Nocif en cas d'ingestion
R 34	Provoque des brûlures
R 36	Irritant pour les yeux
R 37/38	Irritant pour les voies respiratoires et la peau
R 36/37/38	Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau
R 40	Effet cancérogène suspecté : preuves insuffisantes
R 41	Risque de lésions oculaires graves
R 43	Peut entrainer une sensibilisation par contact avec la peau
R 50/53	Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entrainer des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique
R 52	Nocif pour les organismes aquatiques

SECURITE	
S 1/2	Conserver sous clé et hors de portée des enfants
S 7	Conserver le récipient bien fermé
S 9	Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé
S 16	Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer
S 17	Tenir à l'écart des matières combustibles
S 22	Ne pas respirer les poussières
S 23	Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols (terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabriquant)
S 24	Eviter le contact avec la peau
S 24/25	Eviter le contact avec la peau et les yeux
S 26	En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement avec de l'eau et consulter un ophtalmologiste
S 33	Eviter l'accumulation de charges électrostatiques
S 36	Porter un vêtement de protection approprié
S 36/37	Porter un vêtement de protection et des gants appropriés
S 37/39	Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux et/ou du visage
S 39	Porter un appareil de protection des yeux/du visage approprié
S 41	En cas d'incendie et/ou d'explosion, ne pas respirer les fumées
S 45	En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette
S 46	En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette
S 52	Ne pas utiliser sur de grandes surfaces dans les locaux habités
S 60	Eliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux
S 61	Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité

2-2- Biologie Moléculaire

2-2-1- PCR

Cette technique permet, au moyen d'oligonucléotides spécifiques et d'un thermocycleur, d'amplifier une séquence ADN recherchée. Cette technique est basée sur les propriétés de l'ADN de se dénaturer et de se renaturer à des températures spécifiques. Une fois dénaturé, le brin d'ADN s'hybride aux oligonucléotides judicieusement choisis et les polymérases vont amplifier la séquence contenue entre les 2 oligonucléotides. En répétant ces cycles, ont amplifie de manière exponentielle l'ADN originel (n cycles donneront 2^n fragments d'ADN)

Dans le cadre de mon projet, j'ai utilisé cette technique pour :

- préparer les cassettes de délétion qui ont permis de supprimer les gènes *abrB1 (sll0359), abrB2 (sll0822)* et réintroduire les allèles mutants d'*abrB2* dans la souche ΔabrB2::Km^r.
- contrôler les insertions de modifications génétiques chez *E.coli*.
- contrôler les insertions et ségrégation de gènes chez *Synechocystis*.

Les enzymes utilisées pour réaliser les PCR :

Qualité	Référence	Organisme d'isolation
« Standard »	Taq (Invitrogen)	*Thermus aquaticus*
Haute fidélité	Pfu (Promega)	*Pyrococcus furiosus*
	Pfx (Invitrogen)	Polymérase d'Archée
Très haute fidélité Haute rapidité Haute efficacité	Phusion®(NEB)	*Pyrococcus*-like ingéniérée

2-2-2- Electrophorèse

Cette technique est complémentaire de la précédente, elle permet de visualiser les fragments d'ADN synthétisés par la PCR. Elle consiste en un gel d'agarose additivé de Bromure d'Ethidium (intercalant des acides nucléiques et composé fluorescent), ce gel est ensuite placé dans un bac de tampon Tris mis sous tension électrique (120V en général) qui va permettre de faire migrer les molécules selon leur taille au sein du gel, les molécules les plus courtes migrant plus facilement que les longues. Cette séparation des différents brins permet différentes exploitations :

- visualiser qualitativement sous UV les différents brins amplifiés. Grâce à un marqueur connu de poids moléculaires et en établissant une courbe étalon, on peut déduire la taille de ces brins selon la loi :

  migration = f (log du poids moléculaire)

  Plus qualitativement, suite à la présence de telle ou telle bande, on peut juger du succès de telle ou telle manipulation.
- visualiser les bandes d'ADN séparées par la migration sous UV pour pouvoir les découper directement sur le gel et pouvoir les extraire par la suite. Cela permet de récupérer une taille donnée (et donc une séquence spécifique, souvent un gène et ses séquence flanquantes) à partir d'un mélange de fragments d'ADN.

2-2-3- Extraction et purification d'ADN

L'ADN contenu dans les petits rectangles de gel découpés après l'électrophorèse n'est pas utilisable directement, il faut d'abord l'extraire de la maille moléculaire du gel d'agarose puis le nettoyer pour le stocker.

Ces différentes étapes se font à l'aide du Kit *NucleoSpin Plasmid QuickPure©* de Macherey Nagel ou *PCR extract* de Qiagen. Il consiste à fondre le gel dans un solvant spécial, puis de fixer l'ADN sur une colonne, de rincer cet ADN plusieurs fois avec diverses solutions alcooliques, puis de le dissoudre dans du Tris HCl 10mM, pH 7,5, EDTA 0,1mM ou de l'H_2O pure.

2-2-4- Ligation de l'ADN

Cette technique permet de solidariser une séquence d'ADN à une autre pour peu que les jonctions soient judicieusement choisies. A savoir des sites de restrictions communs par exemple.

L'enzyme utilisé à cet effet est une ligase que l'on laisse agir pendant quelques heures dans une solution aqueuse et équimolaire des 2 séquences ADN choisies.

La ligase T4 Invitrogen a été la plus souvent utilisée, à température ambiante et sur la nuit.

2-2-5- Mesure de la concentration d'ADN

Cette étape se fait à l'aide d'un *Nanodrop* qui permet de connaître la concentration en acide nucléique d'une solution (ARN ou ADN). Cette mesure ne nécessite que 2µL de solution et est nécessaire pour analyser les solutions d'ADN obtenues après extraction et purification. La mesure même se fait en prenant la DO à 260nm, une unité de DO correspondant à 50 $\mu g.ml^{-1}$. Le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} permet de déterminer la pureté de la préparation ; il doit être proche de 1,8 pour une solution d'ADN.

2-3- Manipulations bactériennes

2-3-1- Cultures d'*E.coli*

2-3-1-1- Souches utilisées

3 souches aux génotypes différents ont été manipulées au cours du stage :

Souche	Génotype	Temps de Génération	Plasmide	Source
HB 101	F^-, hsdS 20(rB^-, mB^-), *supE*44, *recA*13, *ara*14, *gal* K2, *lac*Y1, *pro*A2, *rps*L20 (Sm^R), *xyl*-5, *mtl*-1, '{*mcr*C-*mrr*}	30 min	néant	GIBCO-BRL
CM 404	F^-, hsdS 20(rB^-, mB^-), *supE*44, *recA*13, *ara*14, *gal* K2, *lac*Y1, *pro*A2, *rps*L20 (Sm^R), *xyl*-5, *mtl*-1, '{*mcr*C-*mrr*}	30 min	pRK2013 (Km^r)	*Marracini et al.*, 1993
TOP 10	{F^- mcrA (mrr^- $hsdRMS^-$ mcrBC) 80*lac*ZM15 *lac*X74 *recA*1 *ara*139 (ara-leu)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) endA1 nupG}	30 min	néant	Invitrogen

2-3-1-2- Culture Liquide

Cette culture s'effectue dans un Erlenmeyer fermé ou un tube Falcon. Un petit échantillon *d'Escherichia coli* est placé dans le milieu de culture approprié (travail sous hotte stérile) Luria-Bertani (LB) (***Sambrook, Fritsch et al.* 1989**) contenant ou non un antibiotique selon besoin.

La souche HB 101 se cultive à 37°C.

La souche CM 404 se cultive à 30°C car la réplication du plasmide incP(pRK2013) est thermosensible.

Les Erlenmeyer sont placés dans les incubateurs rotatifs adéquats à environ 180 rpm.

2-3-1-3- Culture Solide

Les cultures solides se font en rajoutant de l'Agar (Difco) au milieu LB (1,5% en masse).

2-3-1-4- Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés concernant *E.coli* sont :

Antibiotique	Symbole	Concentration utilisées
Kanamycine	Km	50 µg/mL
Ampicilline	Amp	100 µg/mL
Streptomycine	Sm	25 µg/mL
Spectinomycine	Sp	75 µg/mL

2-3-2- Cultures de *Synechocystis* sp. PCC6803

2-3-2-1- Souches utilisées

Voici quelques caractéristiques de la souche sauvage de *Synechocystis* sp. PCC6803:

Souche	Génotype	Temps de Génération	Plasmide rajouté	Source
Sauvage (WT)	Génotype sauvage	10 à 12h	néant	Institut Pasteur Paris

2-3-2-2- Culture liquide

Cette culture se fait dans un Erlenmeyer de 50 ou 25 mL fermé avec un bouchon de gaze laissant passer les gaz nécessaires à la croissance de la cyanobactérie et contenant du milieu minéral (MM) BG-11 (Rippka et al. 1979). Composition voir p252-253.

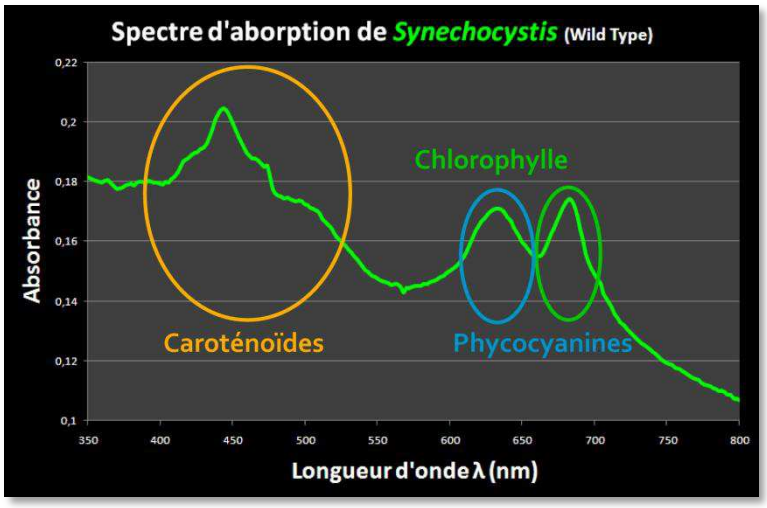
La souche sauvage se cultive, en conditions standards, à 30°C dans un agitateur orbital à rampes lumineuses blanches. L'intensité lumineuse standard est fixée à 2500 lux et est mesurée à l'aide du Luxmètre (Chauvin-Arnoux).

