



Propriétés physico-chimiques et structurales de deux hémoprotéines de cyanobactérie thermophile

Thanh-Lan Lai-Thi

► To cite this version:

Thanh-Lan Lai-Thi. Propriétés physico-chimiques et structurales de deux hémoprotéines de cyanobactérie thermophile. Cristallographie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112187 . tel-01363648

HAL Id: tel-01363648

<https://theses.hal.science/tel-01363648>

Submitted on 11 Sep 2016

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 : CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire des Mécanismes fondamentaux de la Bioénergétique

SB²SM, iBiTec-S, DSV, CEA Saclay

et

Equipe : Mécanismes Régulateurs chez les Organismes Photosynthétiques

B3S, I²BC

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

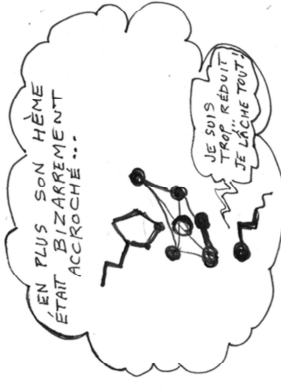
Thanh-Lan LAI-THI

Propriétés physico-chimiques et structurales
de deux hémoprotéines de cyanobactérie thermophile

Date de soutenance : 18/09/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Winfried LEIBL	Directeur de recherche, CEA, iBiTec-S, Saclay
Rapporteurs :	Daniel PICOT	Directeur de recherche, CNRS, IBPC, Paris
	Wolfgang NITSCHKE	Directeur de recherche, CNRS, BIP, Marseille
Examineurs :	Ally AUKAULOO	Professeur, Université Paris Sud, Orsay
	Soufian OUCHANE	Directeur de recherche, CNRS, Gif sur Yvette
	Michel BREMONT	Directeur de recherche, INRA, Jouy en Josas

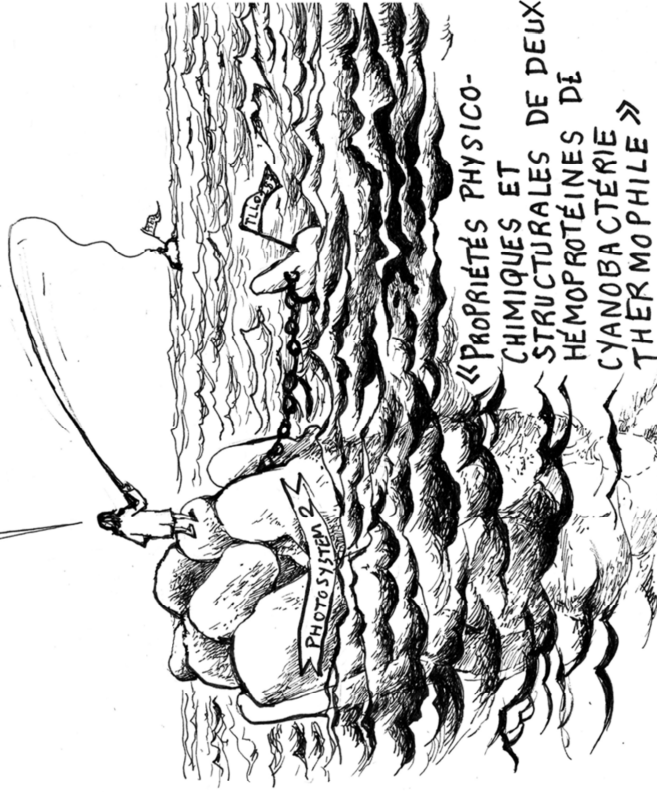


BON, REVENONS
AU MIGRANT DU JOUR
"
CE FAMEUX B6V2
"

Thanh-Lan LAL-THI

vous invite à sa
soutenance de
thèse,,

BON, JE LE REPÊCHE..
IL SERA TOUJOURS
INTÉRESSANT À ÉTUDIER..



VENDREDI 18 SEPTEMBRE 2015

CNRS Gif-sur-Yvette

bâtiment 23

salle de conférence Georges Prévost

" ainsi qu'au pot, bien sûr

14 heures

Ce travail a été réalisé dans le Service de Bioénergétique Biologie Structurale et Mécanismes dans l'institut de Biologie et de Technologies de Saclay grâce au financement de la Direction des Sciences du Vivant du CEA.

MERCI

à Daniel Picot, Wolfgang Nitschke, Ally Aukauloo, Soufian Ouchane, Winfried Leibl et Michel Brémont qui ont accepté d'être membres de mon jury.

à Anja Krieger-Liszkay

à Alain Desbois

à Pierre Sétif

à Maïté Paternostre

à Miwa Sugiura et toute son équipe de l'université de Matsuyama

à Frauke Baymann, à Fabrice Rappaport

à Jean Labarre, Gilles Lagniel, Solenne Chardonnet et Cédric Pionneau pour leur conseils en protéomique

à Stéphanie Simon et Marie-Claire Nevers

à Robert Thaï pour son expertise en spectrométrie de masse

au Dr.J-R.Shen et son équipe

à Sun Un

à Jérôme Santolini et Pierre Dorlet

à Ghada Ajlani

à Alain Boussac

à Francis Haraux pour l'affiche de ma soutenance de thèse

à l'école doctorale de chimie Paris-Sud

aux personnes qui m'ont permis de monter dans le train de ce long voyage qui a duré trois ans : Alfred William Rutherford, Bruno Robert, Michel Riva.

à toutes les personnes avec qui j'ai eu plaisir de partager notre bureau : Naoko, Arezki, Christine, Lisa, Nadime et Catherine et bien sûr à toutes les personnes avec qui j'ai partagé de très bons moments au CEA de Saclay, ils se reconnaîtront.

MERCI aussi aux personnes que j'ai rencontrées avant mon arrivée au CEA et qui m'ont guidée vers ce chemin...

Monique Monnerot et Nicole Dennebouy du CNRS de Gif sur Yvette avec qui j'ai découvert les joies du laboratoire.

Christiane Elie pour m'avoir initiée aux curiosités de la biochimie et des archées et toute l'équipe de Patrick Forterre de l'Université Paris-Sud, tout particulièrement Stéphanie Marsin.

Toute l'équipe de la licence professionnelle à l'Université d'Orsay avec qui ma formation professionnelle a commencé il y a six ans.

Douglas Dalgleish et son équipe lait et agent de texture, en particulier Claire Queguiner au centre international de recherche Danone.

Vincent Beringue et son équipe infections à prions à l'INRA de Jouy-en-Josas.

L'équipe d'enseignant du Master ingénierie des Biomolécules à Orsay.

MERCI aussi aux personnes que j'ai pu croisé lors de mon voyage et qui ont éclairé mon chemin à travers les montagnes et les forêts inconnues

Laurent et Léna,

Thierry Chillon,

Odile Duplessis,

Fannie Marquis et les huit femmes,

Martha Boeglin,

Sylvie Domon.

REMERCIEMENTS plus personnels

à Amélie,

à Cédric,

à mon père, ma mère, Thanh-Thuy, Thanh-Ngoc, Neil et Marten

à Mathilde et Nathalie,

pour les belles personnes qu'elles sont.

« Be involved, be yourself, just believe and do it »

Billy Elliott.

La photosynthèse permet de convertir l'énergie solaire en énergie chimique. Ce processus met en jeu un grand nombre de protéines et complexes protéiques. Le premier complexe de la chaîne photosynthétique est le photosystème II où a lieu l'oxydation de l'eau. Le PSII est composé des protéines D1 et D2. Chez la cyanobactérie thermophile *Thermosynechococcus elongatus*, il y a trois gènes qui codent trois protéines D1 différentes.

La première partie de la thèse décrit le développement d'outils protéomiques basés sur les gels d'électrophorèse 2D pour étudier le protéome des trois différents variants, qui expriment chacun une seule protéine pour D1. Peu de différences ont été trouvées. Toutefois, un seul des variants exprime Tll0287.

La deuxième partie de la thèse décrit la caractérisation de Tll0287 avec différentes techniques : spectroscopies d'absorption UV-visible ou de résonance Raman et spectro-électrochimie. Tll0287 a été identifié comme un cytochrome de type c, mais il présente beaucoup de caractéristiques inattendues. Les spectres d'absorption UV-visible et de résonance Raman de Tll0287 réduit montrent une dépendance vis-à-vis du pH. Deux formes d'hèmes sont présents dans chacun des états oxydé et réduit. Un changement du ligand cystéine a été observé quand l'hème est réduit. Les titrages redox présentent de multiples potentiels à pH 10 et pH 5. Tll0287 peut fixer une molécule de CO à pH 7,6. Ces caractéristiques suggèrent que Tll0287 pourrait être une protéine senseur. De plus, la structure cristallographique montre que Tll0287 n'a pas un repliement classique d'un cytochrome de type c mais celui d'une protéine senseur. Les mutants de délétion du gène *tll0287* ont été construits et aideront à comprendre la fonction de ce nouveau cytochrome.

La troisième partie décrit l'étude de PsbV2 : un autre cytochrome de type c. Afin d'obtenir en quantité suffisante la protéine pour permettre sa caractérisation, elle a été surexprimée dans un système homologue en utilisant le promoteur de l'enzyme de la rubisco. Le potentiel redox de PsbV2 a été déterminé, comme étant très bas, inférieur à -460 mV (vs SHE, pH 5). Le spectre d'absorption UV-visible de la forme réduite a été caractérisé. La structure cristallographique de PsbV2 a été résolue et a révélé une cystéine comme ligand axial et un repliement proche de celui de cytochromes connus de *T.elongatus*. Bien que Tll0287 et PsbV2 présentent une cystéine comme ligand axial, leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques suggèrent que leurs fonctions sont bien différentes.

Une contribution majeure de cette thèse est la caractérisation d'un nouveau senseur à hème de type c chez les cyanobactéries et le développement d'outils nécessaires pour son étude.

Mots-clés : cyanobactérie, *psbA*, photosystème II, protéine D1, protéomique, hémoprotéine, Tll0287, PsbV2, cytochrome de type c, titrage redox, coordination de l'hème.

Photosynthesis converts solar energy into chemical energy. This process involves a large number of proteins and protein complexes. The first protein complex in the photosynthetic chain is Photosystem II within the oxidation of water takes place. PSII is composed of the D1 and D2 proteins. In the thermophile cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*, three genes encoded three different D1 proteins.

The first part of this thesis describes the development of proteomics tools based on 2D gel-electrophoresis to study the proteome of three different variants, each expressing a single different D1 protein. Very few differences were found. However, only one expressed the protein Tll0287.

The second part of the thesis describes the characterization of Tll0287. It was characterized using different techniques: electronic absorption and Raman resonance spectroscopies and spectro-electrochemistry. Tll0287 has been previously identified as a c-type cytochrome, but it presents some unexpected characteristics. The UV-visible absorption and Raman resonance spectra of reduced Tll0287 show a pH dependence. The reduced and oxidized states each had two different forms of the heme. A switch of ligands from a cysteine to histidine was observed in the reduced state. Redox titration showed multiple midpoints at pH 10 and 5. Tll0287 was shown to fix a CO molecule at pH 7.6. These physical properties suggested that Tll0287 could be a sensor. The crystallographic studies reveal that Tll0287 does not have a classical c-type cytochrome fold and is similar to other known sensor proteins, strengthening the hypothesis that it is a sensor. Deletion mutants were constructed that will help to better understand the function of this new cytochrome.

The third part describes a study of the PsbV2, another c-type cytochrome. In order to obtain sufficient quantities to carry out characterization of this protein, it was overexpressed in a homologous system using the promotor of the rubisco enzyme. The redox midpoint potential of PsbV2 was found to be very low, below -460 mV (vs SHE, pH 5). The UV-visible absorption spectrum of the reduced form was determined. The crystallographic structure of PsbV2 was solved and reveals an axial cysteine ligand. Although both Tll0287 and PsbV2 share this feature, their different structures and physico-chemical properties suggest that their functions are unlikely to be similar.

A major contribution of this thesis is the characterization of a new c-type cytochrome sensor in cyanobacteria and the development of proteomic tools required to study it.

Keywords : cyanobacteria, *psbA*, photosystem II, D1 protein, proteomic, hemeprotein, Tll0287, PsbV2, c-type cytochrome, redox titration, heme coordination

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ALA	Acide α -lévulinique
APS	Persulfate d'ammonium
Arg	Arginine
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BAP	<i>Bacterial Alkaline Phosphatase</i>
BN	<i>Blue Native</i>
Ccm	<i>Cytochrome c maturation</i>
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Chl	Chlorophylle
CP	<i>Chlorophyll binding Protein</i>
Cyt	cytochrome
DTT	Dithiothreitol
DDM	Dodecyl-maltoside
ECL	<i>ElectrochemiLuminescence</i>
EIA	<i>Enzyme Immuno Assay</i>
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
Fd	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine-NADP ⁺ oxydoréductase
HS	<i>High Spin</i>
His	Histidine
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute pression
IEF	Isoélectrofocalisation
Im	Imidazole
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IR	Infra-rouge
Lys	Lysine
LS	<i>Low spin</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MES	Acide 2-morpholinoethanesulfonique
Met	Methionine

MP8	Microperoxidase 8
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucleotide (phosphate)
OEC	<i>Oxygen Evolving Complex</i>
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein data Bank</i>
Ph	Phéophytine
pI	Point isoélectrique
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PQ	Plastoquinone
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
PVDF	Polyvinylidene difluoride
Q	Quinone
qsp	En quantité suffisante pour
Redox	Oxydo-réduction
RR	Résonance Raman
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHE	<i>Standard Hydrogen Electrode</i>
SOD	superoxide dismutase
TFA	Acide trifluoroacétique
TMBZ	3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine
UV	Ultra-violet
1D	Une dimension
2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
5c	Pentacoordonné
6c	Hexacoordonné

REMERCIEMENTS	2
RESUME	6
ABSTRACT	7
ABREVIATIONS	8
SOMMAIRE	10
1. Introduction	14
1.1. La photosynthèse oxygénique	16
a. La phase lumineuse	17
b. Les pigments photosynthétiques	17
c. Le photosystème II	20
1.2. Les cyanobactéries	22
a. La cyanobactérie <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	23
b. La sous-unité D1 est codée par 3 gènes chez <i>T. elongatus</i>	24
c. Différences entre les variants de D1	25
1.3. Les cytochromes	28
a. La conformation des métalloporphyrines	30
b. Propriétés d'oxydoréduction du fer hémique	31
c. Propriétés électronique du fer hémique	31
d. Les ligands du fer hémique	32
e. Les cytochromes de type c	33
f. Les cytochromes de type c de <i>T. elongatus</i>	33
1.4. Objectifs	34
2. Matériels et méthodes	36
2.1. Microbiologie	38
a. La bactérie <i>Escherichia coli</i>	38
b. La cyanobactérie <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	38
2.2. Biologie moléculaire : outils	40
a. Préparation d'ADN génomique de <i>T. elongatus</i>	40
b. Mutagenèse dirigée	41
c. Mini Préparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> par lyse alcaline	41
d. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne	42
e. Analyse de l'ADN par digestion enzymatique	42
f. Ligation	42
g. Bactéries <i>E. coli</i> compétentes pour transformation par choc thermique	43
h. Transformation par choc thermique d' <i>E. coli</i>	44
i. Transformation par électroporation de <i>T. elongatus</i>	44
j. Sélection de clones de <i>T. elongatus</i> après transformation	44

2.3. Biologie moléculaire : stratégies	45
a. Construction des mutants de délétion de Tll0287	45
b. Obtention des mutant de délétion de Tll0287	47
c. Expression hétérologue de PsbV2 chez <i>E. coli</i>	48
d. Expression de PsbV2 non mature chez <i>E.coli</i>	53
e. Expression homologue de PsbV2 chez <i>T. elongatus</i>	55
2.4. Biochimie : outils	58
a. SDS-PAGE	58
b. Purification de protéines	60
2.5. Biochimie : stratégies de purification	61
a. Séparation des fractions soluble et membranaire pour la purification	61
b. Purification du cytochrome PsbV2	62
c. Purification du cytochrome c_6	63
d. Purification de l'hémoprotéine Tll0287	64
2.6. Immunologie	65
a. Production d'anticorps polyclonaux contre Tll0287	65
b. Evolution de la réponse anticorps	66
c. Western blot	67
d. Détection et dosage de Tll0287 par test immunoenzymatique	68
2.7. Protéomique	69
a. Séparation des fractions soluble et membranaire pour l'électrophorèse 2D	69
b. Gels 2D des protéines de la fraction soluble	70
c. Gels 2D des protéines de la fraction membranaire	71
d. Reproductibilité des gels 2D	74
e. Numérisation et séchage des gels 2D	75
f. Spectrométrie de masse sur gels 2D	76
2.8. Biophysique	77
a. Spectroscopie d'absorption	78
b. Spectroscopie de diffusion Raman de résonance	79
c. Spectrométrie d'absorption atomique	81
2.9. Electrochimie – Titration redox par spectroscopie d'absorption	81
a. Expériences au BIP	82
b. Expériences à l'IBPC	83
c. Expérience au CEA	84
Résultats et discussions	86
3. Protéomique de la cyanobactérie <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	88
3.1. Introduction	90
3.2. Du calcium à la place du strontium dans les milieux de culture	91
a. Le calcium dans la cellule	91
b. Le calcium dans le PSII	91

3.3. Etude protéomique sur des cellules WT 43H de <i>T. elongatus</i> cultivées en présence de calcium ou de strontium	92
a. L'expression des protéines de la fraction membranaire	93
b. L'expression des protéines de la fraction soluble	97
3.4. Comparaison d'expression de protéines chez différents variants de D1 de <i>T. elongatus</i>	99
a. Carte 2D de référence	99
b. Points critiques pour la reproductibilité des gels 2D	100
c. Comparaison des fractions solubles des variants de D1	102
3.5. Mais où est donc passée la protéine Tll0287 ?	102
a. A la recherche de Tll0287 en 1 ^{ère} dimension	102
b. Un outil de recherche plus spécifique de Tll0287 : un anticorps polyclonal	105
c. A la recherche de Tll0287 en 2 ^{ème} dimension	107
3.6. Conclusion	110
4. Caractérisation de l'hémoprotéine Tll0287 de <i>T. elongatus</i>	112
4.1. Introduction	114
4.2. Spectres d'absorption UV-visible de Tll0287	116
4.3. Spectres de résonance Raman (RR)	119
a. Les vibrations moléculaires	120
b. Les excitations des spectres RR des cytochromes de type c	121
c. Attribution des modes de résonance Raman de l'hème	122
d. Spectres de RR de Tll0287 oxydé et réduit à pH 7,6	123
e. Sensibilité au pH des spectres RR de Tll0287 oxydé et réduit	129
4.4. Titrages redox de Tll0287	142
4.5. Structure cristallographique de Tll0287	144
4.6. Hypothèse sur la fonction de Tll0287	146
4.7. Discussions	149
5. Caractérisation du cytochrome c PsbV2 de <i>T. elongatus</i>	152
5.1. Introduction	154
5.2. Expression homologue de PsbV2 de <i>T. elongatus</i>	155
5.3. Structure cristallographique de PsbV2	156
5.4. Potentiel redox très bas de PsbV2	159

5.5. Discussions et perspectives	169
6. Comparaison de Tll0287 et de PsbV2	172
6.1. Structures cristallographiques de Tll0287 et de PsbV2	174
6.2. Comparaison des hèmes de Tll0287 et de PsbV2	174
a. Les ligands axiaux	174
b. Les conformations des porphyrines	177
c. Plusieurs formes d'hème pour Tll0287	177
7. Conclusions et perspectives	178
BIBLIOGRAPHIE	184
PUBLICATION	194

1. INTRODUCTION

1.1. La photosynthèse oxygénique	16
a. La phase lumineuse	17
b. Les pigments photosynthétiques	17
c. Le photosystème II	20
1.2. Les cyanobactéries	22
a. La cyanobactérie <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	23
b. La sous-unité D1 est codée par 3 gènes chez <i>T. elongatus</i>	24
c. Différences entre les variants de D1	25
1.3. Les cytochromes	28
a. La conformation des métalloporphyrines	30
b. Propriétés d'oxydoréduction du fer hémique	31
c. Propriétés électronique du fer hémique	31
d. Les ligands du fer hémique	32
e. Les cytochromes de type c	33
f. Les cytochromes de type c de <i>T. elongatus</i>	33

1.1. La photosynthèse oxygénique

Au cours de l'évolution des organismes vivants, la photosynthèse oxygénique a été le processus principal de l'élaboration de la matière organique sur notre planète. Phénomène complexe, elle implique des mécanismes à la fois physiques et biochimiques par lesquels les organismes autotrophes, les plantes, certaines bactéries et algues utilisent l'énergie solaire pour assimiler le gaz carbonique de l'atmosphère et synthétiser ensuite les molécules organiques (Farineau and Morot-Gaudry 2006). La photosynthèse oxygénique est un processus assurant la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique (sous forme de pouvoir réducteur : NADPH). Elle permet la conversion du CO₂ atmosphérique en carbone organique selon la réaction globale :



Ce phénomène est décrit en deux réactions : primaire et secondaire (Figure 1.1).

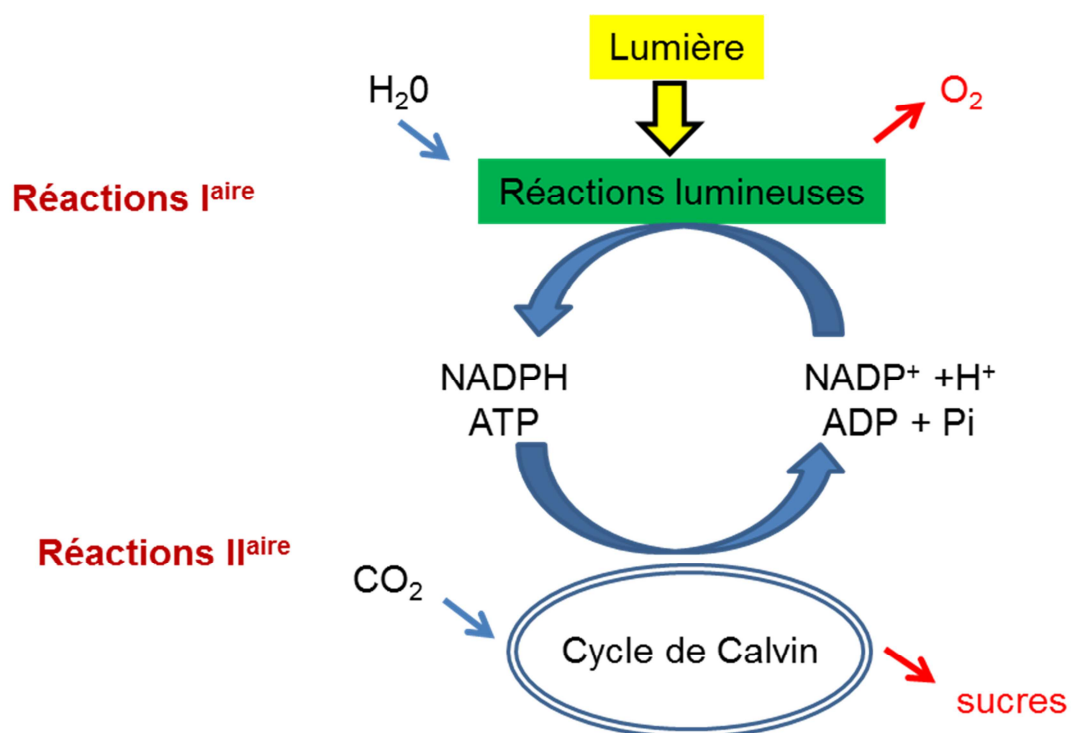


Figure 1.1 : Représentation schématique des processus photosynthétiques oxygéniques. La phase primaire a lieu dans les membranes des thylakoïdes et la phase secondaire a lieu dans le stroma.

1.1.a. La phase lumineuse

Le déroulement de la phase primaire nécessite entre autre deux complexes protéiques des membranes des thylakoïdes qui fonctionnent en série : les photosystèmes I (PSI) et II (PSII) (Figure 1.2). Un transfert d'électrons a lieu entre ces deux photosystèmes *via* un pool de quinones, le cytochrome *b₆f* et un transporteur soluble, le cytochrome *c₆* ou la plastocyanine (PC). L'électron est finalement utilisé en extrémité de la chaîne redox pour la réduction d'un composé à haut potentiel énergétique, le NADPH. Le transfert d'électrons est couplé à des mouvements transmembranaires de protons créant un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane du thylakoïde. L'énergie de ce gradient est utilisée par l'ATP-synthase pour produire de l'ATP (Figure 1.2).

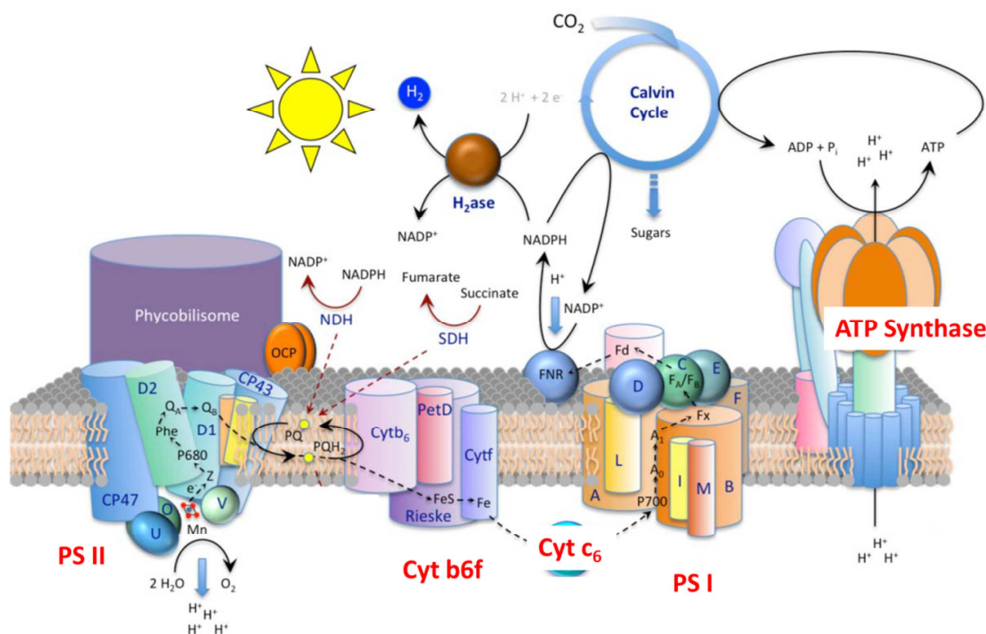


Figure 1.2 : Représentation schématique des différentes sous-unités des complexes protéiques dans une membrane de thylakoïdes impliquées dans la chaîne de transfert des électrons pendant la phase lumineuse. PS II : photosystème II ; Cyt *b₆f* : cytochrome *b₆f*, PQ et PQH₂ : pool de plastoquinones et plastoquinols ; Cyt *c₆* : cytochrome *c₆* (pour les cyanobactéries) ; Fd : ferrédoxine ; FNR : ferrédoxine NADP⁺ réductase. Image modifiée à partir de Kamennaya et al.

1.1.b. Les pigments photosynthétiques

La lumière est absorbée par des pigments. Il existe trois types de pigments : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobilines (pour la plupart des cyanobactéries et certaines algues). Les chlorophylles et les caroténoïdes sont organisés en antenne collectrice, mais il existe aussi des chlorophylles dans les centres réactionnels. Les chlorophylles a et b sont constituées d'un

noyau tétrapyrrolique. Chaque pyrrole possède différents substituants. L'absorption des chlorophylles est due à l'existence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein du noyau phéophorbide (Figure 1.3).

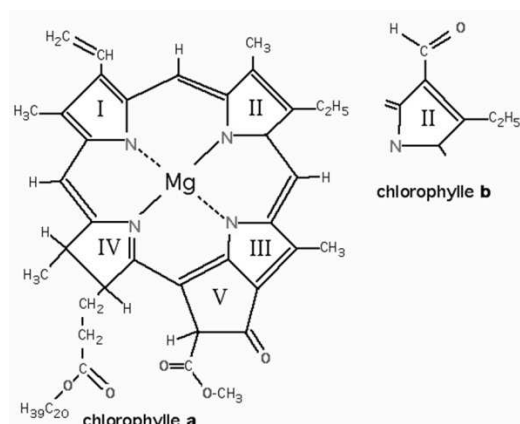


Figure 1.3 : Les chlorophylles a (à gauche) et b diffèrent par les fonctions portées par le noyau pyrrole II (à droite). Un cycle V se trouve contre le noyau pyrrole III. La fonction carboxyle associée au noyau IV est estérifiée par un alcool à très longue chaîne en C₂₀ : le phytol.

Les caroténoïdes sont des constituants fondamentaux des antennes photosynthétiques. Ils sont composés au total de 40 atomes de carbones (Figure 1.4).

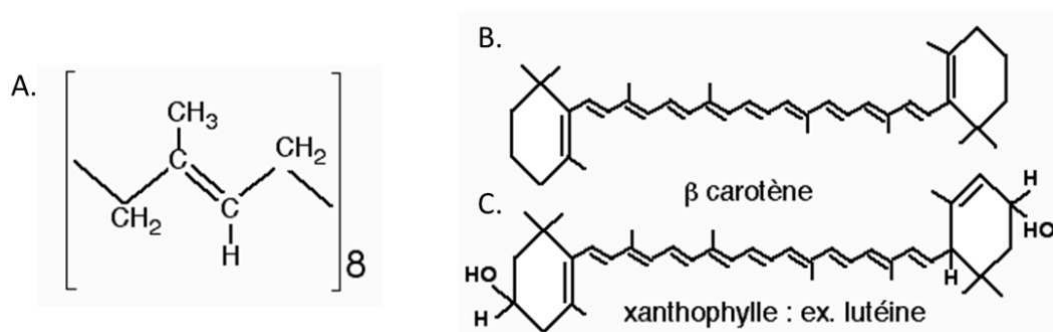


Figure 1.4 : Les caroténoïdes sont constitués de 8 unités d'isoprène (A). Le β carotène (B) comme la lutéine (C) sont deux exemples de caroténoïdes qui ont deux cycles en leurs extrémités.

Les pigments des antennes de cyanobactéries sont des phycobilines. La structure de la phycocyanine et de la phycoérythrine qui sont deux phycobilines, sont présentées dans la figure 1.5.

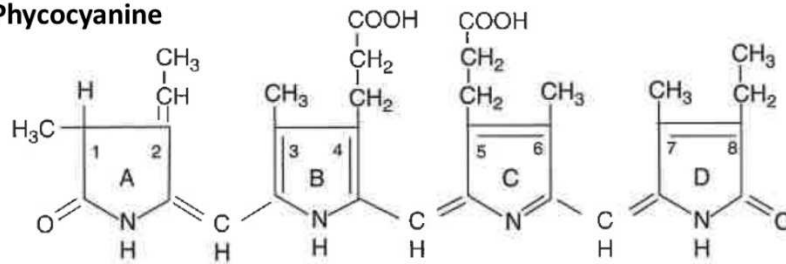
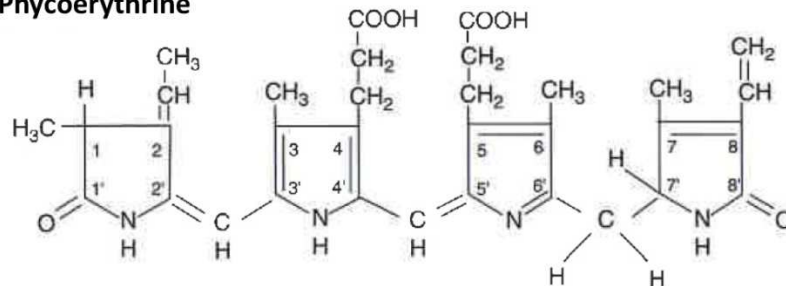
A. Phycocyanine**B. Phycoérythrine**

Figure 1.5 : Deux pigments à chaîne tétrapyrrolique linéaire : (A) la phycocyanine (A) et (B) la phycoérythrine.

Chez les cyanobactéries, le phycobilisome est associé au PSII, il est formé de phycobiliprotéines qui sont des phycobilines associées à des protéines (Figure 1.6).

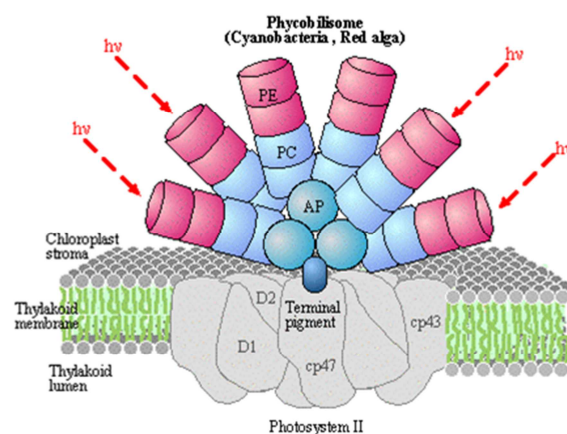


Figure 1.6 : Schéma des phycobiliprotéines de cyanobactéries avec les allophycocyanines (AP), les phycocyanines (PC) et les phycoérythrines (PE) attachées au PSII d'après le site KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00195.html>).

1.1.c. Le photosystème II

Les centres réactionnels PSII et PSI sont des complexes protéiques membranaires qui se situent dans les membranes des thylakoïdes. L'énergie d'excitation est transférée des antennes vers les centres réactionnels. Dans le cadre de cette thèse, l'intérêt a été porté plus particulièrement sur le PSII, la protéine D1 et ses différents variants. Le monomère de PSII a une masse globale de 310 kDa. Le monomère est composé de 20 sous-unités protéiques dont 17 protéines membranaires, 3 protéines extrinsèques ainsi que de nombreux cofacteurs (Figure 1.7).

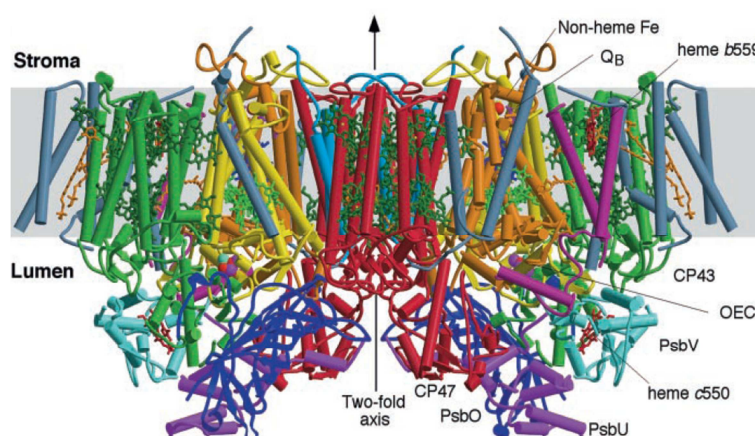


Figure 1.7 : Le photosystème II sous forme de dimère, d'après la structure cristallographique à 3.5 Å (pdb. 2AXT) (Ferreira, Iverson et al. 2004). Vue latérale de la membrane, structure globale du PSII. Les principales sous-unités membranaires sont représentées : D1 (jaune), D2 (orange), les protéines antennes CP43 (vert) et CP47 (rouge), les chaînes α et β du cytochrome b559 (pourpre) ainsi que les protéines extrinsèques : PsbO (bleu), PsbU (violet), cytochrome c_{550} (cyan).

Les protéines D1 et D2 forment un complexe d'hétérodimère au cœur du PSII. Le site catalytique de l'oxydation de l'eau est le cluster de manganèse. La majorité des cofacteurs impliqués dans le transfert des électrons sont ancrés sur ces deux protéines D1 et D2. Il s'agit de la tyrosine 161 de D1 appelée aussi tyrosine Z (Tyr_Z), les chlorophylles P_{D1} et P_{D2} formant la paire de chlorophylles P_{680} , deux phéophytines, deux quinones (Q_A et Q_B). Q_A se situe sur D2 et Q_B sur D1 (Figure 1.8). La figure 1.8 présente les différentes étapes du transfert d'électrons dans le PSII (chiffres indiqués entre parenthèse). Après excitation par un photon, une séparation de charge a lieu (1), la chlorophylle (Chl_{D1}) transfère un électron à la phéophytine de D1 (Ph_{D1}) qui elle-même (2) transmet un électron à la quinone (Q_A) de D2. (3) La charge positive sur la paire de chlorophylle P_{680} est stabilisée puis P_{680} oxyde la Tyr_Z .

(4) La Tyr_Z^+ oxyde ensuite le cluster de manganèse. (5) Q_A^- réduit la quinone Q_B . L'arrivée d'un second électron sur Q_B^- déclenche la prise de deux protons et PQH_2 est libéré de son site et est remplacé par une plastoquinone PQ depuis un pool présent dans la membrane (Rutherford and Boussac 2004).

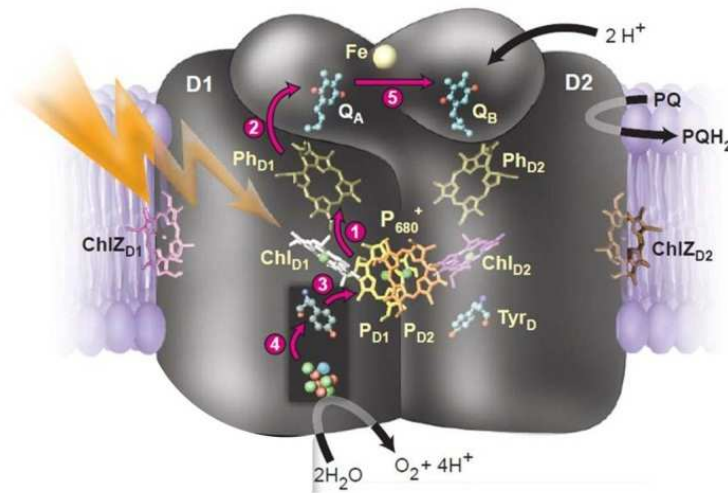
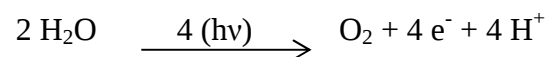


Figure 1.8 : Différentes étapes du transfert d'électron dans le PSII avec la chlorophylle (Chl), la phéophytine (Ph), les quinones (Q_A et Q_B) et la plastoquinone (PQ) (Rutherford and Boussac 2004).

L'oxydation de l'eau a lieu selon la réaction :



La réaction est réalisée par le complexe métallique Mn_4CaO_5 appelé aussi OEC (pour *Oxygen Evolving Complex*) (Figure 1.9A). Au cours du cycle catalytique, quatre réactions photochimiques ont lieu, pendant lesquelles les quatre atomes de manganèse se retrouvent sous différents degrés d'oxydation (Figure 1.9B) (Joliot 1968; Kok, Forbush et al. 1970; Retegan, Cox et al. 2014).

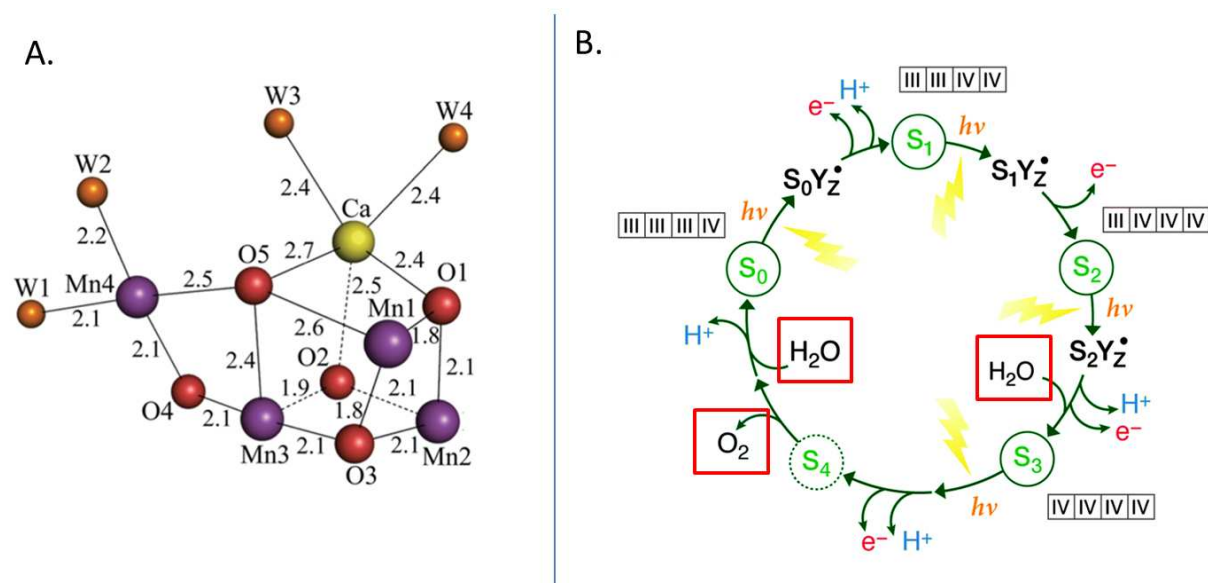


Figure 1.9 : (A) La structure du complexe Mn₄CaO₅ (OEC) déterminée à une résolution de 1.9 Å (pdb. 3ARC) avec les atomes de manganèse (violet), d'oxygène (rouge), l'ion calcium (jaune) et les molécules d'eau (orange). Les distances entre les atomes sont indiquées en Å (Kawakami, Umena et al. 2011). (B) Les différents états d'oxydation du complexe métallique Mn₄CaO₅. Le site actif de l'oxydation de l'eau passe par cinq états d'oxydation (S₀ à S₄) avant le dégagement d'une molécule de dioxygène. Les chiffres romains encadrés indiquent les degrés d'oxydation des 4 atomes de manganèse (Retegan, Cox et al. 2014).

1.2. Les cyanobactéries

Les cyanobactéries puisent leur énergie à partir de la lumière par photosynthèse pour réaliser la synthèse de leurs aliments. C'est grâce à la photosynthèse des cyanobactéries que l'oxygène est apparu sur terre il y a environ 3,8 milliards d'années contribuant ainsi à l'expansion de la vie. Cependant l'apparition de l'oxygène sur Terre a d'abord été une grande menace pour les organismes qui n'étaient pas adaptés à survivre dans un environnement oxydant. Par la suite, la grande disponibilité en O₂ a permis l'apparition de vie multicellulaire, grâce au processus de respiration oxydative. Selon la théorie endosymbiotique, les cyanobactéries sont à l'origine des chloroplastes dans les cellules végétales. Certaines espèces de cyanobactéries sont adaptées à des environnements extrêmes tels que les sources d'eau chaude. Elles peuvent supporter des températures élevées, des pH acides ou encore des conditions variables d'éclairement. Elles supportent des conditions agressives du milieu extérieur continuellement fluctuant grâce à des adaptations aux stress environnementaux variés et fréquents. Les cyanobactéries font de la photosynthèse oxygénique ; toutefois, certaines souches peuvent aussi pousser en anaérobie. Dans des habitats tels que les sources

d'eau chaudes qui peuvent présenter des taux élevés de H_2S , les cyanobactéries peuvent réaliser de la photosynthèse anoxygénique (Summerfield, Toepel et al. 2008).

1.2.a. La cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus*

Pour étudier la photosynthèse, nous utilisons comme organisme modèle au laboratoire la cyanobactérie thermophile *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Figure 1.10).

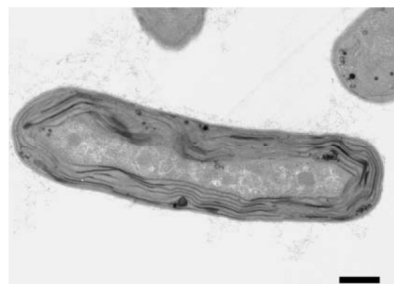


Figure 1.10 : La cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus*. Photographie de microscopie électronique, la barre d'échelle représente 0.5 μm (Boussac, Verbavatz et al. 2008).

Thermosynechococcus elongatus (*T. elongatus*) a été découverte dans une source d'eau chaude à Beppu au Japon en 1978 (Figure 1.11). Son génome a été entièrement séquencé en 2002 (Nakamura, Kaneko et al. 2002), ce qui a permis notamment de construire de nombreux mutants en utilisant des outils de biologie moléculaire. Le photosystème II des cyanobactéries thermophiles est beaucoup plus stable que celui des plantes. C'est grâce à l'utilisation de cyanobactéries thermophiles que les premières structures cristallographiques de PSII ont vu le jour en 2001. La structure obtenue à une résolution de 1.9 Å, publiée par l'équipe du Dr. J.R. Shen au Japon en 2011 (Kawakami, Umena et al. 2011) a été réalisée à partir d'un organisme proche de *T. elongatus* : *Thermosynechococcus vulcanus*.



Figure 1.11 : La source d'eau chaude à Beppu au Japon où a été trouvée la cyanobactérie *T. elongatus*. (Photo A. Boussac)

1.2.b. La sous-unité D1 codée par 3 gènes chez *T. elongatus*

La lumière est un facteur de l'environnement important ayant un impact majeur non seulement sur le métabolisme général mais aussi sur la croissance et le développement des cyanobactéries. La lumière est essentielle pour la photosynthèse mais elle peut aussi endommager le PSII. La protéine D1 est remplacée par une nouvelle copie toutes les 5 heures dans des conditions de faible lumière et toutes les 20 minutes en conditions de forte lumière (Edelman and Mattoo 2008). L'expression des gènes *psbA* codant la protéine D1 doit être strictement contrôlée pour garantir le fonctionnement de la machinerie photosynthétique dans des conditions environnementales changeantes. Chez les plantes supérieures, un seul gène code la protéine D1, alors que la présence de plusieurs gènes *psbA* codant la protéine D1 (allant jusqu'à 6) est courante chez les cyanobactéries (Mulo, Sicora et al. 2009).

La souche sauvage de *T. elongatus* possède trois gènes différents *tlr1843* (*psbA1*), *tlr1844* (*psbA2*) et *tlr1477* (*psbA3*) codant la protéine D1. Chez *T. elongatus*, parmi les 344 acides aminés constituant D1, il y a 21 substitutions d'acides aminés entre PsbA1 et PsbA3, 31 substitutions entre PsbA1 et PsbA2 et 27 substitutions entre PsbA2 et PsbA3 (Figure 1.12). Les trois gènes sont transcrits en proportion différente selon les conditions de culture (Sugiura, Ogami et al. 2012). Il a été par exemple montré que le gène *psbA1* est transcrit de façon constitutive dans les conditions standards de laboratoire. Le gène *psbA2* n'est quasiment pas transcrit dans des conditions de culture en aérobiose, certains auteurs parlent dans

ce cas de gènes cryptiques (Summerfield, Toepel et al. 2008) ou de gènes « silencieux » (Sicora, Ho et al. 2009). Le gène *psbA2* est faiblement transcrit dans des conditions de culture en microaérobie (Kos, Deak et al. 2008; Sicora, Ho et al. 2009). Le gène *psbA3* quant à lui est transcrit dans des conditions de stress de lumière (UV ou forte lumière) (Kos, Deak et al. 2008; Sander, Nowaczyk et al. 2010).

Nous avons au laboratoire la souche sauvage WT 43H qui porte une étiquette polyhistidine sur la protéine CP43 qui permet la purification par chromatographie d'affinité du photosystème II. Trois mutants de délétion de D1 sont dérivés de cette souche WT 43H. Dans chacun de ses mutants, une seule version du gène codant la protéine D1 est présente. La souche appelée WT*1 exprime uniquement le gène *psbA1*, la souche WT*2 uniquement le gène *psbA2* et la souche WT*3 uniquement le gène *psbA3*.

1.2.c. Différences entre les variants de D1

La caractérisation du PSII provenant des différents mutants et en particulier le lien entre la nature des interactions entre les cofacteurs et la protéine ainsi que les propriétés de ces cofacteurs sont étudiés au laboratoire. Cette recherche concerne à la fois les processus de régulation de la photosynthèse et la caractérisation des paramètres physico-chimiques qui participent à une optimisation du fonctionnement de l'enzyme. Plusieurs études approfondies concernant le mécanisme enzymatique du photosystème II des différentes souches de mutants WT*1, WT*2, WT*3 ont été publiées (Sugiura, Ogami et al. 2012; Sugiura, Azami et al. 2014; Sugiura and Boussac 2014; Sugiura, Ozaki et al. 2014). Les auteurs ont décrit précisément comment le changement de certains acides aminés de D1 entre les différents variants de D1 pouvait induire des changements au niveau des cofacteurs de la réaction enzymatique du PSII.

<i>T. elongatus</i> <i>psbA1</i> : tt1843	1	M	T	T	L	Q	R	R	E	S	A	N	L	W	E	R	F	C	N	W	V	I	S	T	D	N	R	L	Y	V	G	W	F	G	V	I	M	I	P	T	L	L	A	A	T	I	C	F	V	I	A	F	I	A	A	P	P	V	D	I	60	
<i>T. elongatus</i> <i>psbA2</i> : tt1844	1	M	T	T	L	Q	R	R	Q	T	A	N	L	W	E	R	F	C	D	W	I	T	S	T	E	N	R	L	Y	I	G	W	F	G	V	I	M	I	P	T	L	L	A	A	T	I	C	F	V	I	A	F	I	A	A	P	P	V	D	I	60	
<i>T. elongatus</i> <i>psbA3</i> : tt1477	1	M	T	T	V	L	Q	R	R	E	Q	L	N	L	W	E	Q	F	C	S	W	V	T	S	T	N	N	R	L	Y	V	G	W	F	G	V	L	M	I	P	T	L	L	A	A	T	I	C	F	V	I	A	F	I	A	A	P	P	V	D	I	60
<i>T. elongatus</i> <i>psbA1</i> : tt1843	61	D	G	I	R	E	P	V	S	G	S	L	L	Y	G	N	I	I	T	G	A	V	P	P	S	S	N	A	I	G	L	H	F	Y	P	I	W	E	A	A	S	L	D	E	W	L	Y	N	G	G	P	Y	Q	L	I	I	F	H	F	L	120	
<i>T. elongatus</i> <i>psbA2</i> : tt1844	61	D	G	I	R	E	P	V	S	G	S	L	L	Y	G	N	I	I	T	A	A	V	P	P	S	S	N	A	I	G	L	H	L	Y	P	I	W	D	A	A	S	L	D	E	W	L	Y	N	G	G	P	Y	Q	L	I	I	F	H	F	L	120	
<i>T. elongatus</i> <i>psbA3</i> : tt1477	61	D	G	I	R	E	P	V	S	G	S	L	L	Y	G	N	I	I	T	G	A	V	P	P	S	S	N	A	I	G	L	H	F	Y	P	I	W	E	A	A	S	L	D	E	W	L	Y	N	G	G	P	Y	Q	L	I	I	F	H	F	L	120	
<i>T. elongatus</i> <i>psbA1</i> : tt1843	121	L	G	A	S	C	Y	M	G	R	Q	W	E	L	S	Y	R	L	G	M	R	P	W	I	C	V	A	Y	S	A	P	L	A	S	A	F	A	V	F	L	I	Y	P	I	G	Q	G	S	F	S	D	G	M	P	L	G	I	S	G	T	F	180
<i>T. elongatus</i> <i>psbA2</i> : tt1844	121	I	G	I	F	C	Y	M	G	R	E	W	E	L	S	Y	R	L	G	M	R	P	W	I	P	V	A	F	S	A	P	A	A	T	A	V	L	L	I	Y	P	I	G	Q	G	S	F	S	D	G	L	M	L	G	I	S	G	T	F	180		
<i>T. elongatus</i> <i>psbA3</i> : tt1477	121	I	G	V	F	C	Y	M	G	R	E	W	E	L	S	Y	R	L	G	M	R	P	W	I	C	V	A	Y	S	A	P	A	A	T	A	V	F	L	I	Y	P	I	G	Q	G	S	F	S	D	G	M	P	L	G	I	S	G	T	F	180		
<i>T. elongatus</i> <i>psbA1</i> : tt1843	181	N	F	M	I	V	F	Q	A	E	H	N	I	L	M	H	P	F	H	Q	L	G	V	A	G	V	F	G	G	A	L	F	C	A	M	H	G	S	L	V	T	S	S	L	I	R	E	T	T	E	T	E	S	A	N	Y	G	Y	K	F	G	240
<i>T. elongatus</i> <i>psbA2</i> : tt1844	181	N	F	M	I	V	F	Q	A	E	H	N	I	L	M	H	P	F	H	M	L	G	V	A	G	V	F	G	G	A	L	F	A	A	M	H	G	S	L	V	T	S	S	L	I	R	E	T	T	E	T	E	S	T	N	Y	G	Y	K	F	G	240
<i>T. elongatus</i> <i>psbA3</i> : tt1477	181	N	F	M	L	V	F	Q	A	E	H	N	I	L	M	H	P	F	H	Q	L	G	V	A	G	V	F	G	G	A	L	F	S	A	M	H	G	S	L	V	T	S	S	L	I	R	E	T	T	E	T	E	S	A	N	Y	G	Y	K	F	G	240
<i>T. elongatus</i> <i>psbA1</i> : tt1843	241	Q	E	E	E	T	Y	N	I	V	A	A	H	G	Y	F	G	R	L	I	F	Q	Y	A	S	F	N	N	S	R	S	L	H	F	F	L	A	A	W	P	V	V	G	V	W	F	T	A	L	G	I	S	T	M	A	F	N	L	N	G	F	300
<i>T. elongatus</i> <i>psbA2</i> : tt1844	241	Q	E	E	E	T	Y	N	I	V	A	A	H	G	Y	F	G	R	L	I	F	Q	Y	A	S	F	N	N	S	R	S	L	H	F	F	L	A	A	W	P	V	V	G	I	W	F	A	L	G	I	S	T	M	A	F	N	L	N	G	F	300	
<i>T. elongatus</i> <i>psbA3</i> : tt1477	241	Q	E	E	E	T	Y	N	I	V	A	A	H	G	Y	F	G	R	L	I	F	Q	Y	A	S	F	N	N	S	R	A	L	H	F	F	L	A	A	W	P	V	I	G	I	W	F	T	A	L	G	I	S	T	M	A	F	N	L	N	G	F	300
<i>T. elongatus</i> <i>psbA1</i> : tt1843	301	N	F	N	H	S	V	I	D	A	K	G	N	V	I	N	T	W	A	D	I	I	N	R	A	N	L	G	M	E	V	M	H	E	R	N	A	H	N	A	H	N	F	P	L	D	L	A	344													
<i>T. elongatus</i> <i>psbA2</i> : tt1844	301	N	F	N	H	S	V	I	D	A	Q	G	N	V	I	N	T	W	A	D	I	I	N	R	A	N	L	G	I	E	V	M	H	E	R	N	A	H	N	A	H	N	F	P	L	D	L	A	344													
<i>T. elongatus</i> <i>psbA3</i> : tt1477	301	N	F	N	H	S	V	I	D	A	Q	G	N	V	I	N	T	W	A	D	I	I	N	R	A	N	L	G	M	E	V	M	H	E	R	N	A	H	N	A	H	N	F	P	L	D	L	A	344													

Figure 1.12 : Comparaison de la séquence en acides aminés de D1 codé par *psbA1*, *psbA2* et *psbA3*. Les caractères en gras de la séquence de PsbA1 correspondent aux acides aminés substitués avec PsbA2 (en bleu), avec PsbA3 (jaune), avec PsbA2 et PsbA3 (en vert). Les caractères (en rouge) montrent les différences entre PsbA2 et PsbA3 (Sugiura, Ogami et al. 2012).