2-3-2-3- Culture solide

Les conditions de culture standard en milieu solide se font en rajoutant 10 g/L de Bacto Agar (Difco) à 1 litre de milieu MM (soit 1% en masse).

L'incubation se fait également à 30°C, dans une pièce aménagée à cet effet et contenant diverses rampes de néons blancs d'intensités lumineuses variables.

2-3-2-4- Contrôle de la concentration cellulaire



On peut observer la croissance cellulaire par contrôle de la turbidité (assimilée à la Densité Optique (DO)) de la solution. Cette mesure s'effectue au minimum d'absorption d'une solution de *Synechocystis* soit : **580 nm**. Les longueurs d'ondes où l'absorbance est maximale ne sont pas utilisables car elles traduisent les concentrations en pigment de la cyanobactérie (il y en a 3 : les caroténoïdes, les phycocyanines et les chlorophylles), ces concentrations ne sont pas identiques d'un mutant à un autre et peuvent dépendre du milieu de culture. 580nm s'avère un des seuls endroits où il n'y a pas de pigments colorés et où **la mesure de l'absorbance traduit vraiment la concentration en bactéries indépendamment de ses pigments**. La relation entre la DO et la concentration cellulaire a été déterminée par le laboratoire et une **DO_{580} de 0,5-0,6** équivaut à environ **5.10^7 cellules/mL**.

2-3-2-5- Croissance

Une culture de *Synechocystis* se distingue en plusieurs phases : une phase de croissance exponentielle où *Synechocystis* se divise symétriquement (log phase), une phase de ralentissement et une phase stationnaire lorsque les bactéries cessent de se diviser. Lorsqu'une culture arrive à une concentration équivalente à DO = 0,5-0,6 elle se trouve alors en phase exponentielle de sa croissance et la plupart des manipulations sont effectuées à

ce stade. Cependant, il a été observé que la culture devait avoir déjà été repiquée au moins 2 fois auparavant pour avoir une bonne répétabilité des manipulations.

Il faut donc, avant d'effectuer des mesures à partir de *Synechocystis* vieilles ou solides, les cultiver jusqu'à DO=0,6, les repiquer une première fois puis une deuxième fois de la même manière, avant d'avoir une culture optimale. Ainsi, considérant le temps de génération de 10-12h, les préparations des cultures durent fréquemment quelques semaines avant de pouvoir réaliser une expérience.

2-3-2-6- Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés concernant *Synechocystis* sont :

Antibiotique	Symbole	Concentration utilisées
Kanamycine	Km	De 25 à 300 µg/mL
Streptomycine	Sm	2,5 à 5 µg/mL
Spectinomycine	Sp	2,5 à 5 µg/mL
Gentamycine	Gm	5 µg/mL

2-3-3- Introduction de plasmide par transformation chez *E.coli*

Cette technique consiste à fragiliser la paroi cellulaire d'*E.coli* pour qu'un plasmide puisse pénétrer à l'intérieur de l'organisme. Les *E.coli* compétentes sont préparées selon le protocole décrit par V.Simanis utilisant du RbCl (D.Hanahan *1985*)

La transformation peut se faire par électroporation (perforation de la paroi cellulaire grâce à un champ électrique) mais le laboratoire utilise préférentiellement la technique du choc thermique :

Le choc thermique se fait en maintenant les *E.coli* dans leur milieu compétent avec les plasmides à transformer à 0°C (bain de glace) pendant 20 minutes au moins (les plasmides se placent alors à proximité des trous dans la paroi de *E.coli*). On plonge ensuite rapidement le récipient dans un bain à 42°C pendant 90 secondes, les plasmides vont pénétrer dans l'organisme suite à la dilatation spontanée de la paroi cellulaire. Passées les 90 secondes, on replonge immédiatement le récipient dans la glace pour refermer les pores. Les *E.coli* sont alors mises à incuber à 37°C pendant 1 heure dans 5 mL de LB frais.

Ensuite 200 µL de la culture sont étalés sur des boîtes à antibiotiques (le plasmide est supposé contenir un antibiotique) afin de sélectionner les *E.coli* qui ont effectivement intégré le plasmide. La boite est alors mise à incuber une nuit et des colonies vont apparaitre.

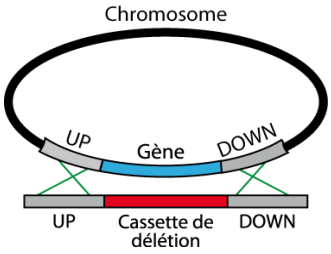
L'efficacité de l'opération dépend grandement de la qualité de préparation des *E.coli* compétentes et de la maîtrise du protocole de transformation. On peut espérer une petite dizaine de colonies avec le plasmide sur la boîte finale.

2-3-4- Transformation et inactivation de gènes chez *Synechocystis* sp. PCC6803

2-3-4-1- Recombinaison homologue naturelle

La recombinaison homologue est un phénomène naturel chez *Synechocystis*. La cyanobactérie accepte naturellement dans son organisme des morceaux complets d'ADN et peut alors les intégrer à son génome. La séquence ADN doit posséder une certaine corrélation avec les séquences chromosomiques de *Synechocystis*. Cette propriété a sans doute constitué un avantage évolutif pour *Synechocystis* et elle permet à l'expérimentateur, en choisissant judicieusement une séquence ADN, d'inactiver un gène.

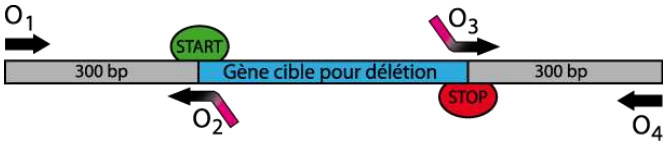
2-3-4-2- Construction de la cassette de délétion



Pour inactiver un gène (dans toute la suite on prend l'exemple du gène *abrB1* que j'ai essayé de déléter lors de mon stage de fin d'étude), l'expérimentateur doit construire une cassette de délétion, elle est constituée de 2 séquences identiques à celle de l'ADN cyanobactérien (baptisées dans mon travail « Up » et « Down ») entre lesquelles se trouve la séquence de délétion que l'on va insérer entre les 2 séquences du chromosome initial (il s'agit en général un gène de résistance à un antibiotique).

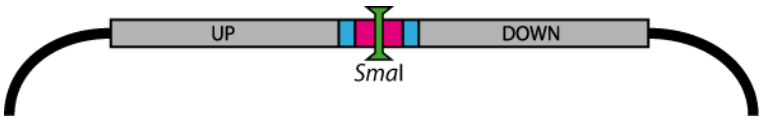
La construction de la cassette de délétion consiste à amplifier par PCR les 2 zones du chromosome de *Synechocystis* entre lesquelles se trouve la séquence que l'on désire effacer. Pour cela une connaissance du séquençage est requise pour choisir les 4 amorces ADN.

Etape 1 : Les oligomères O1 et O4 sont directement issus de la séquence chromosomique, O2 et O3 s'apparient eux aussi avec la séquence chromosomique (éventuellement pouvant se chevaucher un peu avec les extrémités du gène), mais ils comportent également une autre partie (en rose sur le schéma) qui va permettre aux 2 fragments générés dans cette étape de s'apparier à l'étape suivante.

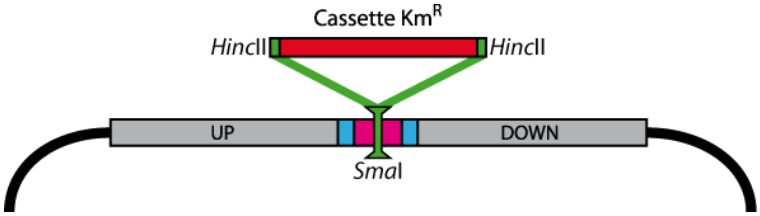


Etape 2 : On assemble par PCR les 2 fragments résultants de l'étape 1. Les oligomères O1 et O4 permettent d'amplifier facilement la matrice créée par appariement de la zone en rose. Cette zone contient par ailleurs un site de restriction SmaI indispensable pour la suite.

Etape 3 : On clone cette séquence ADN dans un plasmide pGEMt par la méthode T/A. pGEMt est un plasmide ouvert contenant un nucléotide « T » à ses extrémités. La PCR a permis de synthétiser notre morceau d'ADN avec le nucléotide complémentaire « A » à chaque extrémité. Les 2 produits vont donc naturellement s'apparier (dans un sens ou dans l'autre) et en faisant intervenir une ligase, le plasmide se refermera définitivement. Pour amplifier le plasmide, on le transforme vers E.coli et la cultive avant d'extraire le plasmide avec le kit *NucleoSpin Plasmid QuickPure©*.



Etape 4 : Le plasmide est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *Sma*I (site à bords nets), la cassette de résistance à l'antibiotique est également à bord nets, et une ligase permet de souder les 2 segments d'ADN et de former le plasmide final.



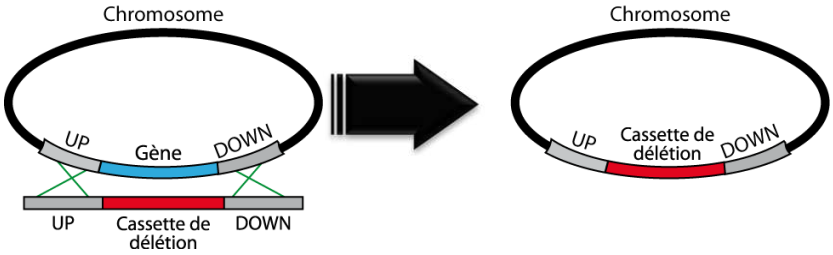
2-3-4-3- Transformation

On désire insérer le plasmide nouvellement créé dans *Synechocystis*. Les cellules cyanobactériennes sont maintenues en phase exponentielle à 2500 lux (ne dépassant pas une DO_{580} de 0,7). Au troisième repiquage, 50 ml de culture sont centrifugés (10 mn à 5000 rpm) et lavés avec 10 ml de milieu minéral MM. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 10 ml de milieu MM. 1 µg d'ADN dilué dans 100 µl d'H_2O est mélangé avec 1 ml de suspension cellulaire et incubé à 2500 lux et à 30°C, sans agitation, pendant 1h30.

On dépose ensuite la solution sur des boîtes de milieu MM solide (1% d'Agar) et laisse incuber une nuit (20-24h) à 2500 lux et 30°C. Les plasmides sont dorénavant introduits au sein de *Synechocystis*.

2-3-4-4- Recombinaison homologue

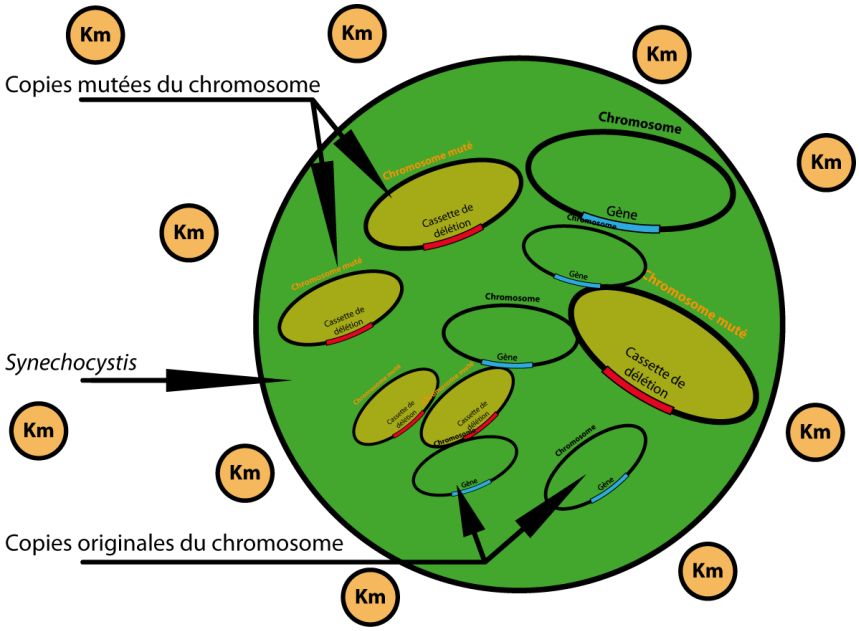
Cette étape est un phénomène naturel, lorsque 2 séquences ADN sont similaires, les nucléotides sont susceptibles de s'échanger. Le phénomène est notamment à l'origine du brassage génétique lors de la méiose : le crossing-over.



Après la première nuit d'incubation, on soulève le gel solide de MM pour couler une solution d'antibiotique faiblement concentrée (50 µg.L^{-1} pour Km) dessous afin qu'il diffuse lentement à travers le gel. Les cyanobactéries subiront ainsi un gradient de concentration d'antibiotique qui va grandement favoriser la recombinaison homologue (le gène de délétion est sensément le gène de résistance à l'antibiotique en présence). Les boîtes sont laissées à incuber pendant 5 à 9 jours sous 2500 lux et 30°C, le temps que des colonies spot de transformants apparaissent.

NB : la réplication du plasmide n'est pas possible, cela favorise d'autant la recombinaison homologue car c'est pour *Synechocystis* le seul moyen de transmettre la résistance à l'antibiotique à ses cellules filles.

2-3-4-5- Culture sur boîte antibiotique, augmentation de la pression de sélection



Dans le cas d'un gène à déléter important, la ségrégation totale n'est absolument pas garantie voire défavorable.

Augmenter la pression de sélection (la concentration en antibiotique) permet de rendre plus essentielles encore les copies de chromosomes portant le gène de résistance, mais cela peut très bien ne toujours pas suffire à ségréger complètement le gène originel.

Il est fréquent de se retrouver à ce stade avec des mutants comportant des proportions variées des 2 types de chromosomes : les rapports 50-50, 10-90 et 90-10 sont en effet très courants.

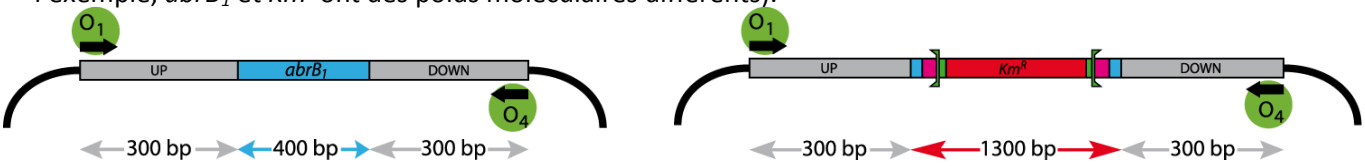
NB : Dans certains cas, le génotype mutant peut-être fortement handicapant pour la cellule dans les conditions standard, entrainant ainsi de grandes difficultés de ségrégation totale. On essaie alors d'imaginer des conditions de culture qui rendraient le gène moins essentiel et donc plus facile à déléter.

C'est par exemple le cas lorsqu'on tente d'effacer un gène qui a un lien avec la photosynthèse. On essaie alors de cultiver *Synechocystis* dans des conditions qui s'affranchissent de la photosynthèse : à savoir une faible lumière et une certaine concentration en glucose dans le milieu de culture.

2-3-4-6- Contrôle de la ségrégation par PCR

Quantitativement, il est possible d'observer l'avancée de la ségrégation du gène. La ségrégation s'effectue par repiquages successifs sur milieu solide, ainsi des échantillons de *Synechocystis* sont utilisés pour effectuer une PCR avec les oligonucléotides spécifiques des régions flanquantes.

Les amorces O1 et O4 se fixent indifféremment sur les chromosomes mutés et sauvages, les amplifiant chacun sans contrainte. On peut alors observer qualitativement (grâce à l'intensité lumineuse de l'ADN sous UV) les proportions de chaque gène dans la colonie puisque, après PCR, 2 bandes distinctes apparaissent (dans l'exemple, $abrB_1$ et Km^r ont des poids moléculaires différents).



2-3-4-7- Conjugaison des plasmides pSB2A et pFC1 dans *Synechocystis*

2-4- Analyse des phénotypes de *Synechocystis* sauvages et mutés

2-4-1- Séquençage ADN

Pour le séquençage ADN, nous utilisons les compétences d'un autre laboratoire du CEA, qui nous a confié le protocole de préparation des échantillons.

Les réactions de séquence ont été réalisées en suivant le protocole de séquence par fluorescence avec terminateur Big-Dye® (Perkin Elmer). Les amorces utilisées sont les oligomères des séquences amont et aval déjà utilisés pour construire la cassette de délétion.

2-4-2- Courbes de croissance

Cette technique d'analyse consiste à suivre la DO_{580} de différentes cultures de *Synechocystis* à différents moments de sa croissance.

On démarre la courbe à DO_{580}=0,02 (par exemple), puis on prend des mesures de DO_{580} rapprochées au début, puis plus espacées dans le temps par la suite. Soit 2 par jour pendant la « log phase » ou phase de croissance exponentielle (dure environ une semaine) puis une mesure par jour. On s'arrête lorsque la culture atteint environ 2 semaines car les cellules commencent ensuite à dépérir et la DO_{580} cesse de croître.

2-4-3- Dosage d'activité promotrice par gène rapporteur *cat*

2-4-3-1- Extraction des protéines par pressage à la presse Eaton

Les cellules sont congelées rapidement à -70°C (éthanol + carboglace) et cassées à l'aide d'une presse de Eaton à 250 MPa (6 T). Le lysat est centrifugé 20 min à 15000 rpm à 4°C, le surnageant (contenant les protéines solubles) est aliquoté et conservé à -20°C.

2-4-3-2- Mesure de la [protéines]

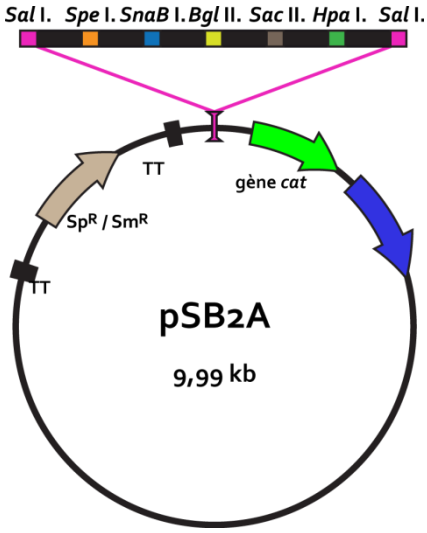
Les dosages ont été réalisés par la technique de Bradford selon les indications du fournisseur (BIORAD). La gamme étalon (10 valeurs) est obtenue en diluant progressivement la solution standard SAB (Sérum Albumine Bovine) de 1 à 10 $\mu g.ml^{-1}$ (concentration finale). Trois mesures par échantillon sont effectuées pour obtenir une mesure fiable de la quantité de protéines dans l'échantillon extrait qui va servir au dosage CAT.

Lorsqu'il s'agissait de protéines purifiées, les mesures ont aussi pu être faites sur le *Nanodrop* en utilisant le ε_r spécifique des protéines purifiées calculé à partir de la séquence peptidique grâce à un software sur internet.

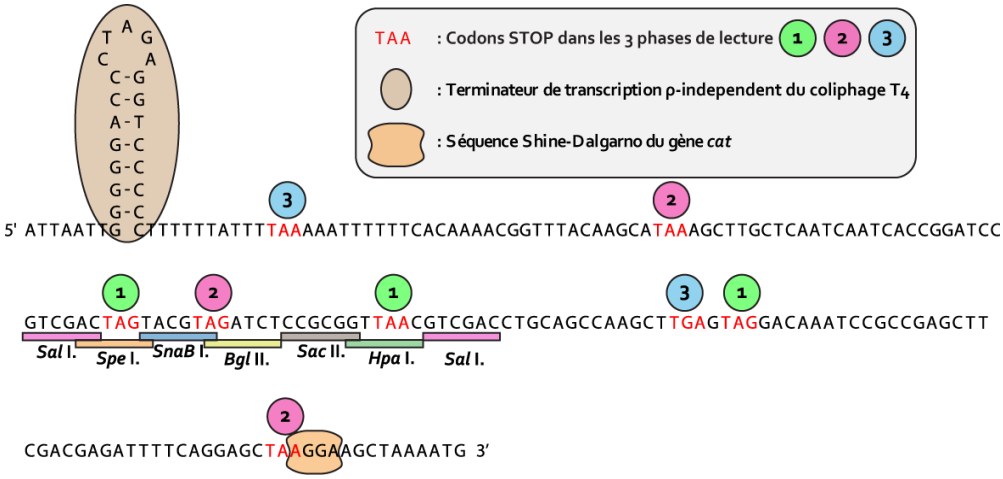
2-4-3-3- Mesure de l'activité *cat (Chloramphénicol Acétyl Transférase)*

Cette technique permet de mesurer l'effet d'un paramètre de culture ou d'une mutation sur l'expression d'un gène grâce au gène rapporteur *cat*.