Des différences phénotypiques ont aussi été mises en évidence au niveau cellulaire chez les différents variants de D1. Ogami et al (Ogami, Boussac et al. 2012) ont étudié des différences entre deux mutants de D1 : WT*1 (ne contenant que le gène *psbA1*) et WT*3 (ne contenant que le gène *psbA3*) en faible et forte lumière. Les auteurs ont montré que la souche WT*3 pousse plus vite que la souche WT*1 en faible ($10 \mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et forte lumière ($60 \mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figure 1.13). Les cellules de la souche WT*1 présentent une forme de haricot en faible et forte lumière comparé à la forme allongée de la souche WT*3 et WT 43H (contenant les 3 gènes *psbA*) (Figure 1.14) (Ogami, Boussac et al. 2012).

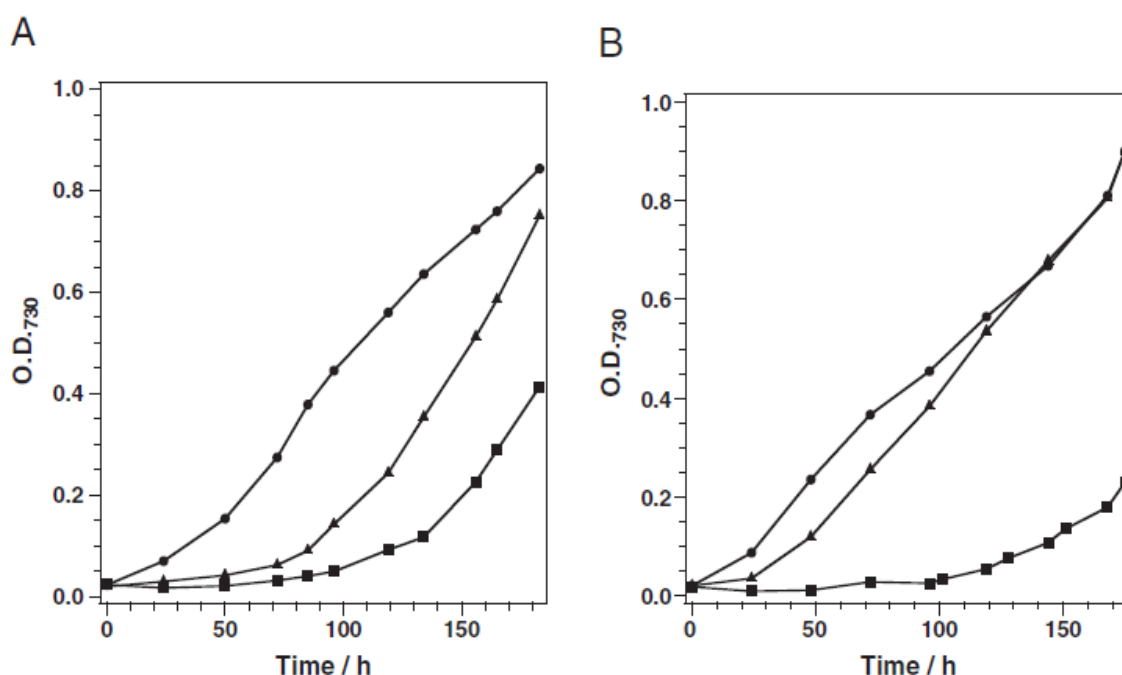


Figure 1.13 : Courbes de croissance des souches WT 43H (triangle), WT*1 ne contenant que *psbA1* (carré) et WT*3 ne contenant que *psbA3* (rond), en conditions (A) de faible lumière ($10 \mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et (B) de forte lumière ($60 \mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Ogami, Boussac et al. 2012).

La forme en haricot et la croissance ralentie des cellules de WT*1 pourraient-elle être due à une mauvaise division des cellules ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant de faire des études au niveau cellulaire et d'observer si certaines des protéines responsables de la division cellulaire chez *T. elongatus* sont régulées différemment selon le gène *psbA* exprimé (Miyagishima, Wolk et al. 2005; Marbouty, Saguez et al. 2009; Koksharova and Babykin 2011). Pour ce genre d'étude, il convient de mettre en place des outils permettant d'étudier l'ensemble des protéines de *T. elongatus*.

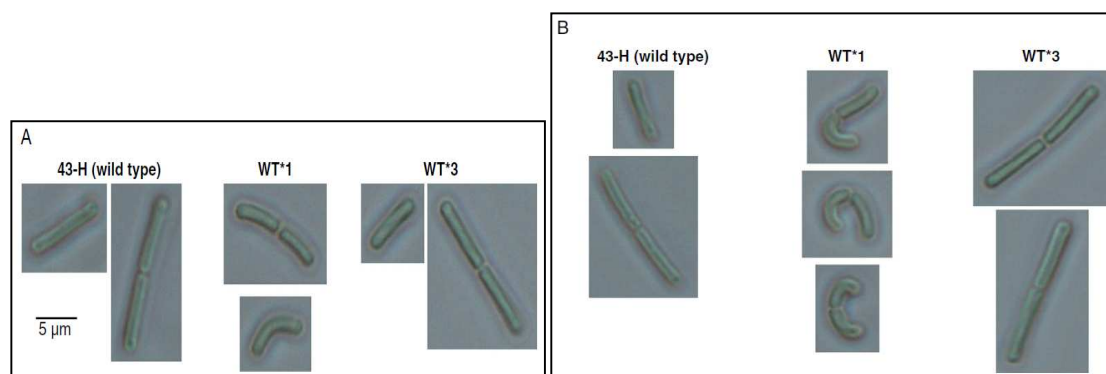


Figure 1.14 : Image de microscopie des souches de *T. elongatus*: WT 43H, WT*1, WT*3 en conditions (A) de faible intensité de lumière (10 $\mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et (B) de forte intensité de lumière (80 $\mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Ogami, Boussac et al. 2012).

Un des objectifs de ma thèse a été de mettre en place des outils de protéomique sur *T. elongatus*. Une différence connue entre les différents variants de D1 est l'expression de la protéine Tll0287 chez le variant WT*2. Cette hémoprotéine a été découverte au laboratoire (Boussac, Koyama et al. 2013). Lors de l'étude des différents variants de D1 avec des outils de protéomique, Tll0287 a été d'une grande utilité comme témoin des expériences. Les caractérisations physico-chimiques de l'hémoprotéine Tll0287 de *T. elongatus* seront développées dans le chapitre 4. Certaines propriétés d'un autre cytochrome de type c PsbV2 également découvert au laboratoire et exprimé dans la souche WT 43H seront présentées dans le chapitre 5.

1.3. Les cytochromes

Les hémoprotéines sont des protéines qui contiennent au moins un hème. Ils peuvent assurer diverses fonctions incluant la fixation réversible de l'oxygène moléculaire pour son transport (hémoglobines) ou son stockage (myoglobines), la réduction de l'oxygène en eau (cytochromes oxydases), les transferts d'électrons (cytochromes b et c), des fonctions monooxygénasiques (cytochrome P_{450}) et peroxydasiques (catalases, peroxydases). Un hème est constitué d'un groupement prosthétique : une porphyrine à fer, contenant quatre cycles pyrroles liés par des ponts méthiniques et substitués de différents groupes périphériques (Figure 1.15). Les porphyrines possèdent un système d'électrons π fortement conjugués. En raison de leur structure électronique particulière, les porphyrines sont des molécules très colorées qui absorbent dans le domaine de l'UV-visible et ont un spectre très caractéristique. Le spectre d'absorption électronique des cytochromes est sensible à l'état d'oxydoréduction.

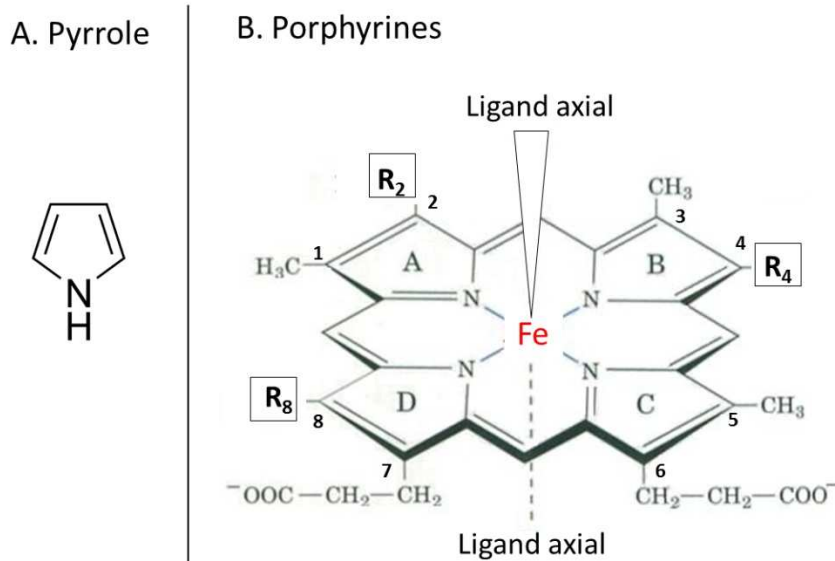


Figure 1.15 : (A) Noyau pyrrole, (B) porphyrine constituée de 4 noyaux pyrroles A, B, C, D. Les groupements méthyls 1,3 et 5 et le groupements 6 et 7 sont les groupes périphériques dérivés de la protoporphyrine IX.

Quatre bandes majoritaires sont désignées dans l'ordre des longueurs d'onde décroissantes par α , β , γ et δ . La bande γ est la plus intense, elle est couramment appelée bande de Soret. La forme réduite est souvent définie par la position des bandes α et β qui ont une position caractéristique en forme de « bonnet d'âne ».

Les hémoprotéines diffèrent dans la nature du groupe prosthétique et dans la composition en acides aminés de la protéine. La nature et la disposition des groupements périphériques de la porphyrine définissent trois grands types d'hèmes (a,b,c) (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Groupes périphériques (R_2 , R_4 et R_8) distinguant trois différents types d'hèmes selon la formule générale présentée en figure 1.15.

	R_2	R_4	R_8
Hème a	$-\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{O}$	$-\text{CH}=\text{CH}_2$	$-\text{CH}=\text{O}$
Hème b	$-\text{CH}=\text{CH}_2$	$-\text{CH}=\text{CH}_2$	$-\text{CH}_3$
Hème c	$-\text{CH}-\text{S}(\text{Cys})$	$-\text{CH}-\text{S}(\text{Cys})$	$-\text{CH}_3$

L'hème a sert de site à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau dans la cytochrome c oxydase.

L'hème b est présent dans les hémoglobines, myoglobines, cytochromes P450, catalases, peroxydases et cytochromes de type b.

L'hème c est obtenu par condensation de groupements vinyls avec une ou plusieurs cystéines peptidiques. Il se forme alors un ou plusieurs ponts thioéther. Le reste de la structure est identique à celle de l'hème b. Dans la chaîne polypeptidique, en général, deux acides aminés ou plus (X) séparent les deux résidus cystéines (C) des cytochromes de type c, on parle de motif CXXCH.

1.3.a. La conformation des métalloporyrines

La conformation des métalloporyrines dépend du nombre et de la nature des ligands axiaux. Les métalloporyrines présentent une flexibilité conformationnelle, inattendue chez des composés aussi fortement conjugués. Ces conformations mettent en jeu des rotations autour des ponts méthiniques, des liaisons Fe-N (pyrrole) ou des liaisons du noyau pyrrole (Shelnutt J 1998) (Figure 1.16).

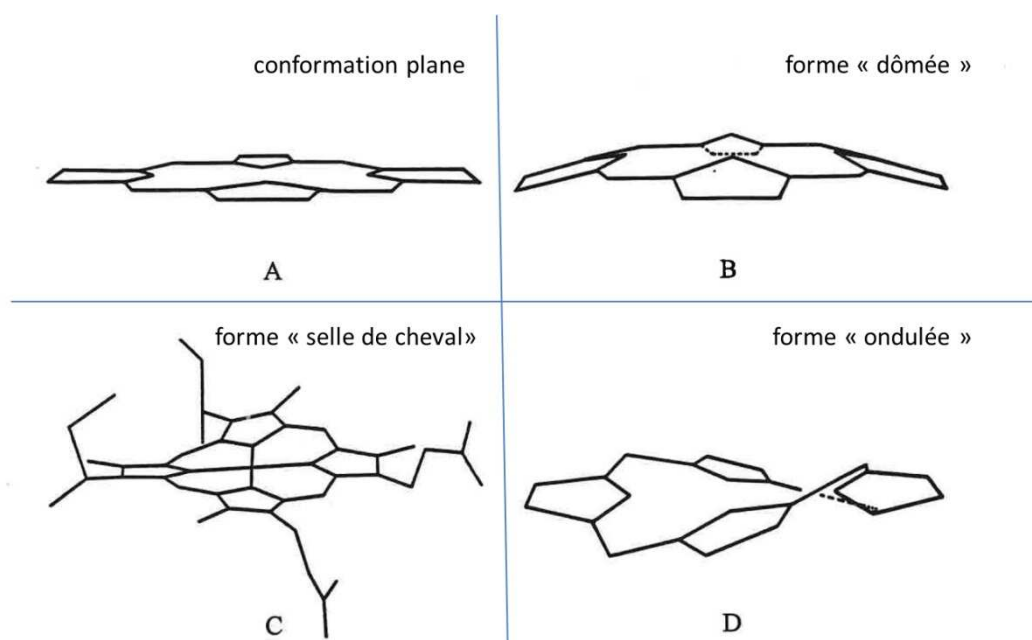
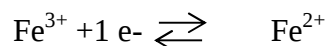


Figure 1.16 : Principales conformations adoptées par le squelette tétrapyrrolique de l'hème. (A) conformation plane à partir de laquelle 3 formes déformées sont définies : (B) dômée, (C) en selle de cheval et (D) ondulée (d'après la thèse de S. Othman, adapté de (Hu, Morris et al. 1993).

1.3.b. Propriétés d'oxydoréduction du fer hémique

Les cytochromes de type c interviennent très souvent dans le transfert d'électrons. La réaction d'oxydo-réduction d'un cytochrome implique 1 seul électron :



Le fer hémique peut se trouver dans une forme oxydée (Fe^{3+}) appelée ferrique ou réduite (Fe^{2+}) appelée ferreuse. La relation qui gouverne ce potentiel d'oxydo-réduction est l'équation de Nernst :

$$E/\text{ref} = E_0/\text{ref} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]}$$

Avec E/ref = potentiel de l'électrode en présence du couple redox

E_0/ref = potentiel redox moyen du couple redox considéré

R = constante des gaz parfaits (= 8,3144 J. K⁻¹.mol⁻¹)

n = nombre d'électron impliqués dans la réaction redox

F = constante de Faraday (= 96500 C.mol⁻¹)

T = température en Kelvin

1.3.c. Propriétés électroniques du fer hémique

Le fer dans sa forme ferrique (Fe^{3+}) possède 5 électrons d sur sa couche électronique externe. Ces 5 électrons peuvent occuper les orbitales moléculaires dans une forme bas- ou haut-spin (Figure 1.17). Le spin intermédiaire (3/2) existe aussi, il est rencontré chez certains cytochrome c' en équilibre avec la forme 5/2.

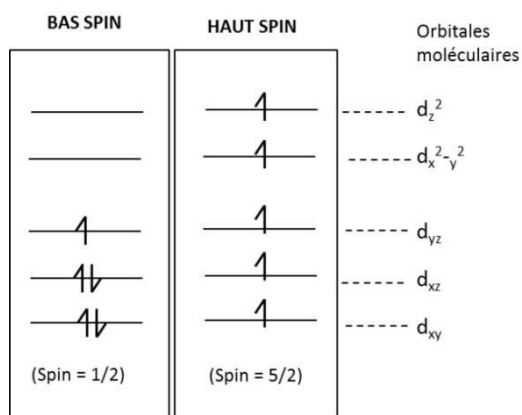


Figure 1.17 : Représentation de l'occupation des orbitales moléculaires du Fe^{3+} dans l'état bas spin (ou LS pour *Low Spin*) où $S = 1/2$ et haut spin (ou HS pour *High Spin*) où $S = 5/2$.

Dans le cas des hémoprotéines, la configuration bas-spin correspond à un ion ferrique 6-coordonné avec deux ligands axiaux de champ fort et la configuration haut-spin correspond à un ion ferrique 5- ou 6-coordonné, soit avec un seul ligand axial, soit avec un 6^{ème} ligand de champ faible comme par exemple H₂O.

Le fer dans sa forme ferreuse (Fe²⁺) possède 6 électrons d sur sa couche externe électronique qui sont répartis sur les différentes orbitales moléculaires. Le fer réduit peut alors se trouver dans une forme bas spin qui correspond à un hème hexacoordonné ou haut spin qui correspond à un hème pentacoordonné (Figure 1.18). On peut aussi avoir un spin intermédiaire (S=1).

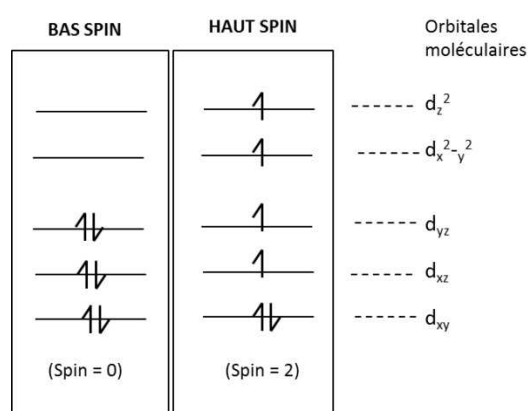


Figure 1.18 : Représentation de l'occupation des orbitales moléculaires du Fe²⁺ dans l'état bas spin (ou LS pour *Low Spin*) où S = 0 et haut spin (ou HS pour *High Spin*) où S = 2.

1.3.d. Les ligands du fer hémique

L'atome de fer des cytochromes présente 6 positions possibles de coordination. Quatre positions sont occupées par les azotes des groupes pyrroles et forment des liaisons Fe-N avec la porphyrine, ce sont les ligands équatoriaux. Deux autres positions de coordination peuvent être occupées par un ou deux ligands axiaux fournis par les résidus des chaînes latérales d'acides aminés de la protéine.

Lorsque le champ de ligand est faible, les électrons se répartissent pour occuper le plus grand nombre possibles d'orbitales afin de satisfaire la règle de multiplicité de Hund. Les complexes à l'état ferrique ou ferreux sont dans une forme haut spin (HS) (avec S = 5/2 ou S = 2).

En revanche, lorsque le champ de ligand est fort, les complexes à l'état ferrique ou ferreux sont dans une forme bas spin (avec S = 1/2 ou S = 0).

Le 6^{ème} ligand du fer peut être de différentes natures. Plusieurs publications dans la littérature ont étudié l'influence de la nature du 6^{ème} ligand axial de différents cytochromes de type c sur

la valeur du potentiel redox moyen (Kirilovsky, Roncel et al. 2004; Kilmartin, Maher et al. 2011). Pour Tll0287 et PsbV2, les structures cristallographiques ont permis de déterminer leur 6^{ème} ligand axial.

1.3.e. Les cytochromes de type c

Les cytochromes de type c ont un hème qui est attaché de façon covalente par deux liaisons thioéther avec les deux cystéines du motif de la signature CXXCH de la protéine. L'histidine du motif CXXCH est le 5^{ème} ligand du fer (Figure 1.19).

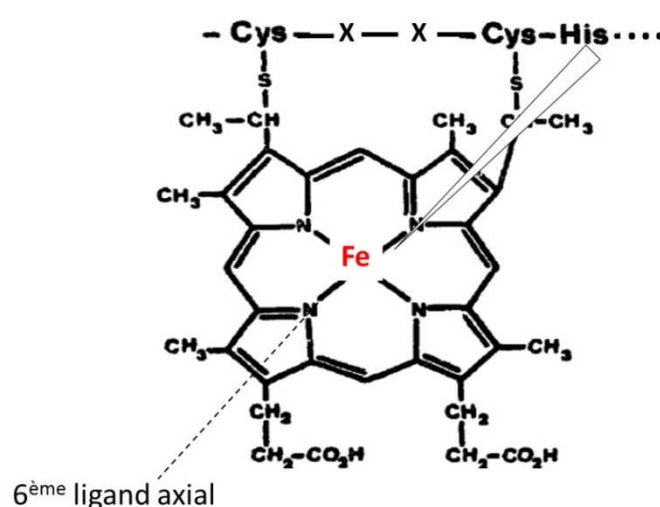


Figure 1.19 : Hème de type c avec le motif CXXCH.

1.3.f. Les cytochromes de type c de *T. elongatus*

Le cytochrome c_6 (Cyt c_6) et le cytochrome c_{550} (Cyt c_{550}) ont des rôles importants dans le transfert d'électron de la chaîne photosynthétique des cyanobactéries.

Le Cyt c_6 est codé par le gène *petJ*. Il a été retrouvé sous forme soluble dans le lumen des thylakoïdes où il catalyse le transport d'électron du cytochrome *b6f* au PSI, il peut aussi être un donneur d'électron à la cytochrome c oxydase dans la respiration (Bialek, Nelson et al. 2008). Le fer hémique a comme 6^{ème} ligand axial une méthionine.

Le Cyt c_{550} est codé par le gène *psbv1*. Avant d'avoir la structure cristallographique du PSII, Shen et al. ont montré que le Cyt c_{550} de *Synechococcus vulcanus* était associé de façon stochiométrique au complexe du PSII (Shen and Inoue 1993). La structure cristallographique a ensuite confirmé cette donnée. Le Cyt c_{550} a aussi été trouvé sous forme soluble (Kirilovsky, Roncel et al. 2004). La valeur de son potentiel redox moyen est encore discuté aujourd'hui

entre différentes équipes de recherches (Ishikita and Knapp 2005; Kaminskaya, Kern et al. 2005; Guerrero, Sedoud et al. 2010; Roncel, Kirilovsky et al. 2012). Dans ce cytochrome, le fer hémique a un 6^{ème} ligand axial qui est une histidine. Il a été montré que l'activité du PSII du mutant de délétion du Cyt c₅₅₀ de *T. elongatus* était diminuée de 35-40 %. Il a été proposé que le rôle du Cyt c₅₅₀ soit de stabiliser la fixation des ions Ca²⁺ et Cl⁻ qui sont essentiels à l'activité du PSII (Roncel, Boussac et al. 2003) et qu'il pourrait protéger la réduction du cluster de manganèse (Kirilovsky, Roncel et al. 2004). Chez la cyanobactérie *Synechocystis* 6803, le remplacement du gène *psbV1* (qui code Cyt c₅₅₀) par le gène *psbV2* de *T. elongatus* a été réalisé. Ce mutant présente une croissance photoautotrophique, à un niveau un peu réduit par rapport au sauvage. Les auteurs de ces expériences ont conclu que PsbV2 pouvait partiellement remplacer PsbV1 au niveau du PSII (Katoh, Itoh et al. 2001) .

Dans le génome de *T. elongatus*, le gène *psbV2* (locus *tll1284*) est localisé entre le gène *psbV1* (locus *tll1285*) codant le Cyt c₅₅₀ et le gène *petJ* codant le Cyt c₆ (locus *tll1283*). PsbV2 présente respectivement 38 % d'identité de séquence avec le Cyt c₅₅₀ et 29 % avec le Cyt c₆. Le cytochrome PsbV2 est présent en petite quantité dans la cellule, il a été découvert au laboratoire car il a été copurifié avec le Cyt c₅₅₀. Il a été retrouvé sous forme soluble en quantité représentant seulement 1% de la quantité du Cyt c₅₅₀ (Kerfeld, Sawaya et al. 2003). Un des objectifs de ma thèse a été de caractériser la physico-chimie et la structure du cytochrome de type c, PsbV2 (chapitre 5).

1.4. Objectifs

Le premier objectif du projet a été de mettre en place des outils de protéomique sur des extraits protéiques de *T. elongatus* pour étudier l'influence du remplacement du calcium par le strontium dans le milieu de culture de *T. elongatus* ainsi que l'effet de l'expression des différents variants de D1. Plusieurs études au niveau moléculaire avaient été réalisées au laboratoire sur le PSII et l'objectif était d'élargir l'étude des différents variants de D1 du niveau moléculaire au niveau cellulaire.