Le plasmide pSB2A contient le gène de l'enzyme CAT dont l'exacte expression est garantie par des codons Stop (TT) sur les 3 pistes de lecture entre le gène et le promoteur, l'expresion du gène est assurée par l'introduction d'un promoteur d'intérêt dans le multiple cloning site. Ce plasmide se réplique à hauteur de 1 copie par chromosome dans *Synechocystis*, de ce fait il ne perturbe pas sensiblement le nombre de copies des promoteurs étudiés. pSB2A possède des marqueurs antibiotiques Sp/Sm^r ou Km^r selon les besoins.



Lorsqu'un promoteur est cloné dans pSB2A, en amont du gène *cat*, il dirige la synthèse de l'enzyme CAT qui confère aux cellules la résistance au chloramphénicol. La cassette de test des promoteurs contient également un terminateur de transcription en amont, et des codons stop de traduction dans les 3 phases de lecture. Ainsi, l'activité de l'enzyme CAT ne reflète que la force du promoteur analysé.



Le dosage est basé sur le principe suivant :

Acétylation du chloramphénicol par l'enzyme CAT :

Réaction 1 :

$$Chloramphénicol + Acétyl\ S - coA \xrightarrow{CAT} 3\ Acétoxychloramphénicol + H - S - coA$$

Réduction de l'acide 5,5'-**Di**T**h**iobis-2-**N**itro**B**enzoïque (DTNB, dimère par liaison disulfure)

Réaction 2 :

$$DTNB + H - S - coA \rightarrow TNB - S - S - coA + TNB$$

L'acide ThioNitroBenzoïque (TNB) absorbe à 412nm, le suivi de l'activité CAT est donc aisé dès lors qu'on suit l'apparition de ces molécules à 412nm.

Le protocole consiste à effectuer une première cinétique à 412nm d'un mélange de :

- 1mL : DTNB 0,4mg.mL^{-1} + Acétyl CoA 0,1mM + Tris HCl 100mM pH=8 (Blanc d'absorption)
- 5 à 200µL d'extrait protéique.

La première cinétique dure 2 minutes et se fait en absence de chloramphénicol. Le Spectrophotomètre DUB640B va calculer lui-même la pente de cette courbe qui traduit l'activité DTNB-réductase naturelle dans l'extrait protéique.

La deuxième cinétique démarre en rajoutant 25µL de Chloramphénicol. La pente de la nouvelle courbe traduit donc l'activité des enzymes CAT de l'extrait protéique de *Synechocystis,* si on lui soustrait la pente de la première courbe.

Voici la formule permettant de convertir les résultats en activité CAT :

$$Activite\ Specifique = \frac{\Delta pentes\ \times 10^6 \times V_{Tot}}{13{,}6 \times\ V_{Extrait \times [Protéines]}}$$

Où : $\Delta pentes$ = différence des pentes des 2 cinétiques
V_{Tot} = $V_{Réactif} + V_{Extrait} + V_{Chloramphénicol}$
$13{,}6$ = ε_r du TNB à 412nm
$V_{Réactif}$ =1 mL (Tris + DTNB + Acétyl coA)
$V_{Chloramphénicol}$ =25 µL
$V_{Extrait}$ = volume d'extrait protéique (5 à 200 µL)
$[Protéines]$ =concentration en protéines de l'extrait mesurée par Bradford

L'activité spécifique s'exprime en : $nmol.min^{-1}.mg_{protéines}^{-1}$

2-4-4- Conservation des souches de *Synechocystis*

On emmène la culture qui nous intéresse à une DO_{580} d'environ 2 (avec les antibiotiques appropriés) puis on la congèle dans l'azote liquide avec 5% de DMSO.

L'étiquetage doit être intelligible pour tous et un logiciel permet de gérer la souchotèque. On y rentre les noms, caractéristiques et codes de stockage de chaque nouvelle souche.

REFERENCES

1. **Abella M, Campoy S, Erill I, Rojo F, Barbe J.** 2007. Cohabitation of two different lexA regulons in Pseudomonas putida. J Bacteriol **189:**8855-8862.
2. **Abou Hamdan A, Liebgott PP, Fourmond V, Gutierrez-Sanz O, De Lacey AL, Infossi P, Rousset M, Dementin S, Leger C.** 2012. Relation between anaerobic inactivation and oxygen tolerance in a large series of NiFe hydrogenase mutants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109:**19916-19921.
3. **Adams MW, Mortenson LE, Chen JS.** 1980. Hydrogenase. Biochim Biophys Acta **594:**105-176.
4. **Agervald A, Baebprasert W, Zhang XH, Incharoensakdi A, Lindblad P, Stensjo K.** 2010. The CyAbrB transcription factor CalA regulates the iron superoxide dismutase in Nostoc sp strain PCC 7120. Environmental Microbiology **12:**2826-2837.
5. **Agervald A, Zhang XH, Stensjo K, Devine E, Lindblad P.** 2010. CalA, a Cyanobacterial AbrB Protein, Interacts with the Upstream Region of hypC and Acts as a Repressor of Its Transcription in the Cyanobacterium Nostoc sp Strain PCC 7120. Applied and Environmental Microbiology **76:**880-890.
6. **Akhmanova A, Voncken F, van Alen T, van Hoek A, Boxma B, Vogels G, Veenhuis M, Hackstein JH.** 1998. A hydrogenosome with a genome. Nature **396:**527-528.
7. **Albracht SP, Graf EG, Thauer RK.** 1982. The EPR properties of nickel in hydrogenase from Methanobacterium. FEBS Lett **140:**311-313.
8. **Allahverdiyeva Y, Leino H, Saari L, Fewer DP, Shunmugam S, Sivonen K, Aro EM.** 2010. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. International Journal of Hydrogen Energy **35:**1117-1127.
9. **Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Thavasi V, Zharmukhamedov SK, Klimov VV, Nagata T, Nishihara H, Ramakrishna S.** 2009. Hydrogen photoproduction by use of photosynthetic organisms and biomimetic systems. Photochem Photobiol Sci **8:**148-156.
10. **Alva V, Dunin-Horkawicz S, Habeck M, Coles M, Lupas AN.** 2009. The GD box: A widespread noncontiguous supersecondary structural element. Protein Science **18:**1961-1966.
11. **Ananyev G, Carrieri D, Dismukes GC.** 2008. Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium "Arthrospira (Spirulina) maxima". Appl Environ Microbiol **74:**6102-6113.
12. **Appel J, Phunpruch S, Steinmuller K, Schulz R.** 2000. The bidirectional hydrogenase of Synechocystis sp PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. Archives of Microbiology **173:**333-338.
13. **Appel J, Schulz R.** 1996. Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). Biochim Biophys Acta **1298:**141-147.
14. **Arteni AA, Ajlani G, Boekema EJ.** 2009. Structural organisation of phycobilisomes from Synechocystis sp strain PCC6803 and their interaction with the membrane. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1787:**272-279.
15. **Au N, Kuester-Schoeck E, Mandava V, Bothwell LE, Canny SP, Chachu K, Colavito SA, Fuller SN, Groban ES, Hensley LA, O'Brien TC, Shah A, Tierney JT, Tomm LL, O'Gara TM, Goranov AI, Grossman AD, Lovett CM.** 2005. Genetic composition of the Bacillus subtilis SOS system. J Bacteriol **187:**7655-7666.
16. **Baniulis D, Yamashita E, Whitelegge JP, Zatsman AI, Hendrich MP, Hasan SS, Ryan CM, Cramer WA.** 2009. Structure-Function, Stability, and Chemical Modification of the Cyanobacterial Cytochrome b(6)f Complex from Nostoc sp PCC 7120. Journal of Biological Chemistry **284:**9861-9869.
17. **Barnosky AD, Hadly EA, Bascompte J, Berlow EL, Brown JH, Fortelius M, Getz WM, Harte J, Hastings A, Marquet PA, Martinez ND, Mooers A, Roopnarine P, Vermeij G, Williams JW, Gillespie R, Kitzes J, Marshall C, Matzke N, Mindell DP, Revilla E, Smith AB.** 2012. Approaching a state shift in Earth's biosphere. Nature **486:**52-58.
18. **Ben-Shem A, Frolow F, Nelson N.** 2003. Crystal structure of plant photosystem I. Nature **426:**630-635.
19. **Benemann J.** 1996. Hydrogen biotechnology: Progress and prospects. Nature Biotechnology **14:**1101-1103.
20. **Bhattacharya D, Archibald JM, Weber AP, Reyes-Prieto A.** 2007. How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. Bioessays **29:**1239-1246.
21. **Bhaya D, Watanabe N, Ogawa T, Grossman AR.** 1999. The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96:**3188-3193.
22. **Bhaya D, Watanabe N, Ogawa T, Grossman AR.** 1999. The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96:**3188-3193.

23. **Bobay BG, Andreeva A, Mueller GA, Cavanagh J, Murzin AG.** 2005. Revised structure of the AbrB N-terminal domain unifies a diverse superfamily of putative DNA-binding proteins. FEBS Letters **579:**5669-5674.

24. **Bobay BG, Mueller GA, Thompson RJ, Murzin AG, Venters RA, Strauch MA, Cavanagh J.** 2006. NMR structure of AbhN and comparison with AbrBN - First insights into the DNA binding promiscuity and specificity of AbrB-like transition state regulator proteins. Journal of Biological Chemistry **281:**21399-21409.

25. **Boggild A, Sofos N, Andersen KR, Feddersen A, Easter AD, Passmore LA, Brodersen DE.** 2012. The Crystal Structure of the Intact E. coli RelBE Toxin-Antitoxin Complex Provides the Structural Basis for Conditional Cooperativity. Structure **20:**1641-1648.

26. **Bothe H, Winkelmann S, Boison G.** 2008. Maximizing hydrogen production by cyanobacteria. Z Naturforsch C **63:**226-232.

27. **Bryant DA.** 1982. PHYCOERYTHROCYANIN AND PHYCOERYTHRIN - PROPERTIES AND OCCURRENCE IN CYANOBACTERIA. Journal of General Microbiology **128:**835-844.

28. **Buhrke T, Lenz O, Porthun A, Friedrich B.** 2004. The H-2-sensing complex of Ralstonia eutropha: interaction between a regulatory NiFe hydrogenase and a histidine protein kinase. Molecular Microbiology **51:**1677-1689.

29. **Burnap RL, Troyan T, Sherman LA.** 1993. THE HIGHLY ABUNDANT CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEX OF IRON-DEFICIENT SYNECHOCOCCUS SP PCC7942 (CP43) IS ENCODED BY THE ISIA GENE. Plant Physiology **103:**893-902.

30. **Busch A, Friedrich B, Cramm R.** 2002. Characterization of the norB gene, encoding nitric oxide reductase, in the nondenitrifying cyanobacterium Synechocystis sp strain PCC6803. Applied and Environmental Microbiology **68:**668-672.

31. **Butala M, Zgur-Bertok D, Busby SJW.** 2009. The bacterial LexA transcriptional repressor. Cellular and Molecular Life Sciences **66:**82-93.

32. **Carrieri D, McNeely K, De Roo AC, Bennette N, Pelczer I, Dismukes GC.** 2009. Identification and quantification of water-soluble metabolites by cryoprobe-assisted nuclear magnetic resonance spectroscopy applied to microbial fermentation. Magn Reson Chem **47 Suppl 1:**S138-146.

33. **Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu JP, Maness PC.** 2011. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. Bioresource Technology **102:**8368-8377.

34. **Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2002. Cyanobacteria : living fossils for biotechnology, p. 33-44, Recent Res. Devel. Mol. Microbiol.

35. **Chan KH, Lee KM, Wong KB.** 2012. Interaction between Hydrogenase Maturation Factors HypA and HypB Is Required for NiFe -Hydrogenase Maturation. Plos One **7:**8.

36. **Chauvat F, Devries L, Vanderende A, Vanarkel GA.** 1986. A HOST-VECTOR SYSTEM FOR GENE CLONING IN THE CYANOBACTERIUM SYNECHOCYSTIS PCC 6803. Molecular & General Genetics **204:**185-191.

37. **Chen JS, Mortenson LE, Palmer G.** 1976. The iron-sulfur centers and the function of hydrogenase from Clostridium pasteurianum. Adv Exp Med Biol **74:**68-82.

38. **Chumsakul O, Takahashi H, Oshima T, Hishimoto T, Kanaya S, Ogasawara N, Ishikawa S.** 2011. Genome-wide binding profiles of the Bacillus subtilis transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. Nucleic Acids Research **39:**414-428.

39. **Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P.** 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. Science **311:**1283-1287.

40. **Cirz RT, Jones MB, Gingles NA, Minogue TD, Jarrahi B, Peterson SN, Romesberg FE.** 2007. Complete and SOS-mediated response of Staphylococcus aureus to the antibiotic ciprofloxacin. J Bacteriol **189:**531-539.

41. **Cirz RT, O'Neill BM, Hammond JA, Head SR, Romesberg FE.** 2006. Defining the Pseudomonas aeruginosa SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. J Bacteriol **188:**7101-7110.

42. **Coles M, Djuranovic S, Soding J, Frickey T, Koretke K, Truffault V, Martin J, Lupas AN.** 2005. AbrB-like transcription factors assume a swapped hairpin fold that is evolutionarily related to double-psi beta barrels. Structure **13:**919-928.

43. **Cooley JW, Vermaas WF.** 2001. Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of Synechocystis sp. strain PCC 6803: capacity comparisons and physiological function. J Bacteriol **183:**4251-4258.

44. **Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt PC.** 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient Escherichia coli. Genetics **158:**41-64.

45. **Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM.** 2004. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of Synechocystis sp strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. Journal of Bacteriology **186:**1737-1746.

46. **Czech I, Stripp S, Sanganas O, Leidel N, Happe T, Haumann M.** 2011. The [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF

contains a H-cluster like [4Fe4S]-2Fe site. FEBS Lett **585:**225-230.

47. **de Vries YP, Hornstra LM, de Vos WM, Abee T.** 2004. Growth and sporulation of Bacillus cereus ATCC 14579 under defined conditions: Temporal expression of genes for key sigma factors. Applied and Environmental Microbiology **70:**2514-2519.
48. **Debus RJ, Barry BA, Sithole I, Babcock GT, McIntosh L.** 1988. Directed mutagenesis indicates that the donor to P+680 in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. Biochemistry **27:**9071-9074.
49. **Dienemann C, Boggild A, Winther KS, Gerdes K, Brodersen DE.** 2011. Crystal Structure of the VapBC Toxin-Antitoxin Complex from Shigella flexneri Reveals a Hetero-Octameric DNA-Binding Assembly. Journal of Molecular Biology **414:**713-722.
50. **Dismukes GC.** 2001. Photosynthesis. Splitting water. Science **292:**447-448.
51. **Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV, Kozlov YN, DasGupta J, Tyryshkin A.** 2001. The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**2170-2175.
52. **Domain F, Houot L, Chauvat F, Cassier-Chauvat C.** 2004. Function and regulation of the cyanobacterial genes lexA, recA and ruvB: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. Molecular Microbiology **53:**65-80.
53. **Ducat DC, Way JC, Silver PA.** 2011. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. Trends Biotechnol **29:**95-103.
54. **Dutheil J, Saenkham P, Sakr S, Leplat C, Ortega-Ramos M, Bottin H, Cournac L, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2012. The AbrB2 Autorepressor, Expressed from an Atypical Promoter, Represses the Hydrogenase Operon To Regulate Hydrogen Production in Synechocystis Strain PCC6803. Journal of Bacteriology **194:**5423-5433.
55. **Dzelzkalns VA, Bogorad L.** 1988. Molecular analysis of a mutant defective in photosynthetic oxygen evolution and isolation of a complementing clone by a novel screening procedure. Embo j **7:**333-338.
56. **Eroglu E, Melis A.** 2011. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. Bioresource Technology **102:**8403-8413.
57. **Ferino F, Chauvat F.** 1989. A PROMOTER-PROBE VECTOR-HOST SYSTEM FOR THE CYANOBACTERIUM, SYNECHOCYSTIS PCC6803. Gene **84:**257-266.
58. **Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S.** 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. Science **303:**1831-1838.
59. **Figge RM, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, Cerff R.** 2000. The carbon metabolism-controlled Synechocystis gap2 gene harbours a conserved enhancer element and a Gram-positive-like-16 promoter box retained in some chloroplast genes. Molecular Microbiology **36:**44-54.
60. **Figge RM, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, Cerff R.** 2001. Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. Molecular Microbiology **39:**455-468.
61. **Fish A, Danieli T, Ohad I, Nechushtai R, Livnah O.** 2005. Structural basis for the thermostability of ferredoxin from the cyanobacterium Mastigrocladus laminosus. Journal of Molecular Biology **350:**599-608.
62. **Freigang J, Diederichs K, Schafer KP, Welte W, Paul R.** 2002. Crystal structure of oxidized flavodoxin, an essential protein in Helicobacter pylori. Protein Science **11:**253-261.
63. **Fritsch J, Scheerer P, Frielingsdorf S, Kroschinsky S, Friedrich B, Lenz O, Spahn CMT.** 2011. The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. Nature **479:**249-U134.
64. **Furnkranz M, Wanek W, Richter A, Abell G, Rasche F, Sessitsch A.** 2008. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. Isme j **2:**561-570.
65. **Gao X, Zhang N, Wei TD, Su HN, Xie BB, Dong CC, Zhang XY, Chen XL, Zhou BC, Wang ZX, Wu JW, Zhang YZ.** 2011. Crystal structure of the N-terminal domain of linker L(R) and the assembly of cyanobacterial phycobilisome rods. Mol Microbiol **82:**698-705.
66. **George J, Devoret R, Radman M.** 1974. Indirect ultraviolet-reactivation of phage lambda. Proc Natl Acad Sci U S A **71:**144-147.
67. **Ghirardi ML, Mohanty P.** 2010. Oxygenic hydrogen photoproduction - current status of the technology. Current Science **98:**499-507.
68. **Ghirardi ML, Posewitz MC, Maness PC, Dubini A, Yu JP, Seibert M.** 2007. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms, p. 71-91, Annual Review of Plant Biology, vol. 58. Annual Reviews, Palo Alto.
69. **Goranov AI, Kuester-Schoeck E, Wang JD, Grossman AD.** 2006. Characterization of the global transcriptional responses to different types of DNA damage and disruption of replication in Bacillus subtilis. J Bacteriol **188:**5595-5605.

70. **Goranov AI, Kuester-Schoeck E, Wang JD, Grossman AD.** 2006. Characterization of the global transcriptional responses to different types of DNA damage and disruption of replication in Bacillus subtilis. J Bacteriol **188:**5595-5605.

71. **Grigorieva G, Shestakov S.** 1982. Transformation in the cyanobacterium Synechocystis sp. 6803. FEMS Microbiology Letters **13:**367-370.

72. **Gutekunst K, Phunpruch S, Schwarz C, Schuchardt S, Schulz-Friedrich R, Appel J.** 2005. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium Synechocystis sp PCC 6803 as a transcription activator. Molecular Microbiology **58:**810-823.

73. **Hallenbeck PC, Abo-Hashesh M, Ghosh D.** 2012. Strategies for improving biological hydrogen production. Bioresource Technology **110:**1-9.

74. **He DL, Xu XD.** 2010. CalA, a cyAbrB protein, binds to the upstream region of ftsZ and is down-regulated in heterocysts in Anabaena sp PCC 7120. Archives of Microbiology **192:**461-469.

75. **Hess WR.** 2011. Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. Current Opinion in Microbiology **14:**608-614.

76. **Hoffmann D, Gutekunst K, Klissenbauer M, Schulz-Friedrich R, Appel J.** 2006. Mutagenesis of hydrogenase accessory genes of Synechocystis sp PCC 6803 - Additional homologues of hypA and hypB are not active in hydrogenase maturation. FEBS Journal **273:**4516-4527.

77. **Houot L, Floutier M, Marteyn B, Michaut M, Picciocchi A, Legrain P, Aude JC, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2007. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the metabolism of Synechocystis PCC6803, under the control of the Slr1738 regulator. FEBS Genomics **8**.