Le deuxième objectif a été de caractériser l'hémoprotéine Tll0287, un cytochrome de type c, exprimée uniquement dans la souche d'un des variants de D1 (où seul le gène *psbA2* code D1). Pour cela, des techniques d'absorption électronique et de résonance Raman ont été utilisées. L'effet du pH sur Tll0287 oxydé et réduit ainsi que la structure de l'hème et ses

différents ligands ont été étudiées. Des titrages redox sur cette hémoprotéine ont également été réalisées. Les différentes caractéristiques mises en évidence suggèrent que Tll0287 pourrait être un domaine senseur.

La troisième objectif été d'étudier un autre cytochrome de type c, PsbV2 de *T.elongatus*. Pour cela, une quantité suffisante de protéine était nécessaire. Un mutant de surexpression de PsbV2 avec le promoteur fort de l'enzyme de la rubisco a été réalisé lors d'un stage que j'ai effectué au Japon. Le potentiel redox très bas de PsbV2 et le spectre réduit ont pu être ensuite déterminés.

Les structures cristallographiques de Tll0287 et de PsbV2 réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr. Shen ont pu se rajouter aux caractérisations de ces deux cytochromes de *T.elongatus* découverts au laboratoire. Tll0287 et psbV2 ont un cuystéine comme 6^{ème} ligand axial mais les deux protéines présentent des caractéristiques particulières très différentes.

2. MATÉRIELS & MÉTHODES

2.1. Microbiologie	38
a. La bactérie <i>Escherichia coli</i>	38
b. La cyanobactérie <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	38
2.2. Biologie moléculaire : outils	40
a. Préparation d'ADN génomique de <i>T. elongatus</i>	40
b. Mutagenèse dirigée	41
c. Mini Préparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> par lyse alcaline	41
d. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne	42
e. Analyse de l'ADN par digestion enzymatique	42
f. Ligation	42
g. Bactéries <i>E. coli</i> compétentes pour transformation par choc thermique	43
h. Transformation par choc thermique d' <i>E. coli</i>	44
i. Transformation par électroporation de <i>T. elongatus</i>	44
j. Sélection de clones de <i>T. elongatus</i> après transformation	44
2.3. Biologie moléculaire : stratégies	45
a. Construction des mutants de délétion de Tll0287	45
b. Obtention des mutant de délétion de Tll0287	47
c. Expression hétérologue de PsbV2 chez <i>E. coli</i>	48
d. Expression de PsbV2 non mature chez <i>E.coli</i>	53
e. Expression homologue de PsbV2 chez <i>T. elongatus</i>	55
2.4. Biochimie : outils	58
a. SDS-PAGE	58
b. Purification de protéines	60
2.5. Biochimie : stratégies de purification	61
a. Séparation des fractions soluble et membranaire pour la purification	61
b. Purification du cytochrome PsbV2	62
c. Purification du cytochrome c ₆	63
d. Purification de l'hémoprotéine Tll0287	64

2.6. Immunologie	65
a. Production d'anticorps polyclonaux contre Tll0287	65
b. Test de dosage des anticorps	66
c. Western blot	67
d. Test de dosage enzymatique	68
2.7. Protéomique	69
a. Séparation des fractions soluble et membranaire pour l'électrophorèse 2D	69
b. Gels 2D des protéines de la fraction soluble	70
c. Gels 2D des protéines de la fraction membranaire	71
d. Reproductibilité des gels 2D	74
e. Numérisation et séchage des gels 2D	75
f. Spectrométrie de masse sur gels 2D	76
2.8. Biophysique	77
a. Spectroscopie d'absorption	78
b. Spectroscopie de diffusion Raman de résonance	79
c. Spectrométrie d'absorption atomique	81
2.9. Electrochimie – Titrage redox par spectroscopie d'absorption	81
a. Expériences au BIP	82
b. Expériences à l'IBPC	83
c. Expérience au CEA	84

2.1. Microbiologie

2.1.a. La bactérie *Escherichia coli*

Tous les constructions plasmidiques intermédiaires nécessaires à la création de souches mutantes de *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*) sont effectuées dans différentes souches bactériennes d'*Escherichia coli* (*E.coli*). Les souches d'*E.coli* : *DH5α* et *XL1 blue* sont utilisées pour l'amplification des constructions plasmidiques intermédiaires et la souche *BL21 (DE3)* comme hôte d'expression. La bactérie *E. coli* est cultivée soit en milieu LB, NZY ou SOC (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Composition des différents milieux de culture d'*E.coli*. Le pH des différents milieux est ajusté à pH 7. Les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 min.

Milieu	LB	NZY	SOC
Bactotryptone	10 g	10 g	20 g
Extrait de levures	5 g	5 g	5 g
NaCl	10 g	5 g	0,6 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	/	2 g	2,5 g
Glucose	/	/	3,6 g
KCl	/	/	0,2 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	/	/	2 g
H ₂ O	qsp 1L	qsp 1L	qsp 1L

2.1.b. La cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus*

Thermosynechococcus elongatus (*T. elongatus*) est cultivée dans du milieu DTN (Tableau 2.2) avec ajout de CaCl₂ ou de SrCl₂ dans des incubateurs (*New Brunswick Scientific, Innova 4340*) sous agitation rotative continue (120 rpm), une atmosphère enrichie en CO₂, à 45°C et lumière continue (80 μmol de photons/m²s). En phase exponentielle de croissance, le temps de génération de la souche sauvage est environ de 15 h (Boussac, Rappaport et al. 2004).

Tableau 2.2 : Composition (A) du milieu DTN ajusté à pH 7.6 et (B) de la solution de micronutriments. Les flacons de milieu DTN sont autoclavés 20 min à 120°C et ensuite 10 mM de NaHCO₃ sont ajoutés.

A.		B.	
DTN 1X	concentration finale	micronutriments	concentration finale
EDTA 2 Na	0.5 mM	H ₃ BO ₃	8 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.4 mM	MnSO ₄ , H ₂ O	13.5 mM
KNO ₃	1 mM	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1.7 mM
NaNO ₃	8.2 mM	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0.1 mM
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	40 mM	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.1 mM
FeNH ₄ (SO ₄) ₂ , 12H ₂ O	4 µM	CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0.3 mM
Na ₂ S ₂ O ₃	0.8 mM	(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄), 6H ₂ O	0.05 mM
Na ₂ SO ₃	2.4 mM	Na ₂ SeO ₄	0.02 mM
Tricine	16 mM	H ₂ SO ₄	0.5 mL/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 mM		
+ solution de micronutriments	0.5 mL/L		

Nous disposons de plusieurs souches de mutants de la protéine D1 du photosystème II de *T. elongatus* (Sugiura, Ogami et al. 2012).

WT 43H : il s'agit d'une souche de phénotype sauvage, possédant les 3 gènes *psbA1*, *psbA2* et *psbA3* qui codent la protéine D1. Cependant, des séquences codant une cassette de résistance à la kanamycine et une étiquette de six histidines ont été ajoutées à la suite du gène codant la sous-unité CP43 en vue de la purification du PSII par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel. Les 3 souches suivantes : WT*1, WT*2 et WT*3 sont dérivées de cette souche WT 43H.

WT*1 : dans cette souche mutante, seul le gène *psbA1* code la protéine D1. Une partie des gènes *psbA2* et *psbA3* est remplacée par une cassette de résistance au chloramphénicol, et une cassette de résistance à la streptomycine et à la spectinomycine.

WT*2 : chez ce mutant, seul le gène *psbA2* code la protéine D1. Une partie des gènes *psbA1* et *psbA3* est remplacée par une cassette de résistance à la streptomycine et à la spectinomycine, et une cassette de résistance au chloramphénicol.

WT*3 : pour ce mutant, seul le gène *psbA3* code la protéine D1. Une partie des gènes *psbA1* et *psbA2* est remplacée par une cassette de résistance au chloramphénicol.

Tableau 2.3 : Caractéristiques des différentes souches de mutants de D1 de *T. elongatus* en fonction du gène *psbA* exprimé et résistance aux antibiotiques. Km = kanamycine (40 µg/mL final), Sp = spectinomycine (10 µg/ml final), Sm = streptomycine (25 µg/ml final), Cm = chloramphenicol (5 µg/mL final).

souche de <i>T.elongatus</i>	gène(s) pour D1	résistance(s)
43H	<i>psbA1+psbA2+psbA3</i>	Km
WT*1	<i>psbA1</i>	Km/Sp/Sm/Cm
WT*2	<i>psbA2</i>	Km/Sp/Sm/Cm
WT*3	<i>psbA3</i>	Km/Cm

2.2. Biologie moléculaire : outils

2.2.a. Préparation d'ADN génomique de *T. elongatus*

La première étape avant d'amplifier de l'ADN de *T. elongatus* est d'en extraire l'ADN génomique. Pour ce faire, des cellules de *T. elongatus* cultivées en milieu liquide (1 mL) sont récoltées en phase exponentielle de croissance par centrifugation (5 000 g, 1 min). Le culot de cellules est remis en suspension dans 400 µL de tampon Tris EDTA (Tris HCl 10mM pH 8, EDTA 10 mM). Il est également possible d'extraire l'ADN de quelques colonies de cellules cultivées sur boîte. Dans ce cas, les cellules sont mises en suspension directement dans 400 µL de tampon Tris EDTA. Ensuite, un volume de 400 µL de phénol contenant 0.5 % de SDS (0.5%) est ajouté et mélangé. Après centrifugation (13000 g, 10 min, 4°C), la phase supérieure du surnageant est récupérée. Un mélange contenant 200 µL de phénol et 200 µL de chloroforme est ajouté puis mélangé. Après centrifugation (13 000 g, 10 min, 4°C), la phase supérieure est récupérée et additionnée de 400 µL de chloroforme pour éliminer toute trace de phénol résiduel. Le mélange est à nouveau centrifugé (13 000 g, 10 min, 4°C) et la phase supérieure (aqueuse) est récupérée. L'ADN est précipité par addition de 600 µL d'isopropanol froid. Le mélange est centrifugé (13 000 g, 10 min, 4°C) puis le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol froid à 70%. Le culot d'ADN est ensuite séché et remis en suspension dans 50 µL d'eau.

2.2.b. Mutagenèse dirigée

La méthode de mutagenèse dirigée utilisée consiste à synthétiser les deux brins du plasmide à muter avec une ADN polymérase particulière : la *Pfu turbo* provenant d'un organisme thermophile *Archaeum Pyrococcus furiosus* et réputée pour son faible taux d'erreur de réplication. Cette réaction de mutagenèse est réalisée avec le kit *Quickchange site directed mutagenesis* de *Stratagene* dans les conditions prescrites par le fournisseur. La réaction nécessite 2.5 unités d'enzyme, 125 ng de chaque amorce, 50 ng du plasmide et de l'eau en quantité suffisante pour avoir un volume final de 50 µL. Les produits d'amplification sont ensuite traités 2 heures à 37°C avec l'endonucléase *DpnI* afin d'éliminer la matrice ADN parentale méthylée. A ce stade, les plasmides néosynthétisés présentent des coupures simples brins. Après transformation, l'ADN est réparé dans la bactérie pour générer de l'ADN double brin muté.

2.2.c. Mini Préparation d'ADN plasmidique d'*E. coli* par lyse alcaline

Cette méthode consiste à extraire l'ADN plasmidique des bactéries par la méthode de lyse alcaline (Birnboim, 1979) et à le purifier. Une culture de bactéries en phase stationnaire (3 mL) est centrifugée (3 500 g, 3 min, 4°C). Le culot est resuspendu dans une solution I (100 µL de Tris HCl pH8, EDTA 10 mM, glucose 50 mM) conservée à 4°C. Puis une solution II (200 µL de NaOH 0.2 N, 1% SDS) est ajoutée au mélange qui est incubé sur la glace pendant 5 min pour lyser les bactéries. Enfin, une solution III (150 µL d'acétate de potassium 3M) conservée à 4°C est ajoutée afin de précipiter les protéines. Après une incubation sur glace (5 min), le mélange est centrifugé et du phénol est ajouté (400 µL) pour une première extraction des protéines. Toutes les centrifugations suivantes se font à 20 000g, 10 minutes à 4°C. Après une première centrifugation, la phase supérieure est additionnée d'un mélange composé de 200 µL de phénol et de 200 µL de chloroforme, le tout est centrifugé. La phase supérieure est lavée avec 400 µL de chloroforme afin d'éliminer le phénol puis le mélange est centrifugé. La phase supérieure (aqueuse) est récupérée et l'ADN est précipité par 600 µL d'éthanol 70 % glacial puis le mélange est centrifugé. Le culot d'ADN est séché puis repris dans 50 µL d'eau contenant de la RNaseA. Une alternative à cette méthode est l'extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline suivie d'une purification sur colonne d'affinité avec le

kit *QIAprep Miniprep de Qiagen*. Cette méthode plus coûteuse évite notamment l'utilisation contraignante de phénol et de chloroforme.

2.2.d. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour *Polymerisation Chain Reaction*) permet d'amplifier de l'ADN de façon exponentielle grâce à des enzymes thermostables. L'amplification est réalisée dans un mélange réactionnel contenant de l'ADN, de la Taq (pour *Thermophilus aquaticus*) polymérase (*super prime HF de Genetbio* pour l'ADN génomique et *rTAQ de Toyobo* pour de l'ADN plasmidique), le tampon approprié à la Taq polymérase, deux amorces (25 pmol chacune), $MgCl_2$ (2 mM), des dNTPs (0.2 mM) et de l'eau en quantité suffisante pour avoir un volume final de 50 μ L. Le cycle d'amplification comporte trois étapes : la dénaturation, l'hybridation avec la matrice et l'élongation.

2.2.e. Analyse de l'ADN par digestion enzymatique

Cette analyse permet de déterminer la présence de sites de restriction dans un fragment d'ADN après digestion par les enzymes de restriction correspondantes et ainsi de vérifier la nature et l'intégrité de l'ADN. Après digestion enzymatique, les fragments d'ADN sont séparés les uns des autres après migration sur un gel d'électrophorèse d'agarose (1% p/v). L'ADN est révélé par du bromure d'éthidium qui fluoresce lorsqu'il s'intercale dans la molécule d'ADN. Connaissant la taille attendue du fragment d'ADN (ou du plasmide) ainsi que sa carte de restriction (déterminée à partir de sa séquence théorique) et après comparaison de la taille des fragments obtenus par rapport à celles d'un marqueur de masse moléculaire, il est possible de vérifier la position des coupures réalisées et ainsi vérifier la nature de l'ADN digéré.

2.2.f. Ligation

La ligation consiste à lier deux fragments d'ADN bicaténaire, par exemple un ADN plasmidique (appelé vecteur) avec un autre fragment d'ADN (appelé insert). Le vecteur est digéré par une ou deux enzymes de restriction, il est ensuite purifié puis déphosphorylé pour éviter sa religation sur lui-même. L'enzyme utilisée pour la déphosphorylation est une phosphatase alcaline bactérienne purifiée (BAP pour *Bacterial Alkaline Phosphatase*) qui

hydrolyse les phosphates 5' de l'ADN. Le vecteur digéré est incubé en présence de l'enzyme BAP dans son tampon (Tris HCl 10 mM, pH8) pendant 1 heure à 37°C. L'insert, qui peut être un fragment d'ADN issu d'une PCR ou provenant d'un autre plasmide, est digéré avec les mêmes enzymes que le vecteur. Après séparation sur un gel d'agarose (1% p/v), le vecteur et l'insert sont purifiés à l'aide du kit *Genelute spin column*. L'ADN purifié est quantifié suite à une seconde électrophorèse par comparaison avec une série de marqueurs calibrés. Le vecteur et l'insert sont incubés 1 h 30 à 16°C avec de la T4 DNA ligase. Le produit de ligation est ensuite intégré dans une bactérie par transformation.

2.2.g. Bactéries *E. coli* compétentes pour transformation par choc thermique

Le principe consiste à perméabiliser les membranes bactériennes lors d'un traitement chimique.

Tableau 2.4 : Composition des tampons 1 et 2 pour la préparation de bactéries compétentes.

Tampon 1	Concentration finale	Tampon 2	Concentration finale
RbCl	100 mM	MOPS	10 mM
MnCl ₂ , 4H ₂ O	50 mM	RbCl	10 mM
CH ₃ COOK	30 mM	CaCl ₂ , 2H ₂ O	75 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 mM	Glycérol	15 % (p/v)
Glycérol	15 % (p/v)	H ₂ O mQ	qsp volume choisi
H ₂ O mQ	qsp volume choisi	pH ajusté à pH 6,8 avec NaOH	
pH ajusté à pH 5,8 avec de l'acide acétique		Solution stérilisée par filtration	
Solution stérilisée par filtration			

Une culture de 100 mL de la souche *XL1 blue* d'*E.coli* en phase stationnaire (DO = 0,7 à 600 nm) est centrifugée à 5 000 g, 8 minutes à 4°C, le culot est repris dans un volume (30 mL) de tampon 1 froid (Tableau 2.4). Le mélange est laissé 30 minutes à incuber sur glace. Après une centrifugation de 8 minutes à 5 000 g, le culot est repris dans un volume (8 mL) de tampon 2 froid (Tableau 2.4). Le mélange est laissé 30 minutes à incuber sur glace. Le mélange est ensuite réparti dans des tubes (200 µL) qui sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide pour être ensuite stockés à -80°C. Ces bactéries ainsi préparées pourront être transformées par choc thermique.

2.2.h. Transformation par choc thermique d'*E. coli*

Cette méthode de transformation consiste à introduire un ADN plasmidique dans une bactérie par choc thermique selon la méthode de Hanahan. Les cellules compétentes (100 μ L) sont mélangées avec le produit de ligation (20 μ L) ou de mutagenèse. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les cellules sont placées 40 secondes à 42°C puis transférées immédiatement sur glace pendant 2 minutes. Du milieu riche SOC (500 μ L) (voir Tableau 2.1) est ajouté puis les cellules sont mises sous agitation 1 heure à 37°C. Différents volumes de cellules (10-50 et 200 μ L) sont ensuite étalées sur milieu sélectif dans une boîte de Pétri.

2.2.i. Transformation par électroporation de *T. elongatus*

La transformation de cyanobactéries *T. elongatus* consiste à introduire de l'ADN plasmidique dans la cyanobactérie par choc électrique. L'ADN plasmidique dont la concentration finale doit être supérieure à 300 ng/ μ L est préparé avec le kit *QiaPrep de Qiagen* et l'ADN est élué dans de l'eau. Des cellules compétentes sont préalablement préparées de la façon suivante. Des cellules *T. elongatus* (50 mL) ayant atteint une DO à 730 nm comprise entre 0.5 et 1 sont centrifugées (3500 g, 5 min, 20°C). Le culot est repris dans 100 mL de tampon (Tricine 2mM pH8, EDTA 1mM). Les cellules sont centrifugées (3500 g, 5 min, 20°C) puis lavées dans de l'eau stérile (50 mL). Après centrifugation (3500 g, 5 min, 20°C), les cellules sont à nouveau lavées dans de l'eau stérile (25 mL). Ces étapes de lavage fragilisent les membranes. Le culot est repris dans un petit volume d'eau stérile à température ambiante, la DO à 730 nm calculée doit être environ de 60. Une quantité de plasmide (4 à 8 μ g de plasmide dans un volume inférieur à 15 μ L) est mélangée avec les cellules compétentes (40 μ L) puis laissée sur glace 2 minutes. Un choc électrique est appliqué, puis du milieu DTN (voir Tableau 2.1) avec bicarbonate est immédiatement ajouté. Les cellules sont laissées à 45 °C à la lumière sous agitation puis étalées sur une boîte de Pétri.

2.2.j. Sélection de clones de *T. elongatus* après transformation

Après transformation, les cellules sont étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu DTN gélosé en présence de la moitié de la quantité d'antibiotique requise pour la sélection. Si la transformation s'est bien déroulée, des petites colonies vertes sont visibles sur boîte après 7 à

14 jours. Il est possible de bien différencier les colonies qui font environ 0.2 cm de diamètre. Après 2 à 3 semaines. Chaque colonie est repiquée sur une 2^{ème} boîte contenant cette fois la quantité d'antibiotique requise pour la sélection. Après environ 7 jours, l'ADN génomique est analysé par PCR ou par digestion enzymatique. Les clones ayant le profil de restriction attendu sont repiqués sur une 3^{ème} boîte de Pétri contenant du milieu DTN gélifié et les antibiotiques. Une culture en milieu liquide est lancée à partir de cette 3^{ème} boîte. Puis l'ADN est séquencé au laboratoire. Il est indispensable de vérifier la séquence en nucléotides des constructions obtenues après amplification par PCR et notamment suite à l'insertion d'une mutation. Pour les expériences effectuées au Japon, l'ADN est séquencé directement par le laboratoire sur un appareil de *Beckman Coulter – Genome LabGeXP – Genetic analysis system*.

2.3. Biologie moléculaire : stratégies

Toutes les expériences décrites selon les stratégies suivantes dans le laboratoire de Miwa Sugiura au Japon ont été effectuées pendant mon stage en Juillet 2013. Les figures notées (*MS) ont été réalisées par le Dr. Miwa Sugiura.

2.3.a. Construction des mutants de délétions de *tll0287*

La stratégie de construction du plasmide permettant de supprimer le gène *tll0287* dans des souches de *T. elongatus* est composée de trois étapes. Les deux premières étapes consistent à récupérer les régions 5' et 3' du gène codant Tll0287 pour les insérer de part et d'autre d'une cassette de résistance à la gentamycine (Gm^R). Dans la troisième étape le gène *tll0287* est remplacé par le gène *tll0287* muté dont la partie centrale a été remplacée par une cassette de résistance à la gentamycine. Le gène muté est ensuite intégré dans le génome de *T. elongatus* par recombinaison homologue à la place du gène *tll0287*. Des mutants de délétion du gène codant *tll0287* sont ainsi obtenus à partir des différentes souches des mutants de D1.

* Clonage et insertion de la région 3' de *tll0287*

La première partie du clonage consiste à insérer la région 3' du gène *tll0287* en aval de la cassette de résistance à la gentamycine (Gm^R) portée par le plasmide [pUE-5'Gm] (Figure 2.1). Pour cela, l'ADN génomique de *T. elongatus* est extrait et la partie 3' du gène *tll0287* [*tll0287*-3'] est amplifiée par PCR. Les amorces utilisées permettent d'ajouter de part et

d'autres les sites de restriction *Sac* I et *Eco*RI. Après purification par extraction au phénol-chloroforme, le produit PCR est digéré avec les enzymes *Sac* I et *Eco*RI ainsi que le plasmide [pUE-5'Gm]. Après purification et ligation de ces fragments digérés, le plasmide obtenu est appelé [pUE-5'Gm-tll3'] : il contient la cassette Gm^R suivie de la partie 3' du gène *tll0287*.

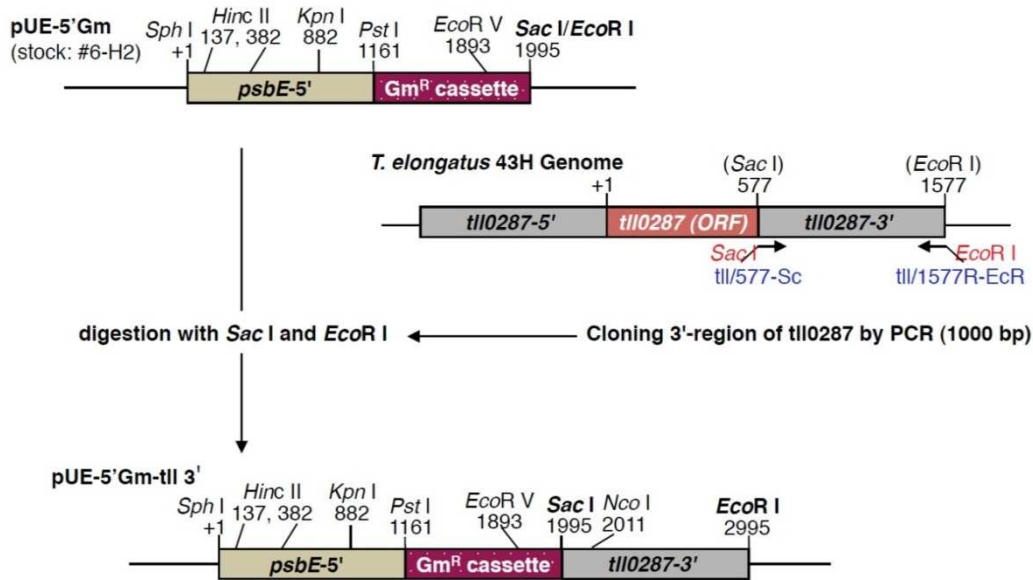


Figure 2.1 (*MS) : Clonage et insertion de la région 3' de *tll0287*.

Amorce tll/577-Sc : 5'-tttttgagctcGGAGGTGCTCCCATGGCC-3'.

Amorce tll/1577R-EcR : 5'-aaaaagaattcTCCGTAGCAATATCAAGGAACAGG-3'.

** Clonage et insertion de la région 5' de *tll0287*

La deuxième partie du clonage consiste à insérer la région 5' du gène *tll0287* en amont de la cassette de résistance à la gentamycine (Figure 2.2) selon un protocole similaire à celui décrit pour la région 3', à l'exception des enzymes de restriction utilisées qui sont ici *Sph* I et *Pst* I. Le plasmide obtenu, contenant les régions 5' et 3' du gène codant Tll0287 flanquant de part et d'autre la cassette de résistance à la gentamycine (Gm^R) est appelé pUΔUtl0287.

*** Délétion du gène *tll0287*

Les souches de *T. elongatus* WT 43 H, WT*1, WT*2 et WT*3 sont transformées par choc électrique avec le plasmide pUΔUtl0287. Après transformation, les clones bactériens sont sélectionnés sur boîte de Pétri contenant de la gentamycine et le (ou les) autre(s) antibiotique(s) approprié(s).