78. **Hsu CH, Wang AHJ.** 2011. The DNA-recognition fold of Sso7c4 suggests a new member of SpoVT-AbrB superfamily from archaea. Nucleic Acids Research **39:**6764-6774.

79. **Hsu CH, Wang AHJ.** 2011. The DNA-recognition fold of Sso7c4 suggests a new member of SpoVT-AbrB superfamily from archaea. Nucleic Acids Research **39:**6764-6774.

80. **Imlay JA.** 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, p. 755-776, Annual Review of Biochemistry, vol. 77. Annual Reviews, Palo Alto.

81. **Inoue T, Sugawara H, Hamanaka S, Tsukui H, Suzuki E, Kohzuma T, Kai Y.** 1999. Crystal structure determinations of oxidized and reduced plastocyanin from the cyanobacterium Synechococcus sp PCC 7942. Biochemistry **38:**6063-6069.

82. **Ishii A, Hihara Y.** 2006. Characterization of putative transcriptional regulators having an AbrB-type DNA binding domain in Synechocystis sp PCC 6803. Plant and Cell Physiology **47:**S87-S87.

83. **Ishii A, Hihara Y.** 2008. An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in Synechocystis sp PCC 6803. Plant Physiology **148:**660-670.

84. **Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N.** 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution. Nature **411:**909-917.

85. **Justice SS, Hunstad DA, Cegelski L, Hultgren SJ.** 2008. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. Nature Reviews Microbiology **6:**162-168.

86. **Kamada K, Hanaoka F, Burley SK.** 2003. Crystal structure of the MazE/MazF complex: Molecular bases of antidote-toxin recognition. Molecular Cell **11:**875-884.

87. **Kamei A, Hihara Y, Yoshihara S, Geng X, Kanehisa M, Ikeuchi M.** 2001. Functional Analysis of lexA-like gene, sll1626 in Synechocystis sp. PCC 6803 using DNA microarray. Science Access **3**.

88. **Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S.** 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes **3:**109-136.

89. **Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S.** 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes **3:**185-209.

90. **Kim SO, Merchant K, Nudelman R, Beyer WF, Keng T, DeAngelo J, Hausladen A, Stamler JS.** 2002. OxyR: A molecular code for redox-related signaling. Cell **109:**383-396.

91. **Kiss E, Kos PB, Vass I.** 2009. Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium Synechocystis 6803. Journal of Biotechnology **142:**31-37.

92. **Kleihues L, Lenz O, Bernhard M, Buhrke T, Friedrich B.** 2000. The H(2) sensor of Ralstonia eutropha is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. J Bacteriol **182:**2716-2724.

93. **Klein W, Marahiel MA.** 2002. Structure-function relationship and regulation of two Bacillus subtilis DNA-binding proteins, HBsu and AbrB. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **4:**323-329.

94. **Kopfmann S, Hess WR.** 2013. Toxin-Antitoxin Systems on the Large Defense Plasmid pSYSA of Synechocystis sp. PCC 6803. The Journal of biological chemistry **288:**7399-7409.

95. **Kothari A, Potrafka R, Garcia-Pichel F.** 2012. Diversity in hydrogen evolution from bidirectional hydrogenases in cyanobacteria from terrestrial, freshwater and marine intertidal environments. Journal of Biotechnology **162:**105-114.

96. **Kouril R, Arteni AA, Lax J, Yeremenko N, D'Haene S, Rogner M, Matthijs HCP, Dekker JP, Boekema EJ.** 2005. Structure and functional role of supercomplexes of IsiA and Photosystem I in cyanobacterial photosynthesis. FEBS Letters **579:**3253-3257.

97. **Krishna PS, Rani BR, Mohan MK, Suzuki L, Shivaji S, Prakash JSS.** 2013. A novel transcriptional regulator, Sll1130, negatively regulates heat-responsive genes in Synechocystis sp PCC6803. Biochemical Journal **449:**751-760.

98. **Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P.** 1989. INSERTIONAL MUTAGENESIS BY RANDOM CLONING OF ANTIBIOTIC-RESISTANCE GENES INTO THE GENOME OF THE CYANOBACTERIUM SYNECHOCYSTIS STRAIN PCC-6803. Journal of Bacteriology **171:**3449-3457.

99. **Labarre J, Thuriaux P, Chauvat F.** 1987. GENETIC-ANALYSIS OF AMINO-ACID-TRANSPORT IN THE FACULTATIVELY HETEROTROPHIC CYANOBACTERIUM SYNECHOCYSTIS SP STRAIN 6803. Journal of Bacteriology **169:**4668-4673.

100. **Larsson J, Nylander JAA, Bergman B.** 2011. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. FEBS Evolutionary Biology **11:**21.

101. **Lee LK, Stewart AG, Donohoe M, Bernal RA, Stock D.** 2010. The structure of the peripheral stalk of Thermus thermophilus H+-ATPase/synthase. Nature Structural & Molecular Biology **17:**373-U145.

102. **Li T, Yang HM, Cui SX, Suzuki I, Zhang LF, Li L, Bo TT, Wang J, Murata N, Huang F.** 2012. Proteomic Study of the Impact of Hik33 Mutation in Synechocystis sp PCC 6803 under Normal and Salt Stress Conditions. Journal of Proteome Research **11:**502-514.

103. **Liberton M, Berg RH, Heuser J, Roth R, Pakrasi HB.** 2006. Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp strain PCC 6803. Protoplasma **227:**129-138.

104. **Liebgott PP, de Lacey AL, Burlat B, Cournac L, Richaud P, Brugna M, Fernandez VM, Guigliarelli B, Rousset M, Leger C, Dementin S.** 2011. Original Design of an Oxygen-Tolerant NiFe Hydrogenase: Major Effect of a Valine-to-Cysteine Mutation near the Active Site. Journal of the American Chemical Society **133:**986-997.

105. **Lieman-Hurwitz J, Haimovich M, Shalev-Malul G, Ishii A, Hihara Y, Gaathon A, Lebendiker M, Kaplan A.** 2009. A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO2 by modulating low-CO2-induced gene expression. Environmental Microbiology **11:**927-936.

106. **Lindberg P, Devine E, Stensjo K, Lindblad P.** 2012. HupW Protease Specifically Required for Processing of the Catalytic Subunit of the Uptake Hydrogenase in the Cyanobacterium Nostoc sp Strain PCC 7120. Applied and Environmental Microbiology **78:**273-276.

107. **Lindberg P, Schutz K, Happe T, Lindblad P.** 2002. A hydrogen-producing, hydrogenase-free mutant strain of Nostoc punctiforme ATCC 29133. International Journal of Hydrogen Energy **27:**1291-1296.

108. **Lindblad P, Antal TK, Oliveira P.** 2006. The bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium /i Synechocystis/ sp. strain PCC 6803. International Journal of Hydrogen Energy **31:**1439-1444.

109. **Little JW.** 1984. Autodigestion of lexA and phage lambda repressors. Proc Natl Acad Sci U S A **81:**1375-1379.

110. **Long M, Liu J, Chen Z, Bleijlevens B, Roseboom W, Albracht SP.** 2007. Characterization of a HoxEFUYH type of [NiFe] hydrogenase from Allochromatium vinosum and some EPR and IR properties of the hydrogenase module. J Biol Inorg Chem **12:**62-78.

111. **Maier T, Bock A.** 1996. Generation of active [NiFe] hydrogenase in vitro from a nickel-free precursor form. Biochemistry **35:**10089-10093.

112. **Marbouty M, Mazouni K, Saguez C, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2009. Characterization of the Synechocystis Strain PCC 6803 Penicillin-Binding Proteins and Cytokinetic Proteins FtsQ and FtsW and Their Network of Interactions with ZipN. Journal of Bacteriology **191:**5123-5133.

113. **Marbouty M, Saguez C, Chauvat F.** 2009. The cyanobacterial cell division factor Ftn6 contains an N-terminal DnaD-like domain. FEBS Structural Biology **9**.

114. **Marbouty M, Saguez C, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2009. Characterization of the FtsZ-Interacting Septal Proteins SepF

and Ftn6 in the Spherical-Celled Cyanobacterium Synechocystis Strain PCC 6803. Journal of Bacteriology **191**.

115. **Marbouty M, Saguez C, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2009. ZipN, an FtsA-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium Synechocystis PCC6803. Molecular Microbiology **74:**409-420.
116. **Marraccini P, Bulteau S, Cassierchauvat C, Mermetbouvier P, Chauvat F.** 1993. A CONJUGATIVE PLASMID VECTOR FOR PROMOTER ANALYSIS IN SEVERAL CYANOBACTERIA OF THE GENERA SYNECHOCOCCUS AND SYNECHOCYSTIS. Plant Molecular Biology **23:**905-909.
117. **Marraccini P, Cassierchauvat C, Bulteau S, Chavez S, Chauvat F.** 1994. LIGHT-REGULATED PROMOTERS FROM SYNECHOCYSTIS PCC6803 SHARE A CONSENSUS MOTIF INVOLVED IN PHOTOREGULATION. Molecular Microbiology **12:**1005-1012.
118. **Marraccini P, Cassierchauvat C, Bulteau S, Chavez S, Chauvat F.** 1994. LIGHT-REGULATED PROMOTERS FROM SYNECHOCYSTIS PCC6803 SHARE A CONSENSUS MOTIF INVOLVED IN PHOTOREGULATION. Molecular Microbiology **12:**1005-1012.
119. **Marteyn B, Domain F, Legrain P, Chauvat F, Cassier-Chauvat C.** 2009. The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in Synechocystis PCC6803. Molecular Microbiology **71:**520-532.
120. **Mazon G, Lucena JM, Campoy S, de Henestrosa ARF, Candau P, Barbe J.** 2004. LexA-binding sequences in Gram-positive and cyanobacteria are closely related. Molecular Genetics and Genomics **271:**40-49.
121. **Mazouni K, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 1998. Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial secA gene. Molecular Microbiology **30:**1113-1122.
122. **Mazouni K, Domain F, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2004. Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. Molecular Microbiology **52:**1145-1158.
123. **Mazouni K, Domain F, Chauvat F, Cassier-Chauvat C.** 2003. Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. Molecular Microbiology **49:**1019-1029.
124. **McDonough WF, Sun SS.** 1995. THE COMPOSITION OF THE EARTH. Chemical Geology **120:**223-253.
125. **Melis A, Happe T.** 2001. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. Plant Physiol **127:**740-748.
126. **Melis A, Seibert M, Ghirardi ML.** 2007. Hydrogen fuel production by transgenic microalgae. Transgenic Microalgae as Green Cell Factories **616:**108-121.
127. **Melis A, Zhang LP, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M.** 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiology **122:**127-135.
128. **Mermetbouvier P, Cassierchauvat C, Marraccini P, Chauvat F.** 1993. TRANSFER AND REPLICATION OF RSF1010-DERIVED PLASMIDS IN SEVERAL CYANOBACTERIA OF THE GENERAL SYNECHOCYSTIS AND SYNECHOCOCCUS. Current Microbiology **27:**323-327.
129. **Mermetbouvier P, Chauvat F.** 1994. A CONDITIONAL EXPRESSION VECTOR FOR THE CYANOBACTERIA SYNECHOCYSTIS SP STRAINS PCC6803 AND PCC6714 OR SYNECHOCOCCUS SP STRAINS PCC7942 AND PCC6301. Current Microbiology **28:**145-148.
130. **Meyer J, Kelley BC, Vignais PM.** 1978. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria. Biochimie **60:**245-260.
131. **Midorikawa T, Matsumoto K, Narikawa R, Ikeuchi M.** 2009. An Rrf2-Type Transcriptional Regulator Is Required for Expression of psaAB Genes in the Cyanobacterium Synechocystis sp PCC 6803. Plant Physiology **151:**882-892.
132. **Mitschke J, Georg J, Scholz I, Sharma CM, Dienst D, Bantscheff J, Voss B, Steglich C, Wilde A, Vogel J, Hess WR.** 2011. An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium Synechocystis sp PCC6803. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108:**2124-2129.
133. **Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T.** 2002. PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. Cell **110:**361-371.
134. **Murakami A, Miyashita H, Iseki M, Adachi K, Mimuro M.** 2004. Chlorophyll d in an epiphytic cyanobacterium of red algae. Science **303:**1633-1633.
135. **Narainsamy K, Marteyn B, Sakr S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2013. Chapter Five - Genomics of the Pleïotropic Glutathione System in Cyanobacteria, p. 157-188, vol. 65. Academic Press, Advances in Botanical Research.
136. **Nicolet Y, Fontecilla-Camps JC.** 2012. Structure-Function Relationships in FeFe -Hydrogenase Active Site Maturation. Journal of Biological Chemistry **287:**13532-13540.
137. **Nicolet Y, Piras C, Legrand P, Hatchikian CE, Fontecilla-Camps JC.** 1999. Desulfovibrio desulfuricans iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. Structure with Folding & Design **7:**13-23.

138. **Ning DG, Ye S, Liu BA, Chang JN.** 2011. The Proteolytic Activation of the relNEs (ssr1114/slr0664) Toxin-Antitoxin System by Both Proteases Lons and ClpP2s/Xs of Synechocystis sp PCC 6803. Current Microbiology **63:**496-502.

139. **Ogata H, Kellers P, Lubitz W.** 2010. The Crystal Structure of the NiFe Hydrogenase from the Photosynthetic Bacterium Allochromatium vinosum: Characterization of the Oxidized Enzyme (Ni-A State). Journal of Molecular Biology **402:**428-444.

140. **Ohkawa H, Pakrasi HB, Ogawa T.** 2000. Two types of functionally distinct NAD(P)H dehydrogenases in Synechocystis sp strain PCC6803. Journal of Biological Chemistry **275:**31630-31634.

141. **Oliveira P, Lindblad P.** 2005. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium Synechocystis sp PCC 6803. Fems Microbiology Letters **251:**59-66.

142. **Oliveira P, Lindblad P.** 2008. An AbrB-like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in Synechocystis sp strain PCC 6803. Journal of Bacteriology **190:**1011-1019.

143. **Oliveira P, Lindblad P.** 2009. Transcriptional regulation of the cyanobacterial bidirectional Hox-hydrogenase. Dalton Transactions**:**9990-9996.

144. **Oliveira P, Lindblad P.** 2011. Novel Insights into the Regulation of LexA in the Cyanobacterium Synechocystis sp Strain PCC 6803. Journal of Bacteriology **193:**3804-3814.

145. **Oliveira P, Lindblad P.** 2009. Transcriptional regulation of the cyanobacterial bidirectional Hox-hydrogenase. Dalton Trans**:**9990-9996.

146. **Olson AL, Bobay BG, Melander C, Cavanagh J.** 2012. H-1, C-13, and N-15 resonance assignments and secondary structure prediction of the full-length transition state regulator AbrB from Bacillus anthracis. Biomolecular Nmr Assignments **6:**95-98.

147. **Omairi-Nasser A, de Gracia AG, Ajlani G.** 2011. A larger transcript is required for the synthesis of the smaller isoform of ferredoxin: NADP oxidoreductase. Molecular Microbiology **81:**1178-1189.

148. **Onizuka T, Akiyama H, Endo S, Kanai S, Hirano M, Tanaka S, Miyasaka H.** 2002. CO2 response element and corresponding trans-acting factor of the promoter for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in Synechococcus sp PCC7002 found by an improved electrophoretic mobility shift assay. Plant and Cell Physiology **43:**660-667.

149. **Pakrasi HB, Williams JG, Arntzen CJ.** 1988. Targeted mutagenesis of the psbE and psbF genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a functional role of cytochrome b559 in photosystem II. Embo j **7:**325-332.

150. **Papen H, Kentemich T, Schmulling T, Bothe H.** 1986. Hydrogenase activities in cyanobacteria. Biochimie **68:**121-132.

151. **Parkin A, Sargent F.** 2012. The hows and whys of aerobic H-2 metabolism. Current Opinion in Chemical Biology **16:**26-34.

152. **Paschos A, Bauer A, Zimmermann A, Zehelein E, Bock A.** 2002. HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. J Biol Chem **277:**49945-49951.

153. **Patterson-Fortin LM, Colvin KR, Owttrim GW.** 2006. A LexA-related protein regulates redox-sensitive expression of the cyanobacterial RNA helicase, crhR. Nucleic Acids Research **34:**3446-3454.

154. **Patterson-Fortin LM, Owttrim GW.** 2008. A Synechocystis LexA-orthologue binds direct repeats in target genes. FEBS Letters **582:**2424-2430.

155. **Peters JW, Lanzilotta WN, Lemon BJ, Seefeldt LC.** 1998. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from Clostridium pasteurianum to 1.8 angstrom resolution. Science **282:**1853-1858.

156. **Petkun S, Shi R, Li YG, Asinas A, Munger C, Zhang LH, Waclawek M, Soboh B, Sawers RG, Cygler M.** 2011. Structure of Hydrogenase Maturation Protein HypF with Reaction Intermediates Shows Two Active Sites. Structure **19:**1773-1783.

157. **Picciocchi A, Saguez C, Boussac A, Cassier-Chauvat C, Chauvat F.** 2007. CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated 2Fe-2S cluster. Biochemistry **46:**15018-15026.

158. **Pieulle L, Guedeney G, Cassier-Chauvat C, Jeanjean R, Chauvat F, Peltier G.** 2000. The gene encoding the NdhH subunit of type 1 NAD(P)H dehydrogenase is essential to survival of Synechocystis PCC6803. FEBS Letters **487:**272-276.

159. **Poncelet M, Cassier-Chauvat C, Leschelle X, Bottin H, Chauvat F.** 1998. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in Synechocystis PCC6803 by plasmid shuffling. Molecular Microbiology **28:**813-821.

160. **Poncelet M, Cassierchauvat C, Chauvat F.** 1994. SEQUENCE OF THE FLAVODOXIN-ENCODING GENE FROM THE CYANOBACTERIUM SYNECHOCYSTIS PCC6803. Gene **145:**153-154.

161. **Prakash JSS, Sinetova M, Zorina A, Kupriyanova E, Suzuki I, Murata N, Los DA.** 2009. DNA supercoiling regulates the stress-inducible expression of genes in the cyanobacterium Synechocystis. Molecular Biosystems **5:**1904-1912.

162. **Prasad GS, Kresge N, Muhlberg AB, Shaw A, Jung YS, Burgess BK, Stout CD.** 1998. The crystal structure of NADPH : ferredoxin reductase from Azotobacter vinelandii. Protein Science **7:**2541-2549.

163. **Rakhely G, Kovacs AT, Maroti G, Fodor BD, Csanadi G, Latinovics D, Kovacs KL.** 2004. Cyanobacterial-type,

heteropentameric, NAD+-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium Thiocapsa roseopersicina. Appl Environ Microbiol **70:**722-728.