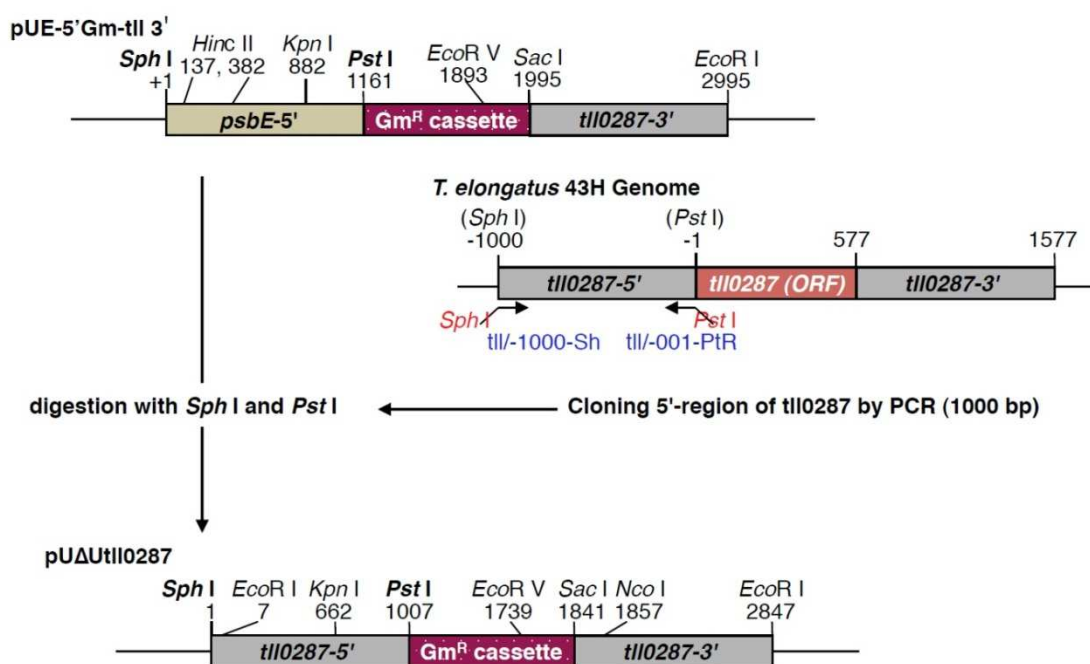


Figure 2.2 (*MS) : Clonage et insertion de la région 5' de *tll0287*.

Amorce *tll/-1000-Sh* : 5'-tttttgcacgcGCCTTGGTATCCACAGCCATTCCG-3'.

Amorce *tll/-001-PtR* : 5'-aaaaaactgcagAGAAATGACCTCTCTATTAAATT-3'

2.3.b. Obtention des mutant de délétion de *Tll0287*

Plusieurs colonies ont été obtenues sur milieu sélectif après transformation de *T. elongatus* (Figure 2.3) qui ont été ensuite repiquées et criblées par PCR (Figure 2.4). La taille des produits amplifiés du cadre ouvert de lecture de *tll0287* est de 1240 paires de bases dans le témoin négatif qui est la souche WT 43H non modifiée (à droite du gel). Lorsqu'une partie du gène est remplacée par la cassette de résistance à la gentamycine, la taille des produits amplifiés est alors de 1500 paires de bases. Nous pouvons observer que tous les mutants présentent une bande unique de 1500 paires de bases indiquant une ségrégation complète. Nous disposons désormais au laboratoire des différents mutants de délétion : WT 43H/ $\Delta tll0287$, WT*1/ $\Delta tll0287$, WT*2/ $\Delta tll0287$, WT*3/ $\Delta tll0287$.

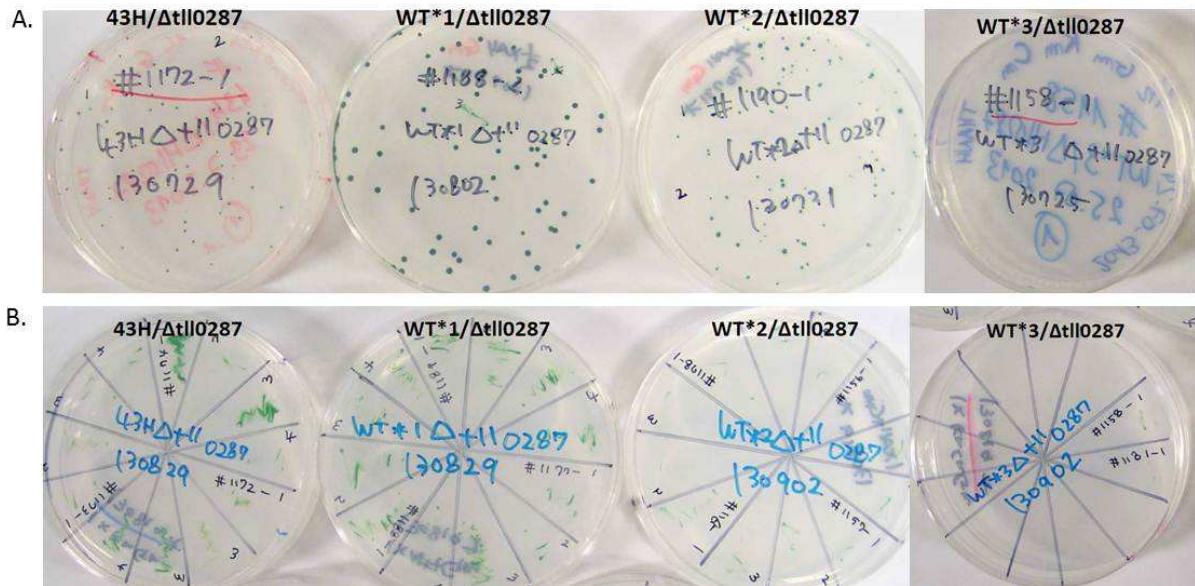


Figure 2.3 : Mutants de délétion de *tII0287*. Colonies de *T. elongatus* obtenues sur boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif sélectif (avec gentamycine) après transformation (A) et repiquées à partir des colonies des boîtes présentées en A (B).

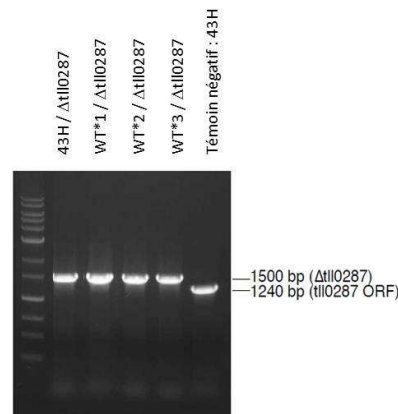


Figure 2.4 : Produits PCR issus des différentes souches de mutants dont une partie du gène *tII0287* a été remplacée par une cassette de résistance à la gentamycine. Gel d'agarose (1%).

2.3.c. Expression hétérologue de *PsbV2* chez *E. coli*

Plusieurs exemples dans la littérature ont montré qu'il est possible de sur-exprimer de façon hétérologue des cytochromes de type c chez *E. coli*. Pour exprimer un cytochrome de type c, il est important que celui-ci soit adressé au périplasme d' *E. coli* pour être correctement maturé (Thony-Meyer, Fischer et al. 1995). Une exception a cependant été observée pour le cytochrome c_{552} d'*Hydrogenobacter thermophilus*, comme l'ont montré les travaux de Sambongi et al. (Sambongi and Ferguson 1994). Ce cytochrome a pu être exprimé et maturé dans le cytoplasme d'*E. coli*. Les auteurs ont attribué la formation de ce cytochrome de type

c à un attachement spontané cytoplasmique de l'hème à la protéine thermostable correctement repliée. Ces travaux révèlent la complexité de la synthèse des cytochromes c chez *E. coli* (Keightley, Sanders et al. 1998). Plusieurs exemples dans la littérature ont montré qu'il est indispensable de rajouter des facteurs de maturation des cytochromes de type c pour surexprimer de façon hétérologue certains cytochromes de type c chez *E. coli* (Cho, Pakrasi et al. 2000; Sanders and Lill 2000). Le système de maturation des cytochromes de type c chez *E. coli* est un mécanisme complexe qui fait encore l'objet d'un grand nombre de recherches et de publications. Différentes protéines portées par le plasmide pEC86 sont nécessaires pour la maturation des cytochromes de type c chez *E. coli*. Le système I comprend dix protéines Ccm (pour *Cytochrome C Maturation*) (Figure 2.5). Dans le modèle d'étude de ce système (Kranz, Richard-Fogal et al. 2009; Richard-Fogal and Kranz 2010), deux grandes étapes ont été décrites. Premièrement, le complexe protéique CcmABCD utilise l'hydrolyse de l'ATP pour délivrer l'hème oxydé à la protéine chaperone CcmE, puis l'hème est délivré de l'holoCcmE au complexe CcmFH où il est réduit probablement par une quinone de la membrane pour être ensuite transféré à l'apocytochrome c. La régulation du système de maturation est très contrôlée chez *E. coli*, les gènes impliqués dans le processus de maturation (CcmA-H) sont organisés en opéron. Ces gènes sont exprimés seulement en conditions anaérobiques et en présence de nitrate. Cependant dans certains cas, l'expression hétérologue de cytochromes de type c a été possible en conditions aérobiques (Thony-Meyer, Fischer et al. 1995). Une solution a été trouvée pour s'affranchir de cette régulation très contrôlée, en transférant les gènes CcmA-H du locus chromosomique sur un plasmide, rendant ainsi l'expression de ces gènes constitutive (Thony-Meyer, Fischer et al. 1995; Sanders and Lill 2000). Le plasmide portant tous les gènes nécessaires à la maturation des cytochromes de type c du système I est appelé pEC 86 (Schulz, Fabianek et al. 1999).

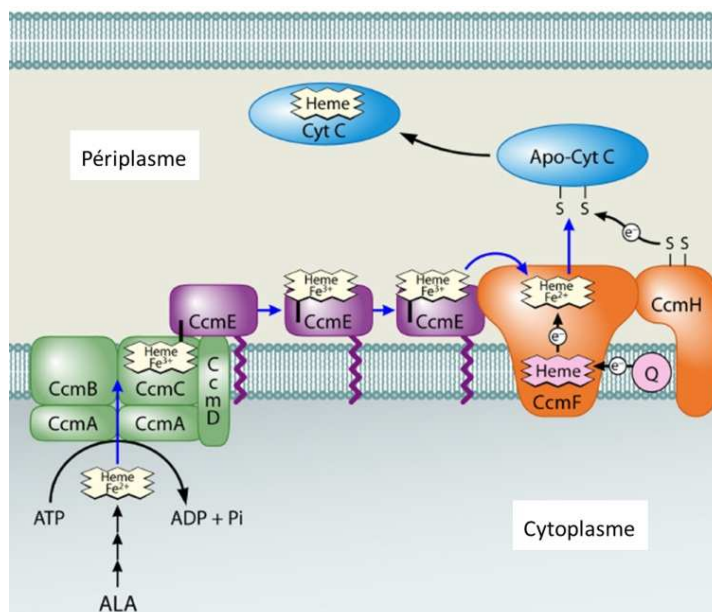


Figure 2.5 : Modèle d'étude du système I de maturation des cytochromes de type c chez *Escherichia coli*. Adapté de (Kranz, Richard-Fogal et al. 2009). Les significations des différentes abréviations sont : ALA pour acide alpha lévulinique qui est un précurseur de l'hème, Ccm pour *Cytochrome C Maturation*, Q pour quinone.

* Plasmides utilisés

Le plasmide pET-22b+ (Figures 2.6 et 2.7) porte la séquence signal *pelB* spécifique pour adresser les protéines au périplasma et une séquence à l'ampicilline (Amp^r). Le promoteur et le terminateur T7 se situant de part et d'autres du MCS (*Multiple Cloning Site*) permettent de séquencer les fragments clonés avec des amorces spécifiques au promoteur et au terminateur T7. Dans ce système, le gène cloné dans le MCS est placé sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase T7. L'expression de l'ARN polymérase de T7 est activée par le génome de l'hôte via un promoteur inductible à l'IPTG, qui transcrit une phase ouverte de lecture placée en amont du promoteur T7 dans le plasmide pET.

Le plasmide pEC86 contient l'opéron complet des facteurs de maturation des cytochromes de type c contenant les 8 gènes (*CcmABCDEFGH*) qui sont exprimés de façon constitutive (Arslan 1998). Ce plasmide contient aussi une séquence de sélection conférant une résistance au chloramphénicol (Cm^R). J'ai pris contact avec deux laboratoires afin d'obtenir une souche d' *E.coli* BL21(DE3) transformée avec le plasmide pEC86 (Dr. Stuart Ferguson, Oxford, Angleterre et Dr. Soufian Ouchane, CNRS de Gif sur Yvette, France).

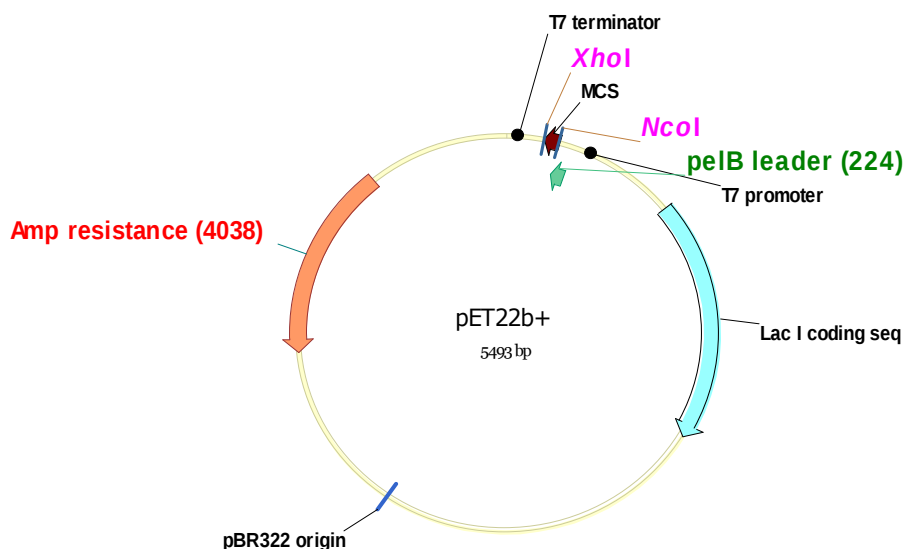


Figure 2.6 : Schéma du plasmide pET-22b+ (Novagen)

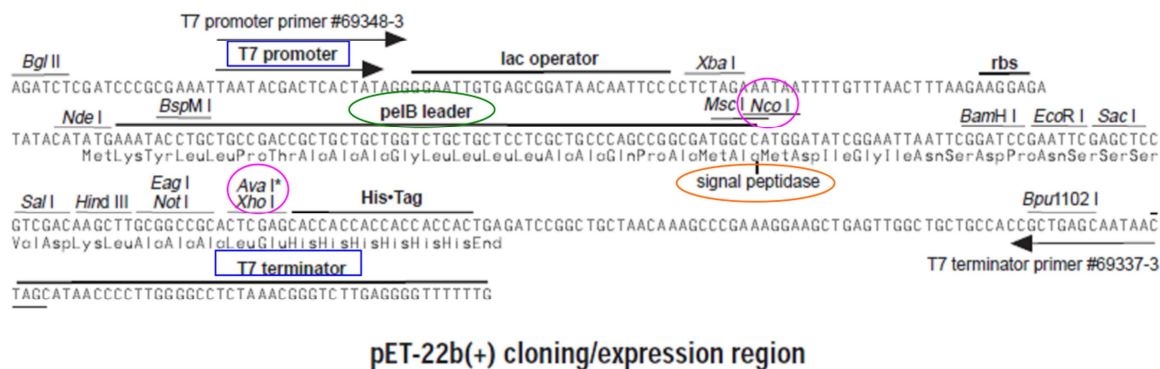


Figure 2.7 : Séquence de la région de clonage et d'expression du plasmide pET-22b+ .Le peptide signal est entouré en vert, la peptidase signal est entourée en orange, le promoteur et le terminateur T7 sont entourés en bleu et les sites des deux enzymes de restriction utilisées pour le clonage de psbV2 sont entourées en rose.

Trois étapes sont nécessaires pour insérer le gène *psbV2* dans le plasmide pET-22b+ et pour le transférer dans la souche contenant pEC86 : i) insertion du gène *psbV2* dans le plasmide pET-22b+ , ii) correction des mutations induites, iii) transfert du plasmide pET-22b+ contenant le gène *psbV2* dans différentes souches *BL21* d'*E.coli* (contenant ou non le plasmide pEC86).

* * Insertion du gène *psbV2* dans le plasmide pET-22b+

Le gène *psbV2* est amplifié à partir de l'ADN génomique de *T. elongatus* par PCR avec les amorces 1 et 2 (Figure 2.8) contenant les sites de restriction de *Nco* I et *Xho* I. Le fragment de PCR ainsi que le vecteur pET-22b+ sont digérés par ces deux enzymes de restriction. Après purification et déphosphorylation, les deux fragments d'ADN sont ligués pour former le plasmide [pET-22b+ + *PsbV2*]. Des bactéries XL1-Blue sont transformées par choc thermique avec ce produit de ligation afin d'amplifier ce nouveau plasmide. A l'issue de cette transformation, les ADN plasmidiques de dix colonies bactériennes sont extraits. Un plasmide ayant les bons profils de restriction est sélectionné puis séquencé pour vérifier qu'il contient bien le gène *psbV2*.

Amorce 1 (38 bases)
 5' - CG CTA TCC GCC ATG GCC GGG GTT GAT AAC TAT GTG ATC - 3'
Nco I

Amorce 2 (34 bases)
 5' - C CGC ATG GCT CTC GAG CTA GGG GGC ACT GTC CGG - 3'
Xho I

Figure 2.8 : Amorces utilisées pour amplifier le gène *psbV2* par PCR à partir de l'ADN génomique de *T. elongatus*. Les sites de restriction insérés lors de la PCR sont représentés en caractères soulignés et en rose. Les bases identiques à celles de la séquence de *psbV2* sont indiquées en italique.

* * * Correction du plasmide [pET-22b+ -*psbV2*] par mutagenèse dirigée

Pour cloner le gène *psbV2* dans le plasmide pET-22b+, deux nouveaux sites de restriction enzymatique ont été introduits avec les amorces. Ces changements volontaires ont entraîné un changement d'acides aminés dans la séquence peptidique. Ces mutations sont corrigées par mutagenèse dirigée avec les amorces 5 et 6 (Figure 2.9).

Amorce 5 (27 bases)
 5' - CCG GCG ATG GCC gcG GCC GGG GTT GAT - 3'

Amorce 6 (27 bases)
 5' - ATC AAC CCC GGC CGC GGC CAT CGC CGG - 3'

Figure 2.9 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée sur le gène *psbV2* de *T. elongatus* introduit dans le plasmide pET-22b+. Le fragment de la séquence correspondant à pET-22b+ est en bleu turquoise et les fragments de la séquence correspondant au gène *psbV2* sont en rose.

Les produits de la mutagenèse dirigée sont ensuite réintroduits dans des bactéries *E.coli XL1-Blue* par transformation. Des clones sont sélectionnés sur boîte contenant du milieu LB avec ampicilline puis l'ADN plasmidique d'un clone avec un bon profil de restriction est sélectionné et vérifié par séquençage. Ce plasmide est ensuite introduit par transformation dans des souches d'*E.coli BL21(DE3)* contenant ou pas le plasmide pEC86.

2.3.d. Expression de PsbV2 non mature chez *E.coli*

Plusieurs souches de bactéries *E.coli BL21(DE3)* ont été cultivées une nuit à 37°C. La souche qui n'a pas subi de transformation et celle qui contient pEC86 servent de souches témoins comparées à celle contenant les deux plasmides [pET-22b+ + *psbV2*] et pEC86. Les souches sont ensuite diluées pour avoir une DO ($\lambda = 600$ nm) de 0,3. La température est diminuée à 28°C et la surexpression est induite par addition l'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG à 0.4 mM final) quand la culture atteint une DO ($\lambda = 600$ nm) de 0.6. A ce stade, l'acide δ -amino lévulinique (1 mM final) qui est un précurseur de l'hème peut aussi être ajouté.

Dans l'expérience suivante, les bactéries BL21(DE3) avec ou sans plasmide pEC86 sont les témoins négatifs. Une souche d'expression d'*E. coli* BL21(DE3) contenant déjà le plasmide (pEC86) est transformée avec le plasmide [pET-22b+ + *psbV2*]. Les souches bactériennes (BL21(DE3)), (BL21 (DE3) + pEC86) et (BL21 (DE3) + pEC86 + [pET-22b+ + *psbV2*]) ont été induites. Les cultures ont été placées à 28°C car à cette température, il y a moins de risque de former des corps d'inclusion qu'à 37°C. Après 6 et 24h d'induction, les protéines extraites d'*E. coli* sont analysées sur gels SDS-PAGE colorés soit avec du bleu de Coomassie (Figure 2.10A) soit avec une coloration spécifique des protéines à hème, le TMBZ (Figure 2.10B).

Une protéine contenant un hème (Figure 2.10B) est présente dans les lysats bactériens d'*E. coli* BL21 contenant les facteurs de maturation (+ pEC 86) et le plasmide [pET-22b+ + *psbV2*] (en rose) mais aussi dans ceux contenant uniquement les facteurs de maturation (+ pEC 86) (en bleu). Cette bande ne correspond donc pas à l'expression du gène *psbV2*. Il correspond forcément à une protéine exprimée par le plasmide pEC86, car dans le lysat bactérien de la souche (BL21(DE3)) ne contenant pas le plasmide pEC86 (en noir), cette bande supplémentaire n'est pas observée. La bande supplémentaire observée après 6h et 24h d'induction (en bleu et en rose) pourrait correspondre à la protéine CcmE qui a une masse moléculaire prédite de 18 300 Da et qui contient un hème.

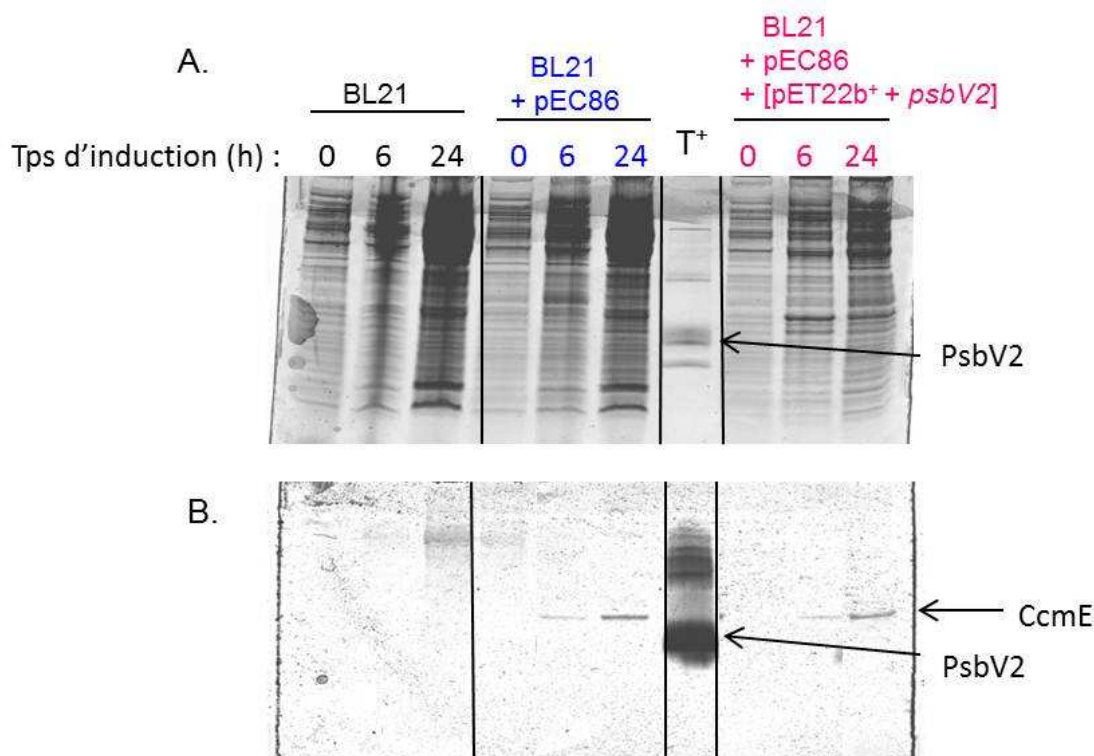


Figure 2.10 : *SDS-PAGE* de lysats d'*E.coli* après ajout d'IPTG à différents temps : $t=0$, $t=6h$ et $t=24h$ pour la souche (BL21(DE3)) (en noir), la souche (BL21 + pEC86) (en bleu) et la souche (BL21 + pEC86 + [pET-22b+ + *psbV2*]) (en rose). Les gels sont colorés au bleu de Coomassie (A) ou avec une coloration spécifique des hèmes : le TMBZ (B). Le témoin T+ est un échantillon de PsbV2 (15 950 Da) partiellement purifié. Avant d'être déposés, les échantillons ont été repris dans du tampon dénaturant ne contenant pas d'agents réducteurs.

Tableau 2.5 : Masses moléculaires théoriques calculées à partir de la séquence en acides aminés de l'apo- et de l'holo-cytochrome PsbV2. La masse moléculaire de l'hème est de 616 daltons.

	masse moléculaire en Da
PsbV2 avec peptide signal, sans hème	17 477
PsbV2 sans peptide signal, sans hème	15 337
PsbV2 sans peptide signal, avec hème	15 950

Les trois différentes souches bactériennes d'*E. coli* (BL21 (DE3)), (BL21(DE3) + pEC 86) et (BL21(DE3) + pEC 86 + [pET-22b+ + *psbV2*]) ont été construites au laboratoire puis envoyées dans le laboratoire du Dr. M. Sugiura pour être analysées en spectrométrie de masse afin de voir si il était possible de détecter des signaux même faible de PsbV2 mature. Les 3 souches ont été cultivées à 37°C puis ont été placées à 28°C après ajout d'inducteur (IPTG) et d'acide α -lévulinique (précurseur de l'hème) pendant 2 heures.

Dans la souche (BL21(DE3) + pEC 86 + [pET-22b+ + *psbV2*]) uniquement, deux signaux supplémentaires ont été observés. Le premier signal ($m/z = 15\,337$ Da) correspond

exactement à la masse de l'apocytochrome : PsbV2 sans son peptide signal et sans son hème. Le second signal ($m/z = 17\ 549$ Da) pourrait correspondre à l'apocytochrome : PsbV2 avec son peptide signal et sans son hème. En revanche, la protéine CcmE mature dont la masse théorique est de 18 300 Da, n'a pas été observée en spectrométrie de masse. Le temps d'induction de 2h effectué dans cette expérience n'est probablement pas suffisant pas pour que la protéine CcmE soit exprimée et détectée en spectrométrie de masse, alors qu'après 6h et 24h d'induction, elle est détectée sur gel *SDS-PAGE* coloré au TMBZ.

La signature de PsbV2 mature (15 950 Da) n'a été détectée, ni sur gel *SDS- PAGE* coloré au bleu ou au TMBZ, ni par analyse en spectrométrie en masse chez les bactéries *E. coli* (BL21(DE3) + pEC 86 + [pET-22b+ + *psbV2*]).

2.3.e. Expression homologue de PsbV2 chez *T. elongatus*

L'objectif de cette stratégie est de sur-exprimer de façon homologue la protéine PsbV2 de *T. elongatus* dans la cyanobactérie *T. elongatus* sous le contrôle du promoteur fort de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (rubisco). Trois étapes sont nécessaires : i) insertion d'un site de restriction spécifique dans le plasmide contenant le promoteur de la rubisco, ii) amplification du gène *psbV2* à partir de l'ADN génomique de *T. elongatus* et de le cloner après le promoteur de la Rubisco, iii) ajout d'une cassette de sélection (résistance à la spectinomycine et à la streptomycine) sur le plasmide contenant le promoteur de la rubisco et le gène *psbV2*. Enfin les cyanobactéries de la souche WT*3 sont transformées avec le plasmide complet.

* Insertion d'un site de restriction *Pst* I dans le vecteur contenant le promoteur de la Rubisco

Le site de restriction *Hinc* II est remplacé par mutagenèse dirigée par le site *Pst* I dans le plasmide [pBA5'-PrubL-SmtA-A3'] qui contient le promoteur de la large sous-unité de la Rubisco (Figure 2.11). Ce nouveau plasmide d'ADN muté appelé [pBA5'-PrubL-SmtA-A3'(Pt)] est après purification analysé par restriction et la construction est vérifiée par séquençage.

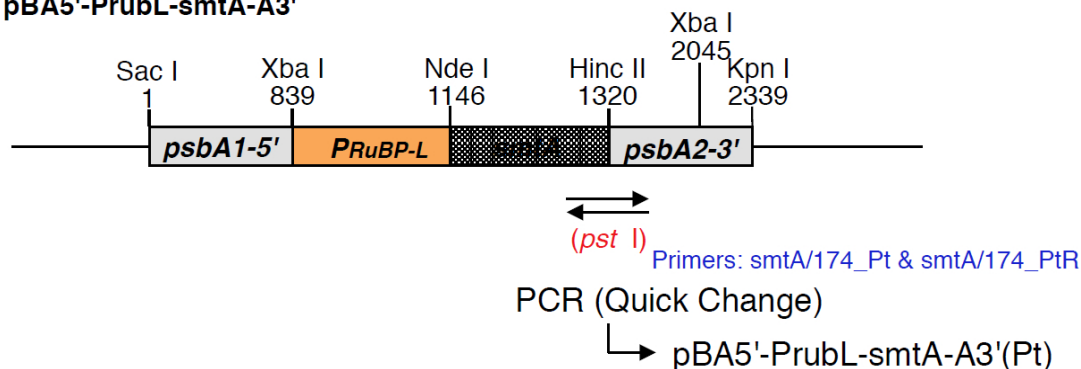
pBA5'-PrubL-smtA-A3'

Figure 2.11 (*MS): Construction du plasmide [pBA5'-PrubL-SmtA-A3'(Pt)] par le remplacement du site Hinc II par Pst I dans le plasmide [pBA5'-PrubL-SmtA-A3'] (Dr. Miwa Sugiura). Les deux amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée sont :
 Amorce smtA/A174_Pt : 5'-GCTGTACTTGTCACCAATAGctgcagGGTCGCTCCT-3'
 Amorce smtA/174_PtR : 5'-AGGAGCGACCctgcagCTATTGGTGACAAGTACAGC-3'

**** Insertion du gène *psbV2* sous contrôle du promoteur de la Rubisco**

Le gène *psbV2* est amplifié à partir de l'ADN génomique de *T. elongatus* par PCR avec les amorces V2/001-Nd et V2/580R-Pt. Le plasmide [pBA5'-PrubL-SmtA-A3'(Pt)] et le gène amplifié de *psbV2* sont digérés par les enzymes de restriction *Nde* I et *Pst* I. Les deux fragments d'ADN obtenus sont purifiés. Après déphosphorylation du plasmide, le plasmide et l'insert sont ensuite ligués pour former le plasmide [pBA5'-PrubL-*psbV2*-A3'(Pt)]. Le plasmide est vérifié par séquençage (avec les amorces Rbc / 131) (Figure 2.12).

***** Insertion d'une cassette de résistance [Sp/Sm^R]**

Afin de sélectionner les clones ayant intégré le plasmide [pBA5'-PrubL-*psbV2*-A3'(Pt)], il est indispensable d'y ajouter une cassette de résistance à un antibiotique différent de celui de la souche initiale WT*3. Le gène de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine est porté par le plasmide [pDWg]. Ce gène de résistance est cloné après le gène *psbV2*. Les deux plasmides [pBA5'-PrubL-*psbV2*-A3'(Pt)] et [pDWg] sont digérés par l'enzyme *Pst* I. Le vecteur [pBA5'-PrubL-*psbV2*-A3'(Pt)] est déphosphorylé puis le vecteur et l'insert [Sp/Sm^R] sont purifiés sur gel d'agarose. Les deux fragments d'ADN sont ligués puis les clones bactériens issus de la transformation sont analysés par digestion, sélectionnés puis vérifiés par séquençage. Le plasmide final contenant le gène *psbV2* derrière le promoteur de la rubisco

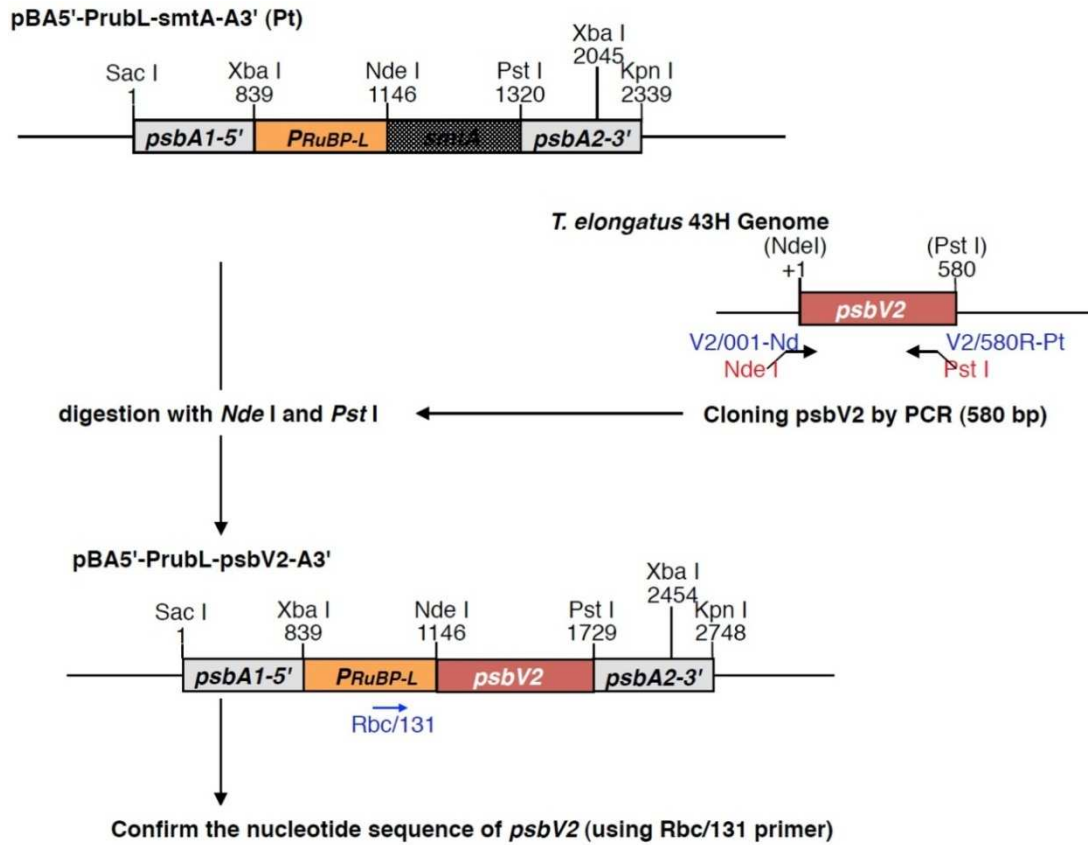


Figure 2.12 (*MS) : Insertion de *psbV2* dans le plasmide [pBA5'-PrubL-SmtA-A3'(Pt)] contenant le promoteur de la Rubisco. Les amorces ayant servi à amplifier le gène *psbV2* sont les suivantes :

Amorce V2/001Nd : 5'-tttttCatATGTACCAACCTCACTTTTGGCAACGG-3'

Amorce V2/580R-Pt : 5'-aaaaaactgcagAAAATTAAGGGGTGCAAGATTCACC-3'

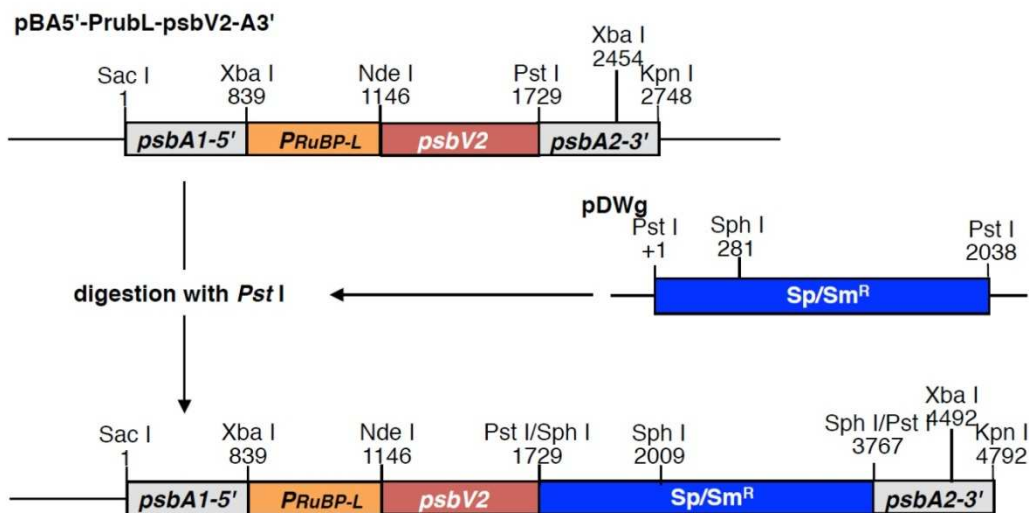


Figure 2.13 (*MS) : Insertion de la cassette de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine (en bleu).

ainsi que la cassette de résistance Sp/Sm^R est ensuite extrait du clone bactérien sélectionné et est transfecté par électroporation dans la souche WT*3 de *T. elongatus*.

2.4. Biochimie : outils

2.4.a. SDS-PAGE

Les gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes appelés aussi *SDS-PAGE* (pour *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) permettent de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Le système utilisé au laboratoire est *Miniprotean II de BIO-RAD*. La composition des gels utilisés (15% acrylamide, urée 5M) pour la migration sont ceux décrits par Schägger et Jagow (Tableau 2.6). Les échantillons sont dilués dans du tampon de dénaturation concentré cinq fois (Tris 250 mM à pH 6.8, glycérol 50 %, SDS 20%, Serva blue G 0.05%) et sont bouillis 3 minutes à 100°C au bain-marie avant d'être chargés sur le gel. La migration se fait 30 minutes à 30 mA constant puis à 50 mA constant à 4°C pour deux gels (pour un gel, l'ampérage est divisé par deux). Après électrophorèse, le gel peut être coloré au bleu de Coomassie. Il est lavé quinze minutes dans de l'eau puis coloré pendant 1 heure dans une solution contenant du bleu de Coomassie G250 (0.04 % w/v), de l'éthanol (40 %) et de l'acide acétique (10 %). Il est ensuite décoloré dans une solution contenant un mélange d'éthanol (20 %) et d'acide acétique (10 %). La décoloration est stoppée en mettant le gel dans de l'eau.

Tableau 2.6 : Composition pour deux gels dénaturants SDS Page 15 %, urée 5M. APS pour persulfate d'ammonium.

	Gel de concentration 5 %	Gel de séparation 15 %
Acrylamide [49.5 % total / 3 % crosslinker]	520 µL	2,25 mL
Tampon tris 3M, pH=8.45, SDS 0.3 %	1,24 mL	2,5 mL
Glycérol	/	1 g
Urée	/	2,25 g
H ₂ O mQ	3,24 mL	500 µL
APS 10 % (p/v)	25 µL	30 µL
Temed	10 µL	12 µL

* Coloration des SDS-PAGE au nitrate d'argent

Après fixation des protéines et sensibilisation du gel, le gel de polyacrylamide peut être coloré au nitrate d'argent. Il est incubé dans une solution contenant des ions argent (Ag^{2+}) puis dans une solution contenant du carbonate de sodium (Na_2CO_3) et de formaldéhyde (HCOH) qui réduit ces ions argent en argent métallique (Ag^0) insoluble et visible. Le protocole est résumé dans le tableau 2.7).

Tableau 2.7 : Protocole de coloration à l'argent des SDS-PAGE et des BN-PAGE.

Lavage	H_2O distillée	5 min
Fixation	10 % CH_3COOH + 40 % Ethanol	mini. 15 min
Sensibilisation	30 % Ethanol + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2 g/L) + CH_3COONa (68 g/L)	30 min
Lavages	H_2O distillée	3*5 min
Coloration	AgNO_3 (2,5 g/L) (ref 6207.1 du fournisseur Roth)	20 min
Lavages	H_2O distillée	2*1 min
révélation	Na_2CO_3 (25 g/L) + 0,04 % formaldéhyde	
Arrêt de la réaction	EDTA (14,6 g/L)	10 min
lavage	H_2O distillée	3*5 min

** Détection des hèmes par le TMBZ

Après SDS-PAGE, la visualisation des hème de type c est effectuée à l'aide de 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMBZ) (Thomas, Ryan et al. 1976; Miller and Nicholas 1984). La coloration des hèmes de type c provient de leur activité peroxydasique qui en oxydant le TMBZ fixé, lui fait prendre une couleur turquoise. Le gel est rincé deux fois à l'eau, il est ensuite placé dans un mélange de solution A (6 mL : TMBZ 1.5 mg/mL dans du méthanol) et de solution B (14 mL : acétate de sodium 0.25 M). Le gel est incubé 1 heure à température ambiante dans ce mélange, à l'abri de la lumière. Une solution de H_2O_2 (0,1% final, 68 μL à 30%) est ajoutée goutte à goutte (révélation de l'activité peroxydase des hèmes), la coloration augmente jusqu'à 30 minutes. Le gel est ensuite placé dans une solution bloquante (isopropanol 30 %, acétate de sodium 0.18 M).

*** * * Détection des hèmes par ECL direct**

Cette méthode est inspirée du protocole de Feissner et al. (Feissner, Xiang et al. 2003). Elle permet de détecter directement l'activité peroxydase des hèmes par électrochemiluminescence (ECL). Les protéines sont séparées sur un gel *SDS-PAGE* 15%, urée 5M puis transférées sur une membrane de PVDF. Après le transfert, la membrane est rincée avec du tampon PBS (NaCl 1.4 M, KCl 30 mM, Na₂HPO₄ 55 mM, KH₂PO₄ 14 mM) puis égouttée. Elle est ensuite incubée 1 minute dans un mélange de solution A (3 ml : Tris /HCl 100 mM pH 8.5, acide coumarique 90 mM d'une solution stock solubilisée dans du DMSO, 1.66 µL de H₂O₂ 30%) et de solution B (3 mL : Tris /HCl 100 mM pH 8.5, luminol = 3-Aminophthalhydrazin 250 mM). La membrane est séchée délicatement sur un papier absorbant. Un film photographique est exposé de quelques secondes à quelques minutes en contact avec la membrane puis est révélé.

2.4.b. Purification des protéines

*** Purification des protéines par interactions hydrophobes**

Dans ce type de chromatographie, les molécules sont liées sur la phase stationnaire par des interactions hydrophobes. La séparation des protéines se fait en fonction de leur degré d'hydrophobicité. Une large majorité des protéines peut être adsorbée sur ce type de support. En effet, huit acides aminés ont des chaînes latérales de nature hydrophobe comportant des groupements cycliques (la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane) ou aliphatiques (la leucine, l'isoleucine, la valine, l'alanine et dans une moindre mesure la méthionine). L'effet hydrophobe contraint les protéines à caractère hydrophobe à s'associer entre elles plutôt qu'à s'hydrater. L'élution de ces types de colonne se fait dans un tampon contenant peu de sels. La colonne utilisée est constituée d'une résine de phényl sépharose *fast flow* sur laquelle sont fixés des groupements hydrophobes phényle. Les chromatographies se font dans une colonne de type *GE Healthcare XK16* (16 cm de diamètre, 20 cm de hauteur) connectée à une HPLC.

*** * Purification des protéines par exclusion de taille**

La chromatographie d'exclusion stérique (ou filtration sur gel) permet de séparer les protéines selon leur rayon de Stokes qui rend compte de la forme des molécules et de leur masse. Les

billes qui constituent le gel sont poreuses et forment ainsi un réseau tridimensionnel dont l'accessibilité pour les protéines est déterminée par la taille des pores. Suivant leur taille, les molécules sont exclues ou non des pores et auront donc un temps de résidence à l'intérieur de la colonne inversement proportionnel à leur taille : les molécules exclues traversent la colonne directement entre les billes (sans traverser les pores) alors que les petites molécules sont retardées par leur passage à l'intérieur des billes. Le temps (ou le volume) d'élution est d'autant plus élevé que la molécule est de petite taille.

La colonne de filtration sur gel est constituée d'une matrice de type dextran *Sephadex G-75*, ayant une capacité de fractionnement allant de 3 à 70 kDa (*Pharmacia Biotech GE Healthcare Hiload XK 26* cm de diamètre, 60 cm de hauteur). La circulation de la phase mobile est assurée par une pompe péristaltique (*Pharmacia Biotech P-50*). La colonne est connectée à sa sortie à un détecteur UV-visible (*JASCO UV-2077*) couplé à un enregistreur graphique permettant de suivre l'élution des molécules selon leur absorption. Un collecteur de fractions (*Model 1200 PUP*) complète le montage.

***** Purification de protéines par chromatographie échangeuse d'ions**

La séparation des protéines se fait en fonction de leur charge globale, celle-ci dépendant de leur point isoélectrique (pI) et du pH du tampon dans lequel elles se trouvent. L'échantillon est déposé sur la colonne équilibrée préalablement à faible force ionique (tricine 10 mM). Les protéines chargées sont retenues sur la colonne puis éluées progressivement par un gradient linéaire croissant allant de 0 à 1 M de NaCl. Deux types de colonne sont utilisées : une résine échangeuse d'anions dont la matrice est chargée positivement grâce à des groupements $[-CH_2-N^+(CH_3)_3]$ (*MonoQ 5/50 GL de GE Healthcare*) et une résine échangeuse de cations dont la matrice est chargée négativement grâce à des groupements $[-CH_2-SO_3^-]$ (*MonoS 5/50 GL de GE Healthcare*). Ces chromatographies sont réalisées en phase liquide à haute pression (HPLC).

2.5. Biochimie : stratégies de purification

2.5.a. Séparation des fractions soluble et membranaire pour la purification

Les cellules de *T. elongatus* en phase stationnaire sont centrifugées (3000 g, 6 min, 25°C). Le culot de cellules est lavé dans un tampon 1 (glycérol 10 %, MES 40 mM, CaCl₂ 15 mM, MgCl₂ 15 mM à pH 6,5) puis centrifugé (10 000 g, 12 min). Le culot de cellules est repris dans le même tampon 1 que précédemment mais cette fois additionné d'antiprotéases (benzamidine 1 mM et acide ϵ -amino-n caproïque 1 mM), de sérum albumine bovine 0.2 % et d'une pointe de spatule de DNase (issue du pancréas bovin, *Sigma Aldrich*). Les cellules sont cassées après deux passages à la presse de French (700 PSI). Le mélange est ensuite centrifugé (4000 g, 6 min, 25°C) pour éliminer les cellules non cassées. Le surnageant qui contient les membranes et les protéines solubles est centrifugé (50 000 g, 25 min, 4°C). Le surnageant qui contient les protéines solubles est mis de côté et les membranes qui sont dans le culot sont resuspendues dans le tampon 1 puis centrifugées de nouveau (50 000 g, 25 min à 4°C). Cette étape de lavage des membranes est répétée trois fois. Les protéines issues des quatre surnageants successifs constituent la fraction soluble.

2.5.b. Purification du cytochrome PsbV2

Le cytochrome PsbV2 est purifié à partir de la fraction soluble des protéines de *T. elongatus* par trois étapes principales successives de chromatographie : une colonne de filtration sur gel, une chromatographie d'interactions hydrophobes, et une chromatographie échangeuse d'anions. La fraction soluble des protéines de *T. elongatus* (obtenues selon la méthode décrite dans le paragraphe précédent) est mise en présence de 45 % de sulfate d'ammonium, laissée 30 minutes sous agitation puis centrifugée (10 000 g, 30 min). Le surnageant, qui contient les protéines qui n'ont pas été précipitées à 45 %, est porté cette fois à 50 % de sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé et le surnageant est ensuite passé sur une colonne hydrophobe de *phényl sépharose fast flow* afin d'éliminer les abondantes phycobiliprotéines. La colonne est lavée avec du sulfate d'ammonium (10 %) et les protéines sont éluées avec une solution de sulfate d'ammonium (3 %). Les premières fractions éluées contiennent les phycobiliprotéines de couleur bleue et les fractions suivantes contiennent un mélange de cytochromes identifiés par leur pic d'absorption à 416 nm et d'une couleur caractéristique proche du rouge « cognac ». Ces dernières sont concentrées sur filtre Amicon 3 KDa puis passées sur une colonne de gel filtration (tricine 10 mM, NaCl 100 mM à pH 7,6). Les fractions contenant PsbV2 sont identifiées par spectroscopie UV-visible et sont concentrées puis additionnées de sulfate d'ammonium (40 %). Une chromatographie sur colonne hydrophobe de phényl sépharose en HPLC est réalisée. L'élution se fait avec un gradient de

sulfate d'ammonium (de 40 à 0 %). Les échantillons contenant PsbV2 sont sélectionnés grâce à leur spectre d'absorption dans le visible et sont rassemblés pour être dialysés contre du tampon (tricine 10 mM à pH 7.5). Une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions *MonoQ* est ensuite réalisée. Les fractions éluées avec un gradient de sels (de 0 à 1 M NaCl) contenant PsbV2 sont ensuite diluées et reconcentrées sur filtre *Amicon 3K*.

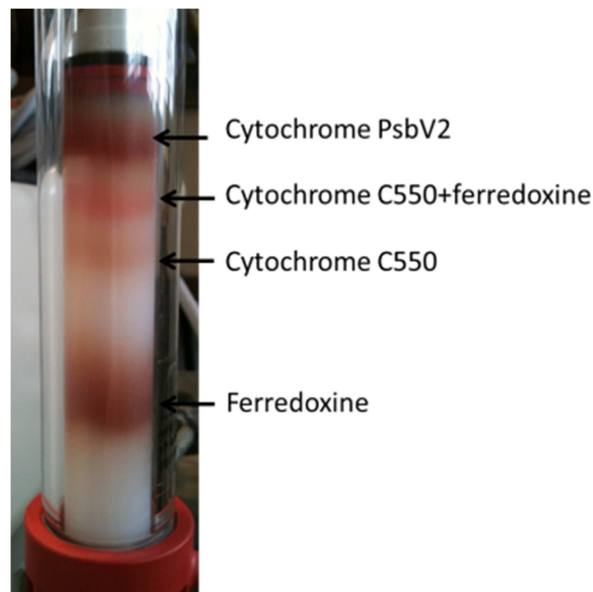


Figure 2.14 : Séparation de protéines solubles sur une colonne de chromatographie hydrophobe.

2.5.c. Purification du cytochrome c_6

La purification du Cyt c_6 s'effectue sur des fractions de filtration sur gel obtenues lors de la purification de PsbV2 non surexprimé. L'analyse des fractions de filtration sur gel par spectrophotométrie UV-visible permet de sélectionner les fractions contenant le Cyt c_6 réduit. Ces fractions sont rassemblées puis saturées avec 30 % de sulfate d'ammonium puis passées sur colonne hydrophobe. Cette étape permet de concentrer l'échantillon. La fraction éluee avec de l'eau contenant le Cyt c_6 est concentrée sur filtre *Amicon 3K*. L'échantillon est ensuite dialysé dans du tampon (tricine 5 mM pH 8.5) pour éliminer le sulfate d'ammonium. Une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (*MonoQ*) est réalisée. Les fractions sont analysées par spectroscopie UV-visible. Toutes les fractions contenant du Cyt c_6 sont rassemblées, dessalées et concentrées sur filtre *Amicon 3K* puis passées sur colonne échangeuse de cations dans du tampon (MES 10 mM à pH 5.5) et éluées avec un gradient de sels (de 0 à 1 M NaCl). Un échantillon purifié de Cyt c_6 est ainsi obtenu.

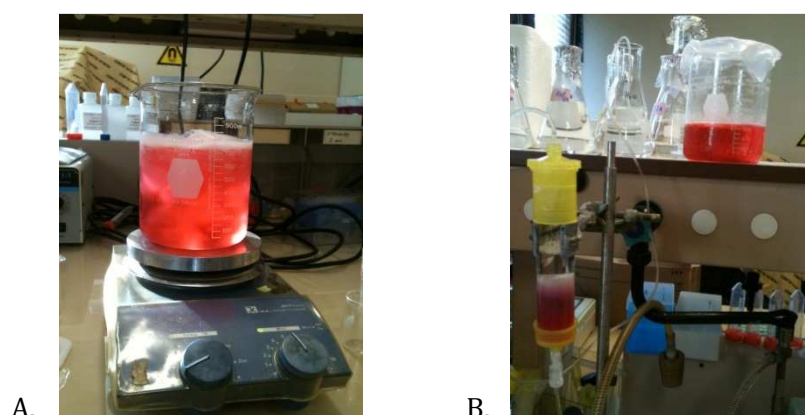


Figure 2.15 : Fraction issue de gel filtration contenant le Cyt c_6 saturée avec 30 % de sulfate d'ammonium (A) et passage de cette fraction sur colonne hydrophobe (B).

2.5.d. Purification de l'hémoprotéine Tll0287

L'hémoprotéine Tll0287 est purifiée à partir de la fraction soluble des protéines de *T. elongatus* par quatre étapes successives de chromatographie : une chromatographie d'affinité, une filtration sur gel, une chromatographie échangeuse d'anions et enfin une chromatographie échangeuse de cations.