164. **Rakhimberdieva MG, Boichenko VA, Karapetyan NV, Stadnichuk IN.** 2001. Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium Spirulina platensis. Biochemistry **40:**15780-15788.
165. **Richaud C, Zabulon G, Joder A, Thomas JC.** 2001. Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the nblA gene in Synechocystis strain PCC 6803. Journal of Bacteriology **183:**2989-2994.
166. **Rigonato J, Alvarenga DO, Andreote FD, Dias AC, Melo IS, Kent A, Fiore MF.** 2012. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. FEMS Microbiol Ecol **80:**312-322.
167. **Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY.** 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Journal of General Microbiology **111:**1-61.
168. **Rochaix JD.** 1992. Genetic analysis of photosynthesis in prokaryotes and lower eukaryotes. Curr Opin Genet Dev **2:**785-791.
169. **Romero A, De la Cerda B, Varela PF, Navarro JA, Hervas M, De la Rosa MA.** 1998. The 2.15 angstrom crystal structure of a triple mutant plastocyanin from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Journal of Molecular Biology **275:**327-336.
170. **Rosana ARR, Ventakesh M, Chamot D, Patterson-Fortin LM, Tarassova O, Espie GS, Owttrim GW.** 2012. Inactivation of a Low Temperature-Induced RNA Helicase in Synechocystis sp PCC 6803: Physiological and Morphological Consequences. Plant and Cell Physiology **53:**646-658.
171. **Ruch S, Beyer P, Ernst H, Al-Babili S.** 2005. Retinal biosynthesis in Eubacteria: in vitro characterization of a novel carotenoid oxygenase from Synechocystis sp PCC 6803. Molecular Microbiology **55:**1015-1024.
172. **Sanchez-Torres V, Maeda T, Wood TK.** 2009. Protein Engineering of the Transcriptional Activator FhlA To Enhance Hydrogen Production in Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology **75:**5639-5646.
173. **Sarcina M, Mullineaux CW.** 2004. Mobility of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacterial thylakoid membranes. Journal of Biological Chemistry **279:**36514-36518.
174. **Sato S, Shimoda Y, Muraki A, Kohara M, Nakamura Y, Tabata S.** 2007. A large-scale protein-protein interaction analysis in Synechocystis sp PCC6803. DNA Research **14:**207-216.
175. **Sazuka T, Yamaguchi M, Ohara O.** 1999. Cyano2Dbase updated: Linkage of 234 protein spots to corresponding genes through N-terminal microsequencing. Electrophoresis **20:**2160-2171.
176. **Scherzinger D, Ruch S, Kloer DP, Wilde A, Al-Babili S.** 2006. Retinal is formed from apo-carotenoids in Nostoc sp PCC7120: in vitro characterization of an apo-carotenoid oxygenase. Biochemical Journal **398:**361-369.
177. **Schmitz O, Boison G, Hilscher R, Hundeshagen B, Zimmer W, Lottspeich F, Bothe H.** 1995. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. Eur J Biochem **233:**266-276.
178. **Schmitz O, Boison G, Salzmann H, Bothe H, Schutz K, Wang SH, Happe T.** 2002. HoxE - a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1554:**66-74.
179. **Schmitz O, Gurke J, Bothe H.** 2001. Molecular evidence for the aerobic expression of nifJ, encoding pyruvate : ferredoxin oxidoreductase, in cyanobacteria. Fems Microbiology Letters **195:**97-102.
180. **Schook POP, Stohl EA, Criss AK, Seifert S.** 2011. The DNA-binding activity of the Neisseria gonorrhoeae LexA orthologue NG1427 is modulated by oxidation. Molecular Microbiology **79:**846-860.
181. **Serebryakova LT, Medina M, Zorin NA, Gogotov IN, Cammack R.** 1996. Reversible hydrogenase of Anabaena variabilis ATCC 29413: catalytic properties and characterization of redox centres. FEBS Lett **383:**79-82.
182. **Serre L, Vellieux FMD, Medina M, GomezMoreno C, FontecillaCamps JC, Frey M.** 1996. X-ray structure of the Ferredoxin:NADP(+) reductase from the cyanobacterium Anabaena PCC 7119 at 1.8 angstrom resolution, and crystallographic studies of NADP(+) binding at 2.25 angstrom resolution. Journal of Molecular Biology **263:**20-39.
183. **Shalev-Malul G, Lieman-Hurwitz J, Viner-Mozzini Y, Sukenik A, Gaathon A, Lebendiker M, Kaplan A.** 2008. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by Aphanizomenon ovalisporum. Environmental Microbiology **10:**988-999.
184. **Shaw AJ, Hogsett DA, Lynd LR.** 2009. Identification of the FeFe -Hydrogenase Responsible for Hydrogen Generation in Thermoanaerobacterium saccharolyticum and Demonstration of Increased Ethanol Yield via Hydrogenase Knockout. Journal of Bacteriology **191**.
185. **Sheremetieva ME, Troshina OY, Serebryakova LT, Lindblad P.** 2002. Identification of hox genes and analysis of their transcription in the unicellular cyanobacterium Gloeocapsa alpicola CALU 743 growing under nitrate-limiting conditions. FEMS Microbiol Lett **214:**229-233.

186. **Shestakov SV, Khyen NT.** 1970. Evidence for genetic transformation in blue-green alga Anacystis nidulans. Mol Gen Genet **107:**372-375.

187. **Shi T, Falkowski PG.** 2008. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. Proc Natl Acad Sci U S A **105:**2510-2515.

188. **Shomura Y, Higuchi Y.** 2012. Structural Basis for the Reaction Mechanism of S-Carbamoylation of HypE by HypF in the Maturation of NiFe -Hydrogenases. Journal of Biological Chemistry **287:**28409-28419.

189. **Singh AK, Elvitigala T, Bhattacharyya-Pakrasi M, Aurora R, Ghosh B, Pakrasi HB.** 2008. Integration of carbon and nitrogen metabolism with energy production is crucial to light acclimation in the cyanobacterium Synechocystis. Plant Physiology **148:**467-478.

190. **Sjoholm J, Oliveira P, Lindblad P.** 2007. Transcription and regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium Nostoc sp. strain PCC 7120. Applied and Environmental Microbiology **73:**5435-5446.

191. **Stanier RY, Cohen-Bazire G.** 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. Annu Rev Microbiol **31:**225-274.

192. **Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G.** 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriol Rev **35:**171-205.

193. **Strauch M, Webb V, Spiegelman G, Hoch JA.** 1990. THE SPOOA PROTEIN OF BACILLUS-SUBTILIS IS A REPRESSOR OF THE ABRB GENE. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87:**1801-1805.

194. **Sullivan DM, Bobay BG, Kojetin DJ, Thompson RJ, Rance M, Strauch MA, Cavanagh J.** 2008. Insights into the Nature of DNA Binding of AbrB-like Transcription Factors. Structure **16:**1702-1713.

195. **Summerfield TC, Nagarajan S, Sherman LA.** 2011. Gene expression under low-oxygen conditions in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 demonstrates Hik31-dependent and -independent responses. Microbiology-Sgm **157:**301-312.

196. **Tamagnini P, Axelsson R, Lindberg P, Oxelfelt F, Wunschiers R, Lindblad P.** 2002. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews **66:**1-+.

197. **Tamagnini P, Leitao E, Oliveira P, Ferreira D, Pinto F, Harris DJ, Heidorn T, Lindblad P.** 2007. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. Fems Microbiology Reviews **31:**692-720.

198. **Vaughn JL, Feher VA, Bracken C, Cavanagh J.** 2001. The DNA-binding domain in the Bacillus subtilis transition-state regulator AbrB employs significant motion for promiscuous DNA recognition. Journal of Molecular Biology **305:**429-439.

199. **Vaughn JL, Feher V, Naylor S, Strauch MA, Cavanagh J.** 2000. Novel DNA binding domain and genetic regulation model of Bacillus subtilis transition state regulator AbrB. Nature Structural Biology **7:**1139-1146.

200. **Vaughn JL, Feher V, Naylor S, Strauch MA, Cavanagh J.** 2005. Novel DNA binding domain and genetic regulation model of Bacillus subtilis transition state regulator AbrB (vol 7, pg 1139, 2000). Nature Structural & Molecular Biology **12:**380-380.

201. **Vignais PM, Billoud B, Meyer J.** 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS Microbiol Rev **25:**455-501.

202. **Vignais PM, Colbeau A.** 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. Current Issues in Molecular Biology **6:**159-188.

203. **Vignais PM, Dimon B, Zorin NA, Tomiyama M, Colbeau A.** 2000. Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H(2)-signaling HupUV hydrogenase in Rhodobacter capsulatus. J Bacteriol **182:**5997-6004.

204. **Walker GC.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli. Microbiol Rev **48:**60-93.

205. **Wang Y, Sun J, Chitnis PR.** 2000. Proteomic study of the peripheral proteins from thylakoid membranes of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Electrophoresis **21:**1746-1754.

206. **Watanabe S, Arai T, Matsumi R, Atomi H, Imanaka T, Miki K.** 2009. Crystal Structure of HypA, a Nickel-Binding Metallochaperone for NiFe Hydrogenase Maturation. Journal of Molecular Biology **394:**448-459.

207. **Watanabe S, Matsumi R, Arai T, Atomi H, Imanaka T, Miki K.** 2007. Crystal structures of NiFe hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: Insights into cyanation reaction by thiol redox signaling. Molecular Cell **27:**29-40.

208. **Welte C, Kallnik V, Grapp M, Bender G, Ragsdale S, Deppenmeier U.** 2010. Function of Ech hydrogenase in ferredoxin-dependent, membrane-bound electron transport in Methanosarcina mazei. J Bacteriol **192:**674-678.

209. **William Schopf J.** 2011. The paleobiological record of photosynthesis. Photosynth Res **107:**87-101.

210. **Wu LF, Mandrand MA.** 1993. Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. FEMS Microbiol Rev **10:**243-269.

211. **Wunschiers R, Batur M, Lindblad P.** 2003. Presence and expression of hydrogenase specific C-terminal endopeptidases in cyanobacteria. FEBS Microbiology **3:**12.

212. **Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR.** 1998. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiology **117:**129-139.

213. **Xie Y, Kole S, Precht P, Pazin MJ, Bernier M.** 2009. S-Glutathionylation Impairs Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation and Signaling. Endocrinology **150:**1122-1131.

214. **Xu K, Clark D, Strauch MA.** 1996. Analysis of abrB mutations, mutant proteins, and why abrB does not utilize a perfect consensus in the -35 region of its sigma(A) promoter. Journal of Biological Chemistry **271:**2621-2626.

215. **Yamauchi Y, Kaniya Y, Kaneko Y, Hihara Y.** 2011. Physiological Roles of the cyAbrB Transcriptional Regulator Pair Sll0822 and Sll0359 in Synechocystis sp strain PCC 6803. Journal of Bacteriology **193:**3702-3709.

216. **Yao F, Strauch MA.** 2005. Independent and interchangeable multimerization domains of the AbrB, abh, and SpoVT global regulatory proteins (vol 187, pg 6360, 2005). Journal of Bacteriology **187:**7546-7546.

217. **Zhang LF, Yang HM, Cui SX, Hu J, Wang J, Kuang TY, Norling B, Huang F.** 2009. Proteomic Analysis of Plasma Membranes of Cyanobacterium Synechocystis sp Strain PCC 6803 in Response to High pH Stress. Journal of Proteome Research **8:**2892-2902.

218. **Zhang YA, Chen M, Church WB, Lau KW, Larkum AWD, Jermiin LS.** 2010. The molecular structure of the IsiA-Photosystem I supercomplex, modelled from high-resolution, crystal structures of Photosystem I and the CP43 protein. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1797:**457-465.

219. **Zhang Z, Pendse ND, Phillips KN, Cotner JB, Khodursky A.** 2008. Gene expression patterns of sulfur starvation in Synechocystis sp PCC 6803. FEBS Genomics **9:**14.

220. **Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauss N, Saenger W, Orth P.** 2001. Crystal structure of photosystem II from Synechococcus elongatus at 3.8 angstrom resolution. Nature **409:**739-743.

221. **Zuber P.** 2000. Specificity through flexibility. Nature Structural Biology **7:**1079-1081.