La fraction soluble des protéines de *T. elongatus* est déposée sur une colonne contenant de la résine d'affinité *ProBond*[™] (*Invitrogen*) sur laquelle sont greffés des groupements acide iminodiacétique (IDA). Le groupement IDA fixe les ions (Ni^{2+}) par trois coordinations. La résine est ensuite lavée avec un tampon (glycérol 10 %, bêtaïne 1 M, CaCl_2 15 mM, MgCl_2 15 mM, NaCl 100 mM, histidine 1 mM, MES 40 mM, β DM 0.03 %, pH 6.5) pendant la nuit (15-18h) avec un faible débit. L'hémoprotéine Tll0287 ne comporte pas d'étiquettes 6-histidines, elle interagit avec la résine Ni-IDA par d'autres types de liaison, probablement via la présence de patches électronégatifs ou de patches histidines à sa surface. Il est élué par compétition avec un tampon contenant 180 mM d'histidine (glycérol 10%, bêtaïne 1M, CaCl_2 15 mM, MgCl_2 15 mM, NaCl 100 mM, histidine 180 mM, MES 40 mM, β DM 0.06 %, pH 6.5). Les fractions d'élution sélectionnées par rapport à leur couleur marron-brun sont concentrées sur filtre *Amicon* 3K puis injectées sur une colonne de filtration sur gel (tricine 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.6). Les fractions collectées sont analysées par spectroscopie UV-visible afin d'identifier celles contenant Tll0287. Les fractions sélectionnées sont rassemblées puis dialysées (Tris

HCl 10 mM, pH 8.5). Une chromatographie d'échange d'anions (*MonoQ*) est ensuite effectuée, un gradient de sel (de 0 à 1 M de NaCl) permet de séparer les différentes fractions, les fractions contenant Tll0287 sont récupérées puis à nouveau dialysées contre le même tampon (Tris HCl 10 mM pH 8.5) pour éliminer les traces de sels. Puis une chromatographie d'échange de cations (*MonoS*) est réalisée de la même façon et les fractions d'élution contenant Tll0287 sont récupérées.

2.6. Immunologie

Ce travail a été effectué en collaboratoir avec Marie-Claire Nevers et Stéphanie Simon au laboratoire d'immunoanalyse dans le service de pharmacologie et d'immunoanalyse (SPI) au CEA de Saclay.

2.6.a. Production d'anticorps polyclonaux contre Tll0287

Les immunisations sont réalisées sur des lapins dits géants blancs du Bouscat (*Élevage cunicole route de Villiers Plouch 59159 Marcoing*). Ces lapins compte tenu de leur taille permettent d'obtenir des bons volumes de prélèvements sanguins. Les immunisations se font par injections intradermiques en multipoints (100 µl maximum / point) sur le flanc du lapin à l'aide d'une aiguille (terumo Noëlus 25G 0.5mm). Ce mode d'injection permet la libération très lente de l'immunogène par diffusion dans l'organisme. Au moment de l'injection, on pratique une émulsion volume / volume de l'antigène avec un adjuvant. L'adjuvant est un stimulant non spécifique de la réponse immunitaire, le Freund complet (Sigma) utilisé se compose d'une huile minérale protégeant l'antigène d'un catabolisme rapide et de bactéries tuées à la chaleur stimulant non spécifiquement la réponse immunitaire (*Mycobactérium tuberculosis*). Les adjuvants sont très efficaces et permettent d'utiliser des quantités minimales d'antigène et d'obtenir des réponses durables. La première immunisation s'accompagne d'une prise de sang de 5 ml dite saignée 0 (S0) afin de vérifier que les anticorps présents initialement ne présentent pas de spécificité vis-à-vis de l'antigène (Tll0287). Le premier rappel intervient après huit semaines de repos et est suivi de la saignée 1 (S1) huit à dix jours après. Les rappels R2, R3, R4 se font également après deux mois au minimum de repos suivis des saignées S2, S3 et S4 huit à dix jours après. Deux lapins, désignés L33 et L34 pour les

besoins de l'expérience, ont servi à cette étude et ont reçu à chaque immunisation ou rappel entre 370 et 400 μg de Tll0287 purifié.

2.6.b. Evolution de la réponse anticorps

La réponse immunitaire pour chaque lapin a été suivie par test immunoenzymatique (EIA) sur plaque de microtitration 96 puits (maxi sorp-Nunc) et selon le schéma (Figure 2.16). Pour chaque saignée, une gamme de six dilutions successives de dix en dix est effectuée. L'incubation du sérum dilué en présence de l'antigène traceur est effectué pendant une nuit à 4°C, sur une plaque fonctionnalisée par immobilisation d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre les parties constantes des immunoglobulines de lapin. L'antigène traceur est constitué de la protéine Tll0287 couplée de façon covalente à la biotine. La plaque est lavée automatiquement avec du tampon phosphate Tween 20 (laveur de plaque ELX 405) pour éliminer l'excès de protéine et d'anticorps non-fixés. La streptavidine couplée à l'acétylcholinestérase est ajoutée à température ambiante pendant 90 minutes. La streptavidine reconnaît spécifiquement la biotine avec laquelle Tll0287 est couplée. La plaque est à nouveau lavée puis l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase est réalisée par ajout du réactif d'Ellman selon la méthode décrite ci-dessous. Après une heure de réaction, l'absorbance des plaques est lue à 414 nm.

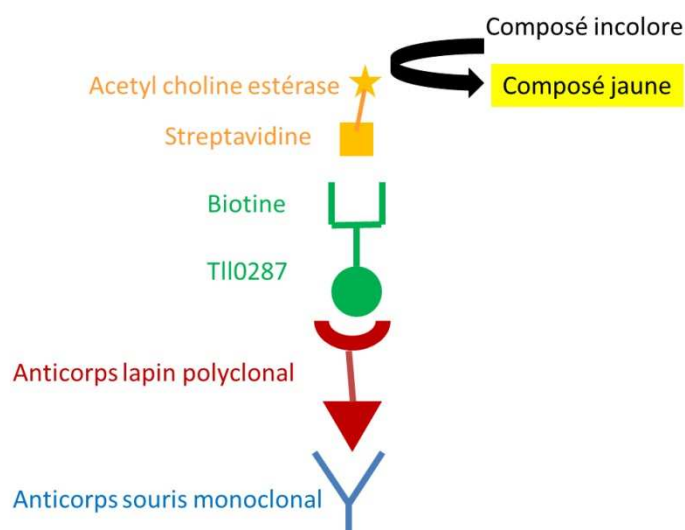


Figure 2.16 : Schéma pour tester la réponse immunologiques des lapins.

La méthode d'Ellman utilise un substrat artificiel : l'acétylcholine, dont l'hydrolyse par l'acétylcholinestérase conduit à la formation de thiocholine. Cette dernière forme un dérivé coloré avec le DTNB (5-5'-dithiobis-[2-nitrobenzoate]) selon l'équation bilan suivante :

Acétylcholinestérase

Acétylthiocholine + H₂O -----> Acide acétique + Thiocholine

Thiocholine + DTNB ---> 5-thio-2-nitrobenzoate + 2-nitrobenzoate-mercaptothiocholine
[incolore] [jaune]

2.6.c. Western blot

Après séparation sur *SDS-PAGE*, les protéines (extrait cellulaire, échantillon de purification...) sont transférées sur une membrane de PVDF grâce au système de transfert liquide *Miniprotean II de Bio-Rad* (pour les gels de 7x9 cm) ou *Transblot Cell* (pour les gels de 16x16 cm) pendant 1h30 à courant constant (350 mA). Le tampon de transfert utilisé est composé de tampon tris (27.6 mM), de glycine (192 mM) et d'éthanol (10 % v/v). La membrane est ensuite saturée dans du tampon PBST (NaCl 1.4 M, KCl 30 mM, Na₂HPO₄ 55 mM, KH₂PO₄ 14 mM, Tween 0.1 % v/v) contenant du lait écrémé en poudre (5 % p/v) pendant 30 minutes afin de limiter la fixation non-spécifique des anticorps sur la membrane à l'endroit où il n'y a pas de protéine transférée. Après saturation, la membrane est incubée avec le sérum (s2) d'anticorps de lapin dilué (1 / 10 000 pour L33) dans du tampon PBST pendant 1 heure à température ambiante. Après trois lavages de 5 minutes dans du tampon PBST afin d'éliminer l'anticorps primaire en excès, la membrane est incubée 1 heure avec un anticorps dirigé contre les immunoglobulines de lapin et conjugué à la peroxydase (*peroxidase-conjugated AffinitPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) de Jackson Immunoresearch*) dilué au 1/25 000, dans du tampon PBST contenant du lait (5 % p/v). Puis la membrane est lavée à nouveau trois fois dans du tampon PBST afin d'éliminer le lait et le second anticorps. La présence de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire, et donc de la protéine initialement reconnue par l'anticorps produit chez le lapin, est ensuite révélée par chimioluminescence (système « *ECL* » pour *Enhanced Chemiluminescence*).

2.6.d. Détection et dosage de Tll0287 par test immunoenzymatique (EIA)

Le test EIA utilisé est un test de dosage immunométrique à deux sites dit de « sandwich ». Il permet de détecter et/ou de doser une protéine dans un liquide biologique. Un premier anticorps appelé anticorps de capture est fixé sur une plaque de microtitration. Ensuite le liquide biologique (extrait cellulaire, échantillon de purification...) à tester est incubé avec le deuxième anticorps appelé anticorps de capture couplé à de la biotine. Si la protéine Tll0287 est présente, elle se retrouve alors capturée en « sandwich » par les deux anticorps. Après lavages, de la streptavidine couplée à de l'acétylcholinestérase est ajoutée à température ambiante. L'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase est ensuite réalisée selon la méthode d'Ellman décrite précédemment. Dans ce type de dosage, la concentration en antigène est directement proportionnelle à l'activité enzymatique (Figure 2.17).

Dans un premier temps les fractions de la totalité des immunoglobulines des anticorps des saignées 3 (S3) des deux lapins (L33 et L34) ont été purifiées par précipitation à l'acide caprylique. La fraction du lapin L33 (200 µl à 10 µg/mL par puits) a été adsorbée sur plaque de microtitration (Maxi-Sorp NUNC) pour obtenir les phases solides de capture et la fraction du lapin L34 a été couplée à la biotine pour obtenir les anticorps traceurs. Un mélange contenant la gamme de dilutions de Tll0287 purifiée (100 – 50 – 10 – 5 – 1 – 0.5 – 0.1 – 0.05 ng / mL dans tampon MES, glycérol 10 %, bétaine 1 M, CaCl₂ 15 mM à pH 6.5) ou les extraits à doser (100 µL) et les anticorps de capture (100 µL) a été déposé sur les plaques une nuit à 4°C. Après lavages dans du tampon contenant du tween, la streptavidine couplée à l'acétylcholinestérase (200 µl / puits) est ajoutée et le mélange est incubé pendant 90 minutes à température ambiante. Après de nouveaux lavages, le réactif d'Ellman est ajouté (200 µl / puits) et l'activité enzymatique est mesurée.

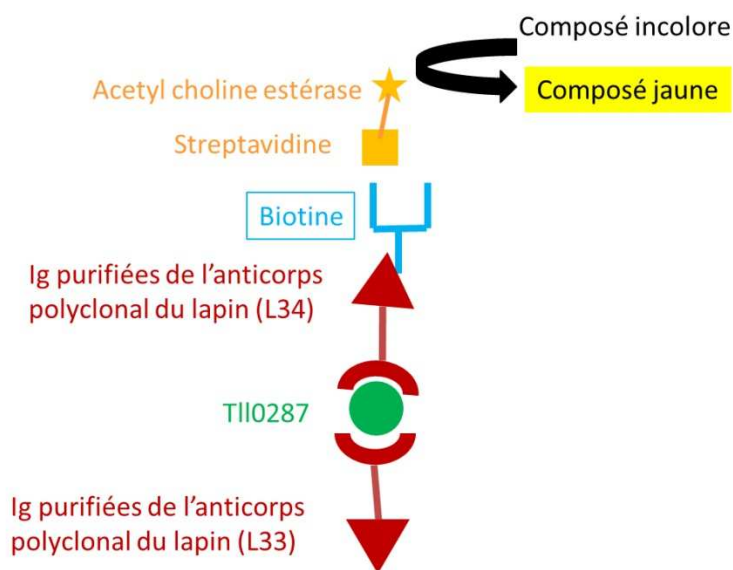


Figure 2.17 : Principe du test de dosage enzymatique de TII0287.

2.7. Protéomique

2.7.a. Séparation des fractions soluble et membranaire pour l'électrophorèse 2D

Les outils de protéomique (gels d'électrophorèse bidimensionnelle ou 2D) ont été mis en place sur les protéines de *T. elongatus* au laboratoire. Dans un premier temps, les protéines ont été séparées en deux : une fraction soluble et une fraction membranaire. Avec le protocole utilisé ci-dessous, la majorité des phycobiliprotéines est attachée aux membranes. A partir d'un volume de 4 litres de culture de cyanobactéries en phase exponentielle, une première centrifugation (3000 g, 6 min, 25°C) permettant de collecter un culot de cellules est effectuée. Le culot est repris dans du tampon très concentré en sels (phosphate de potassium 0.5 M, citrate de sodium 0.3 M, pH 7.4) puis centrifugé (3000 g, 12 min, 25°C). Le culot est re-suspendu dans ce même tampon contenant des antiprotéases (ϵ -amino-n caproïque et benzamidine 1 mM) et de la DNAase. Les cellules sont ensuite cassées avec une presse de French (700 Psi). Le lysat cellulaire est centrifugé pour éliminer les cellules non cassées (3000 g, 6 min, 4°C). Une ultracentrifugation est effectuée sur le surnageant (100 000 g, 20 min, 4°C) pour séparer la fraction soluble de la fraction membranaire.

2.7.b. Gels bidimensionnels des protéines de la fraction soluble

* 1^{ère} dimension par isoélectrofocalisation

La technique d'électrophorèse en gradient de pH immobilisé a été mise au point au début des années 80 (Bjellqvist, Ek et al. 1982). L'isoélectrofocalisation (IEF) permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). Le pI est le pH spécifique pour lequel la charge nette de la protéine est nulle. Le pI est déterminé par le nombre et le type de groupements chargés d'une protéine. La charge nette d'une protéine est la somme de toutes les charges négatives et positives des chaînes latérales des acides aminés qui la constituent, ainsi que les charges amino- et carboxy-terminales de la protéine. Quand les protéines sont placées dans un gradient de pH et quand elles sont soumises à un champ électrique, elles migrent initialement vers l'électrode qui a une charge opposée. Pendant leur migration dans le gradient de pH, les protéines perdent ou s'enrichissent en protons, leurs charges nettes et leurs mobilités diminuent et les protéines ralentissent. Au moment où la protéine atteint la région où le pH équivaut à son pI, elle s'immobilise sur le gradient de pH.

Pour l'isoélectrofocalisation en première dimension, un appareil (*Ettan IPGPhorII* d'Amersham Biosciences GE Healthcare) est utilisé. Cet appareil composé de deux larges électrodes permet de fournir un très haut voltage pouvant aller jusqu'à 10000 Volts. Des bandelettes (*Immobiline drystrip gels* Amersham Biosciences de GE Healthcare) sont utilisées. Elles contiennent des molécules avec différents points isoélectriques, de petites masses moléculaires et solubles, appelées ampholines ou ampholytes, sur gel sec d'acrylamide.

Après séparation de la fraction soluble et membranaire des protéines (d'après la méthode décrite dans le paragraphe précédent), les protéines de la fraction soluble se retrouvent dans le surnageant après ultracentrifugation des cellules. Le surnageant est dilué dans de l'eau puis centrifugé sur filtre *Amicon 3K* (5000 g à 4°C) afin de diminuer la concentration en sels et de concentrer l'échantillon. Les bandelettes sont incubées pendant 15 heures à 30 volts dans du tampon de réhydratation dénaturant contenant de l'urée, de la thiourée et du CHAPS (200 µL de *Destreak™ rehydration solution* de GE Healthcare), les protéines de la fraction soluble (de 200 µg à 1 mg) et 0.5 % d'ampholytes. Après dénaturation et solubilisation, les protéines sont focalisées sur la bandelette, un programme avec différents voltages est appliqué (1 h à 130 volts, 1 h à 250 volts, 1 h à 500 volts, 1 h à 1000 volts, 3 h à 6000 volts, 1 h à 6000 volts). A la fin de l'IEF, les protéines sont séparées en fonction de leur pI.

**** 2^{ème} dimension sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes**

Après migration des protéines de la fraction soluble en première dimension par *IEF*, les protéines sont séparées dans une deuxième dimension en fonction de leur masses moléculaires par électrophorèse *SDS-PAGE*. Le système de migration de gel utilisé est un *Protean II Xi de Bio-Rad*, avec des plaques de verre de 22.5*20 cm, des espaceurs et des peignes de 1 mm d'épaisseur. Après l'étape d'*IEF*, les bandelettes sont incubées dans un tampon d'équilibrage (Tris-Cl pH8.8 à 50 mM, urée 6M, glycérol 30 % v/v, SDS 2% w/v, bleu de bromophénol) contenant un agent réducteur fort qui réduit les ponts disulfures (DTT 50 mM) pendant quinze minutes, puis dans le même tampon d'équilibrage contenant un agent alkylant qui bloque les groupements thiol des cystéines (iodoacétamide 100 mM) pendant quinze minutes. Les bandelettes sont ensuite incubées cinq minutes dans du tampon de migration (Tris-base 125 mM, glycine 1 M, SDS 0.5 % w/v) puis placées de façon horizontale au sommet d'un gel de polyacrylamide 12.5 % contenant du SDS. Les bandelettes sont ensuite scellées au gel d'acrylamide avec de l'agarose à 1 % contenant du bleu de bromophénol permettant de suivre la migration. Les protéines sont séparées dans un champ électrique à 10 mA constant sur la nuit à 10°C.

Tableau 2.8 : Tableau de composition d'un grand gel d'électrophorèse *SDS-PAGE* pour la 2^{ème} dimension.

	gel à 12,5% acrylamide
Acrylamide 30 % (29 :1)	33.4 mL
1,5 M Tris HCl pH 8.8	20 mL
H ₂ O mQ	qsp 80 mL
SDS 10 %	800 µL
APS 10 %	80 µL
TEMED	32 µL
volume final	80 mL pour 2 gels

2.7.c. Gels bidimensionnels des protéines de la fraction membranaire

*** Préparation de la fraction membranaire**

Les préparations de membranes sont réalisées au froid et à l'obscurité afin d'éviter un effet délétère de la lumière qui excite les pigments de la photosynthèse. Après cassage des cellules, élimination des cellules non cassées et ultracentrifugation (50 000 g /25 minutes / 4°C), le

culot de membranes est lavé cinq fois dans du tampon (MgCl_2 15 mM, CaCl_2 15 mM, glycérol 10, MES 40 mM % pH6.5) afin d'éliminer les phycobilliprotéines. Le dernier culot est repris, concentré dans un petit volume de tampon 25BTHG20 froid (BisTris-HCl 25 mM pH 7, glycérol 20 % w/v). La chlorophylle est ensuite dosée sur une fraction de l'échantillon : un volume de 5 μL est mélangé à 995 μL de méthanol (le méthanol permet d'extraire la chlorophylle) puis est dosée par spectrophotométrie. L'absorption est mesurée à la longueur d'onde où l'absorption dans le rouge est maximale ($\lambda = 666 \text{ nm}$) dans du méthanol et la concentration est ensuite déterminée (le coefficient d'absorption massique à 666 nm de la chlorophylle est $\varepsilon = 79.95 \text{ L. g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Un volume de tampon 25BTHG20 est ajouté pour ajuster la concentration en chlorophylle à 1 mg.mL^{-1} . Un volume de détergent βDM (2 % final p/v) équivalent à celui des membranes est ajouté sur glace pour solubiliser les membranes. Le mélange est incubé au froid pendant cinq minutes puis est centrifugé (18000 g, 20 min, 4°C) pour éliminer le matériel non solubilisé.

**** 1^{ère} dimension sur gel d'électrophorèse en « bleu natif »**

La séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives et en présence de bleu de Coomassie (appelé *BN-PAGE* pour *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) est une méthode analytique permettant de déterminer la masse moléculaire et l'état d'oligomérisation de complexes non dissociés. Les protéines sont séparées en fonction de leur charge nette, de leur taille et de leur forme. Le colorant anionique *Serva Blue G* se fixe aux protéines et induit une charge négative aux complexes protéines/colorant. Cet excès de charges négatives augmente la répulsion des complexes entre eux, ce qui réduit considérablement leur agrégation, permet leur séparation par électrophorèse ainsi que leur visualisation pendant la migration. Ce dernier point facilite le découpage des pistes du gel pour la deuxième dimension.

La méthode utilisée est inspirée de celle publiée par Sirpio et al. (Sirpio, Suorsa et al. 2011). Les électrophorèses sont réalisées sur un système *SE260* (*Amersham Biosciences*) avec des plaques de verre de 8*10 cm, des espaceurs et des peignes de 0.75 mm. Une solution (0.1 volume : BisTris-HCl pH 7 100 mM, acide ε -amino-n caproïque 0.5 M, sucrose 30 %, *Serva Blue G* 50 mg/mL) est ajoutée aux échantillons protéiques (0.9 volume). Les complexes membranaires sont séparés dans une première dimension sur un *BN-PAGE* dans un gradient de polyacrylamide de 5-15 % à 10°C et un gel de tassement à 5 % d'acrylamide. Le gel de migration en gradient 5-15 % est préparé manuellement grâce à une pompe à un débit de 0.5

mL / min. Les solutions utilisées pour les gels en gradient 5-15 % sont indiquées figure 2.9. Le gel de migration, une fois polymérisé est couvert d'un papier absorbant humide et d'un film étirable en plastique, il peut être ainsi conservé plusieurs jours à 4°C. Le gel de tassement est réalisé au minimum une heure avant le lancement de la migration. Les protéines (30 à 80 µg) migrent dans le gel dans un champ électrique avec un tampon anodique (Bis tris-HCl 0.5 M pH 7) et un tampon cathodique (tricine 50 mM, Bis Tris-HCl 15 mM pH 7, *Serva Blue G* 0.01 %). Le tampon cathodique avec bleu est échangé après une heure de migration avec le tampon cathodique mais cette fois sans bleu pour éliminer une partie du bleu contenu dans le gel et ainsi faciliter la visualisation des protéines. La migration des protéines est effectuée à 4°C en appliquant un programme avec différents voltages (30 min à 75 Volts, 30 min à 100 Volts, 30 min à 125 Volts, 1h à 150 Volts, 30 min à 175 Volts puis à 200 Volts jusqu'à ce que les protéines ne migrent plus). Une fois la migration effectuée, il est possible de conserver le gel en bleu natif plusieurs jours à 4°C avant de découper les bandes du gel pour les faire migrer dans une 2^{ème} dimension.

Tableau 2.9 : Compositions des solutions pour le gel de migration en gradient (5-15 % acrylamide) et pour le gel de tassement. * l'acide α-amino-n caproïque augmente la solubilité des protéines et est aussi un inhibiteur de protéase.

	Solution concentrée	Solution diluée	Gel de tassement
% acrylamide	15%	5%	5%
Acrylamide 30 % [29 :1]	1.5 mL	0.5 mL	0.75 mL
Tampon Bis-Tris HCl 150mM à pH7, acide α-amino-n caproïque *1.5 M	1 mL	1 mL	1.5 mL
Glycérol 80%	0.75 mL	0.75 mL	-
H ₂ O mQ	-	qsp 3 mL	qsp 4.5 mL
Persulfate d'ammonium 10 % (p/v)	8 µL	8 µL	45 µL
Temed	2.8 µL	2.8 µL	4.5 µL

***** 2^{ème} dimension sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes**

Les sous-unités des complexes membranaires séparées en conditions natives dans une 1^{ère} dimension sont séparées dans une 2^{ème} dimension en conditions dénaturantes.

Le système de migration de gel *Protean II Xi de Bio-Rad* est utilisé, avec des plaques de verre de 22.5*20 cm, des espaceurs et des peignes de 1 mm d'épaisseur. Après migration en 1^{ère} dimension, les bandes du gel d'intérêt sont découpées à l'aide d'un scalpel et incubées 1h à 20°C sous agitation dans du tampon dénaturant (Tris-HCl 138 mM pH 6.8, urée 6M, glycérol 22.2 % , SDS 4.3 %, β-mercaptoéthanol 5 % v/v). Elles sont ensuite déposées sur un gel SDS-

PAGE à 15 % d'acrylamide (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urée 6 M, glycérol 30 %, SDS VWR 2 %, trace de bleu de bromophénol). Elles sont scellées avec une solution d'agarose (0.5 % p/v). La migration se fait durant la nuit à 15°C.

2.7.d. Reproductibilité des gels 2D

Suite à des problèmes de reproductibilité, les expériences présentées ci-dessous sur des protéines de la fraction soluble de la souche WT*2 de *T. elongatus* cultivée en présence d'ion calcium ont été effectuées. Dans le protocole utilisé au début des expériences, les protéines sont diluées dans un tampon contenant notamment une forte concentration en urée (urée 8 M, CHAPS 4 % w/v, DTT 20 mM, IPG buffer 1 %, ampholytes 1 %) puis déposées dans un récipient en céramique. Ce mélange est ensuite recouvert par une bandelette constituée de gel d'acrylamide sec sur laquelle les protéines vont s'adsorber. La bandelette immergée dans le mélange de tampon et de protéines est recouverte par de l'huile minérale pour éviter sa déshydratation partielle et est incubée une nuit sous un voltage de 30 Volts. Ensuite, différents voltages sont appliqués sur la bandelette pour réaliser l'IEF. Le programme d'IEF utilisé est le suivant (Étape 1 : 1h à 500 Volts, étape 2 : 1h à 1000 Volts, étape 3 : 3h30 à 8000 Volts en gradient, étape 4 : 1h à 8000 Volts à voltage constant). Curieusement, des cristaux ont été observés à plusieurs reprises (probablement d'urée avec un mélange de protéines) dans le récipient au-dessus de la bandelette après l'étape de réhydratation ou d'IEF. Cette cristallisation perturbait la migration des protéines en 1^{ère} dimension. Pour essayer d'éliminer ce phénomène, plusieurs paramètres pendant la phase de réhydratation des bandelettes et d'IEF ont été changés: le pourcentage d'ampholytes (de 0.5 à 2 %), la concentration en urée (de 8 M à 5.7 M), la concentration du détergent CHAPS (de 4 à 2.8 %), ainsi que le programme d'isoélectrofocalisation. Plusieurs gels d'électrophorèse 2D ont été obtenus, quelques exemples sont présentés dans la figure suivante, les gels (Figure 2.18A à C) sont inexploitable. La cristallisation de l'urée a des répercussions sur l'IEF des protéines (Figure 2.18 A à C). Après les conseils du fournisseur et après avoir fait varier les différents paramètres énumérés précédemment, aucun résultat meilleur n'a pas été obtenu. Une autre série de gels a été réalisée avec un tampon de solubilisation de protéines commercial (dont la composition n'est pas donnée).

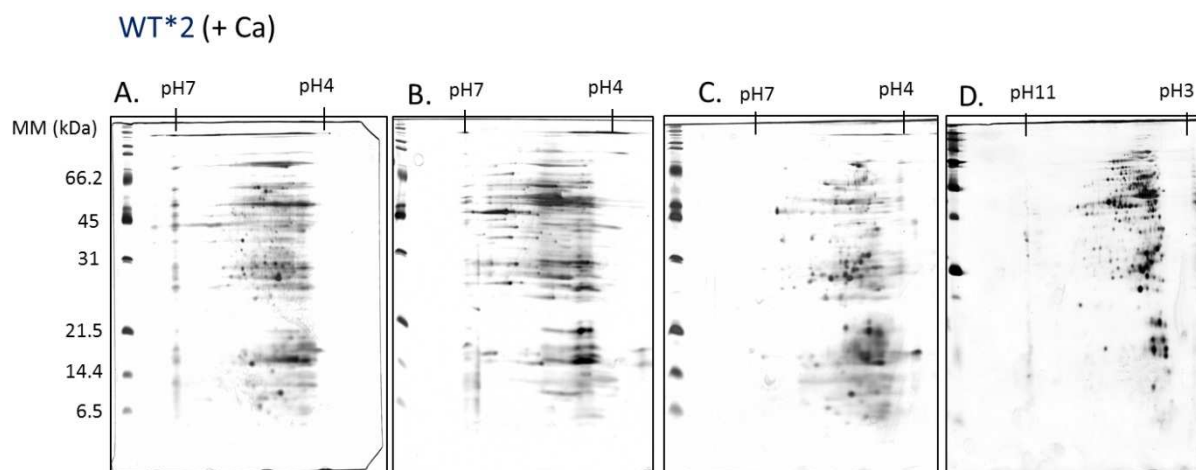


Figure 2.18 : Effets de la cristallisation du mélange (protéines, urée, CHAPS) sur la migration des protéines en électrophorèse 2D (sur gels A,B,C). Comparaison avec un gel témoin (D) sans cristallisation. Paramètres de l'expérience :

- A. Ampholytes 1 %, urée 6.7 M, CHAPS 3.3 %
- B. Ampholytes 1 %, urée 6.7 M, CHAPS 3.3 % . S4 : 1h30 à 8000 Volts
- C. Ampholytes 0,5 %, urée 6.7 M, CHAPS 2.8 %
- D. Ampholytes 0,5 %, tampon de solubilisation commercialisé par le fournisseur

La bandelette et les protéines sont mises dans ce tampon sous un papier humide pendant 30 minutes avant la réhydratation de la bandelette et un couvercle plus grand est placé au-dessus du récipient dans lequel se trouve la bandelette pendant la 1^{ère} dimension pour limiter au maximum l'évaporation. Avec ces précautions, des résultats satisfaisants sans cristallisation d'urée et de protéines en 1^{ère} dimension ont pu être obtenus. Ces résultats suggèrent que la cristallisation était liée à l'évaporation et/ou à la composition du tampon de solubilisation des protéines.

2.7.e. Numérisation et séchage des gels 2D

L'analyse des gels nécessite une transformation de l'image du gel 2D en données numériques. Au cours de cette étape le logiciel découpe l'image en pixels pour la transmission et le stockage des données. Pour une analyse différentielle, le nombre de gels dans chaque série doit être suffisant pour qu'une analyse statistique puisse permettre de définir de façon objective les variations d'intensité des bandes en rapport avec le processus biologique étudié. Une analyse différentielle fiable nécessite d'établir une comparaison entre des séries d'au

moins trois gels. Les gels sont numérisés et analysés avec le logiciel *Image Master 2D* (Amersham Biosciences) puis conservés secs entre deux papiers cellophanes après avoir été incubés dans un mélange contenant de l'éthanol (10%), de l'acide acétique (10 %) et du glycérol (5 %).

2.7.f. Spectrométrie de masse sur gels 2D

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées dans le service d'ingénierie moléculaire des protéines (SIMOPRO, CEA Saclay) par le Dr. Robert Thaï. Les protéines séparées sur gels 2D sont clivées à l'aide d'une protéase, la trypsine (clivage du côté C-terminal des lysines et arginines excepté quand elles sont suivies d'une proline). L'échantillon est placé dans la source du spectromètre de masse *MALDI* (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*). Il est bombardé par le laser ce qui entraîne l'ionisation de certains peptides. Une empreinte de masse peptidique *PMF* (pour *Peptide Mass Fingerprint*) est générée. Les échantillons sont donnés sous forme de spots découpés de gel 2D. Pour éliminer le SDS et les colorants, ils sont rincés deux fois avec du bicarbonate d'ammonium (500 µL de NH_4HCO_3 100 mM à pH 8), puis deux fois avec un mélange contenant du bicarbonate d'ammonium et 50 % d'acétonitrile (500 µL de NH_4HCO_3 50mM + CH_3CN 50 %). Ils sont ensuite déshydratés partiellement pour être réhydratés dans un plus petit volume de bicarbonate d'ammonium (20 µL de NH_4HCO_3 50mM à pH8). Une solution de trypsine (50 ng/µL dans NH_4HCO_3 100mM à pH8) est ensuite ajoutée. La digestion protéolytique a lieu 2 heures à 50°C. Elle est arrêtée par acidification avec une solution d'acide trifluoroacétique (TFA à 1 % final). Un dessalage et une pré concentration des échantillons par chromatographie en phase inverse (*Zip Tip micro C18*) sont effectués. Les échantillons sont directement déposés sur une plaque dans une solution contenant une solution de matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (4-HCCA à 10 mg / mL dans 50 % d'acétonitrile avec TFA à 0.1 %). Puis les analyses en spectrométrie de masse sont réalisées pour générer une PMF de la protéine. Cette PMF est soumise à l'outil de recherche *Mascot* pour identifier les protéines candidates dans la base de données non redondantes de *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*).

2.8. Biophysique

2.8.a. Spectroscopie d'absorption électronique

Le spectrophotomètre utilisé est un Uvikon XL – Secomam 922 de Kontron *instruments*.

* Réduction au dithionite ou à l'ascorbate de TII0287

La solution de dithionite ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$) à 100 mM sont fraîchement préparée avant chaque expérience. Le tampon dans lequel est dissout le dithionite (tampon MES 100 mM pH 5 ou 6, tampon MOPS 100 mM pH 7,6 ou tampon CAPS 100 mM pH 10) est désoxygéné par bullage d'argon. La préparation contenant le cytochrome purifié dans du tampon au pH voulu est maintenue dans la cuve du spectrophotomètre sous atmosphère d'argon pour éviter la ré-oxydation de l'échantillon pendant les mesures. L'échantillon protéique est mélangé au dithionite et les spectres d'absorption sont enregistrés.

2.8.b. Spectroscopie de diffusion de résonance Raman

L'effet Raman, découvert en 1928, a été appliqué pour la première fois à des échantillons biologiques dans les années 1970. C'est une méthode d'analyse non destructive de la matière fondée sur les propriétés moléculaires. Quand la lumière est propagée à travers un échantillon, elle est réfléchiée, absorbée, transmise et une partie, généralement petite, est diffusée. La majorité de la lumière diffusée se fait de façon élastique, c'est-à-dire sans modification de longueur d'onde, c'est la diffusion *Rayleigh*. Une petite fraction est cependant diffusée de manière inélastique, c'est la diffusion *Raman*. Pour un échantillon éclairé par la lumière monochromatique d'un laser, de fréquence ν_0 , le spectre de la lumière diffusée observé est constitué d'une bande très intense de fréquence ν_0 (raie *Rayleigh*) et de part et d'autre de cette bande, de bandes de faibles intensités résultant de la diffusion *Raman*.

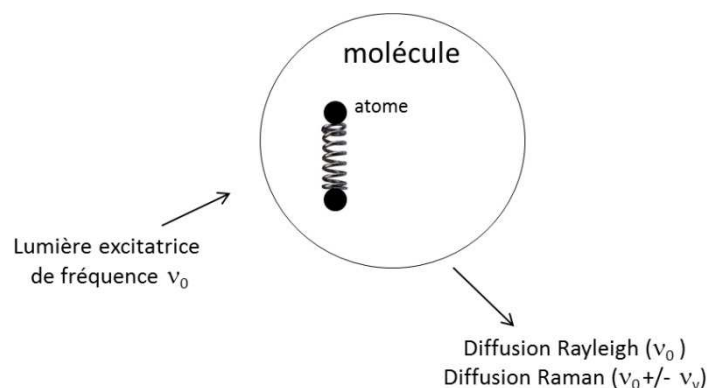


Figure 2.19 : Représentation schématique de la diffusion de la lumière par une molécule polyatomique. La vibration moléculaire est représentée par un ressort oscillant à une fréquence ν_v (figure modifiée de la thèse d'A. Desbois).

Les différences de fréquence (ν_v) entre les fréquences de ces bandes ($\nu_0 \pm \nu_v$) et la fréquence excitatrice (ν_0) correspondent à des fréquences vibrationnelles de la molécule étudiée. Le phénomène de diffusion Raman de résonance se produit quand la fréquence de la lumière d'excitation coïncide avec une bande d'absorption électronique de la molécule. L'intensité de la lumière diffusée est alors amplifiée d'un facteur allant jusqu'à 10^6 par rapport au rendement de la diffusion Raman non résonnante. Cette exaltation permet d'obtenir des spectres Raman de molécules en solution aqueuse à des concentrations de 10^{-3} à 10^{-6} M.

Pour une transition électronique de Soret à 400 nm, l'énergie est de $25\,000\text{ cm}^{-1}$. Les fréquences des modes vibrationnels (σ_{vib}) de l'hème sont détectés entre 20 et 2000 cm^{-1} . Si la longueur d'onde d'excitation de la molécule fictive se situe à 400 nm (σ_2) (Figure 2.20), l'énergie de cette lumière est alors suffisante pour exercer un effet de résonnance Raman (représenté en bleu sur le diagramme énergétique de la figure 2.20). La spectroscopie Raman de résonance (RR) est une technique vibrationnelle qui permet d'obtenir des informations détaillées sur la structure des métalloprotéines. Les spectres obtenus représentent la variation de l'intensité diffusée en fonction du nombre d'onde (en cm^{-1}) (Figure 2.21). Dans nos expériences, nous nous intéressons aux bandes de Stokes car elles sont plus intenses que les bandes anti-Stokes. Au début de chacune des expériences sur les cytochromes réduits, un spectre de la forme oxydée est systématiquement enregistré. A la fin de chacune des expériences de réduction, le spectre réduit final est comparé à celui obtenu au démarrage de l'expérience pour s'assurer que le cytochrome n'a pas été endommagé lors de l'expérience. Pour chaque expérience : 100 μL de Tll0287 purifié à 200 μM final seul ou additionné d'agent réducteur (dithionite) à une valeur de 50 équivalents c'est-à-dire à 10 mM final. Toutes les expériences ont été réalisées au moins en triplicat. Les spectres ont été obtenus

grâce à un spectromètre Jobin-Yvon U1000, équipé d'un détecteur de type CCD (*Charge Coupled Deviced*) (Spectra One, Jobin-Yvon) refroidi à l'azote liquide. La source excitatrice a été sélectionnée en fonction des spectres d'absorption UV-visible des cytochromes c étudiés. La raie à 413.1 nm d'un laser à krypton ionisé (Coherent Innova) (50 mW) a été utilisée pour exciter les hémoprotéines dans la région de Soret. Chaque spectre représente une collection pour chaque fenêtre de détection de 6 cycles d'accumulation de 20 à 30 secondes. Les données présentées correspondent à une moyenne de 3 à 4 spectres. L'analyse spectrale a été réalisée au moyen du logiciel Grams 32 (Galactic Industries). La précision des fréquences est de 0,5 à 1 cm^{-1} pour les bandes les plus intenses et de 1,5 à 2 cm^{-1} pour les bandes faibles et les épaulements.

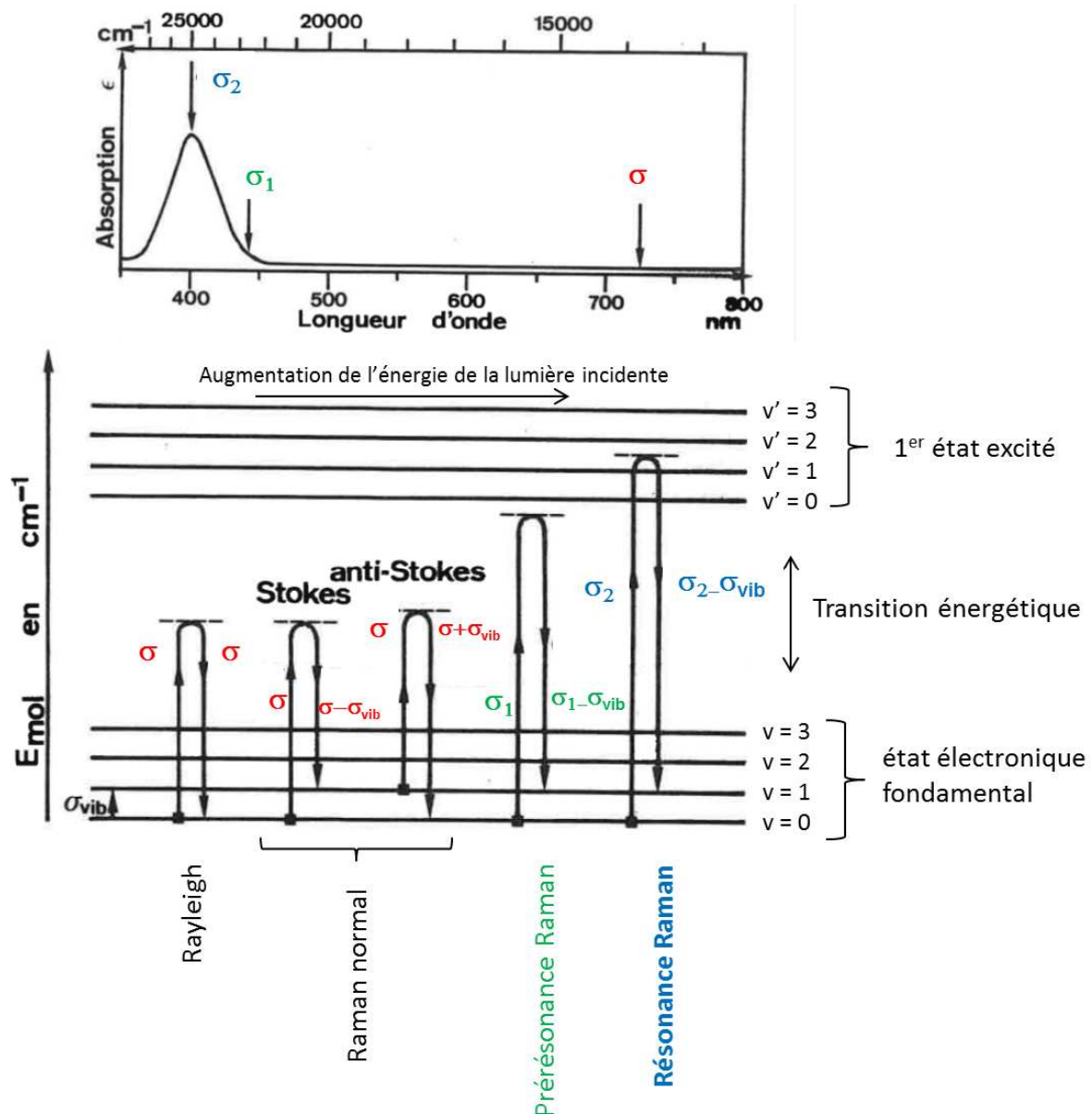


Figure 2.20 : Spectre d'absorption électronique et diagramme énergétique des diffusions Rayleigh et Raman d'une molécule fictive. Ce diagramme énergétique n'est pas à l'échelle. v et v' sont des sous-niveaux vibrationnels. La ligne en tiret schématise l'état virtuel atteint par la molécule au moment de son interaction avec un photon. E = énergie moléculaire. σ = nombre d'onde (v/c) = $1/\lambda$. ν = fréquence (figure modifiée de la thèse d'A. Desbois).

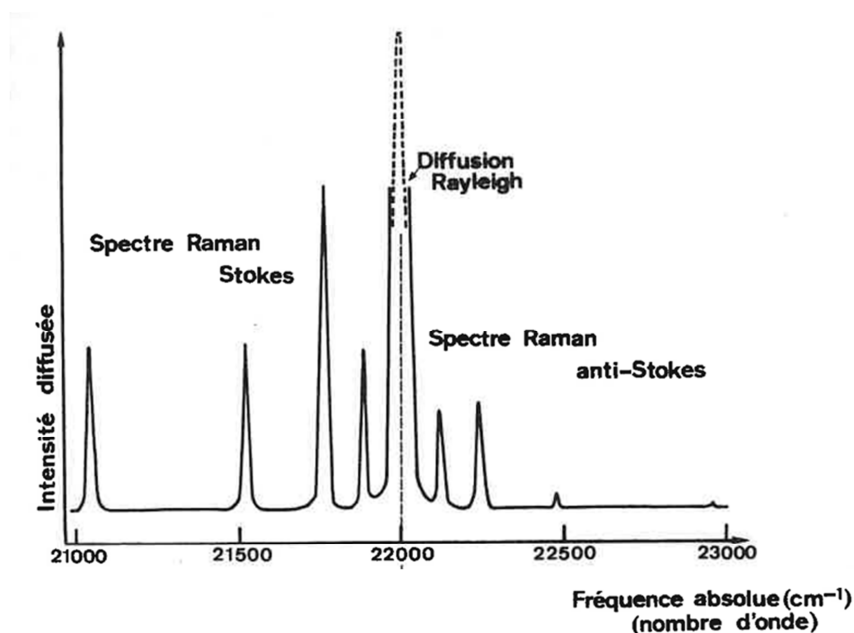


Figure 2.21 : Présentation d'un spectre Raman (thèse d'état d'A .Desbois). Les bandes Raman situées vers les bas nombres d'onde par rapport à la raie Rayleigh sont appelées bandes Stokes, celles observées de l'autre côté sont appelées bandes anti-Stokes.

2.8.c. Spectrométrie d'absorption atomique

L'absorption atomique est une technique d'analyse élémentaire dans lequel le composé étudié est transformé à l'état d'atomes libres. Pour le dosage du fer dans une protéine, une gamme est réalisée entre 0 et 100 $\mu\text{g/L}$. Ensuite l'échantillon à doser est dilué afin que la mesure se situe dans la gamme étalon. L'échantillon est déposé dans le four, séché à 130°C , puis minéralisé à 1400°C et enfin atomisé à 2450°C . J'ai récupéré en 2008 un spectromètre d'absorption atomique *Perkin Elmer 4110ZL* dans un autre laboratoire du CEA et je l'ai mis en place et en service dans notre laboratoire. C'est sur cet appareil que les mesures ont été réalisées.

2.9. Electrochimie – Titrage redox par spectroscopie d'absorption

Le potentiel moyen d'oxydoréduction (ou redox) d'une protéine reflète sa capacité à accepter ou à céder des électrons. Pour déterminer le potentiel redox, les spectres de différence entre la forme complètement oxydée (ou réduite) de l'échantillon et les autres formes obtenues après avoir imposé différents potentiels dans une cellule d'électrochimie à l'aide d'un potentiostat

sont mesurés. En fonction de ces spectres de différence, deux ou plusieurs longueurs d'ondes sont choisies pour permettre d'évaluer le changement spectral lié à la transition redox. L'utilisation de deux longueurs d'onde (dans notre cas, nous choisirons des longueurs d'onde se situant dans la bande de Soret) permet de s'affranchir d'éventuelles dérives de la ligne de base. La variation de ces différences d'absorption en fonction du potentiel imposé est ensuite tracée. La série de points est ajustée avec l'équation de Nernst avec un nombre d'électrons égal à 1 (voir paragraphe 1.3.b de l'introduction). L'utilisation de médiateurs qui sont des molécules organiques redox actives peut faciliter et accélérer le transfert des électrons au cœur de la protéine à titrer. Dans tout le manuscrit de thèse, les valeurs sont données par rapport à l'électrode standard à hydrogène (noté vs SHE ou ESH). Toutes les expériences ont été réalisées à 20°C.

2.9.a. Expériences au BIP

Les expériences de titrage de Tll0287 ont été réalisées avec le Dr. Frauke Baymann au laboratoire BIP (Bioénergétique et Ingénierie des Protéines) du CNRS à Marseille. Un calibrage de l'électrode d'argent a été fait au préalable afin de déterminer exactement les valeurs par rapport à l'électrode standard à hydrogène. Le titrage redox est effectué grâce à une cellule d'électrochimie présentée dans la figure 2.22.

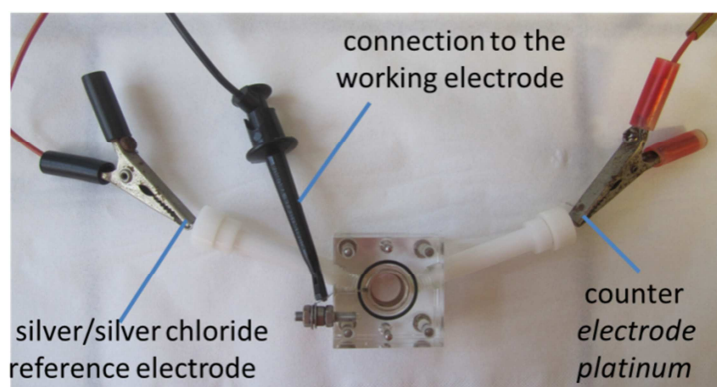


Figure 2.22 : Cellule d'électrochimie composée d'une électrode de travail (grille d'or au centre de la cellule), d'une électrode de référence (Ag/AgCl) et d'une contre électrode de platine.

L'échantillon de protéine est injecté dans l'espace se trouvant au-dessus de l'électrode de travail. L'électrode de travail est une grille d'or préalablement traitée avec le composé chimique PATS4 (pyridine-3-carboxaldéhyde-thiosemicarbazone). Ce composé est attaché à la surface de la grille d'or par des fonctions thiol et expose des groupements NH_4^+ et COO^- en

solution interagissant avec les protéines tout en évitant l'adsorption des protéines à l'électrode. Les électrons sont transférés au niveau de cette grille. L'électrode de référence au chlorure d'argent est constituée par un fil d'argent (Ag) enrobé d'une couche de chlorure d'argent (AgCl) immergé dans une solution aqueuse de chlorure de potassium (KCl) à 3M. Un potentiostat est utilisé pour imposer un potentiel électrique à l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence. La mesure de courant est faite entre l'électrode de travail et la contre électrode (Pt). La cellule a un trajet optique de 30 μm . Elle est placée dans un spectrophotomètre UV-visible (Cary 5E) dans lequel vont être mesurés puis enregistrés les spectres d'absorption de l'échantillon entre 400 et 700 nm.

Dans le cas d'un titrage dans le sens de la réduction, le potentiel électrique imposé à la cellule est inférieur à celui imposé initialement pour oxyder le cytochrome. Dans le cas d'un titrage dans le sens de l'oxydation, le potentiel électrique imposé à la cellule est supérieur à celui imposé initialement pour réduire le cytochrome. Des pas de 25 mV sont effectués. Les spectres d'absorption sont enregistrés après équilibrage quand les spectres n'évoluent plus. Le titrage est effectué dans le sens de l'oxydation et de la réduction pour vérifier la réversibilité. Les spectres de différence entre l'échantillon complètement oxydé (ou réduit) et tous les autres sont calculés. Les échantillons sont dilués puis concentrés sur filtre Amicon Ultracel 3K dans un tampon (MES 100 mM + MOPS 100 mM + CAPS 100 mM + KCl 50 mM) à pH 10 et 5. L'utilisation d'un mélange de tampon permet de faire varier le pH et de s'affranchir d'un éventuel effet du tampon sur la protéine. Un volume de 100 μL de Tl0287 à 200 μM dans du mélange de tampon est injecté dans la cellule de titrage. Les mesures sont faites sans médiateurs car nous avons vérifié auparavant que le cytochrome échange ses électrons directement avec la grille d'or modifiée et que le système s'équilibre rapidement (après 5-10 minutes).

2.9.b. Expériences à l'IBPC

Les expériences de titrage pour le cytochrome c_6 et PsbV2 ont été réalisées dans le laboratoire du Dr. Fabrice Rappaport à l'IBPC sur un système de type Joliot construit dans leur laboratoire. Les titrages d'oxydo-réduction ont été réalisés dans une cellule électrochimique (de 100 μm de trajet optique) avec trois électrodes : une électrode de platine, une grille d'or modifiée avec PATS4 une électrode de référence Ag / AgCl dans 3M de KCl. Les mesures des spectres d'absorption entre 380 et 600 nm sont enregistrés. Un mélange contenant le cytochrome purifié (60 μM final), 15 médiateurs (à 1 μM final chacun, voir la liste ci-

dessous), KCl (100 mM final), de la glucose oxidase (20 mg/mL) et du glucose (20 mM) est déposé sur la grille d'or.

Tableau 2.10 : Liste des médiateurs avec leur potentiel redox utilisés pour le titrage électrochimique.

	E_0 vs SHE pH 7
ferricyanure de potassium	+ 430 mV
diaminodurool	+ 341 mV
p-benzoquinone	+ 280 mV
2,5-diméthyl p-benzoquinone	+ 180 mV
phénazine methosulfate	+ 80 mV
ascorbate	+ 58 mV
duroquinone	+ 5 mV
ménadione	0 mV
2,5,2-dihydroxy-pbenzoquinone	- 60 mV
anthraquinone	- 100 mV
anthraquinone 1,5-disulfonate	- 170 mV
anthraquinone 2-sulfonate	- 225 mV
safranine T	- 289 mV
benzyl viologène	- 350 mV
méthyl viologène	- 440 mV

2.9.c. Expériences au CEA

Ces expériences ont été réalisées dans le laboratoire du Dr. Jérôme Santolini dans le service au CEA de Saclay. L'objectif est d'utiliser une cellule électrochimique réalisée sur mesure pour son laboratoire et dont la géométrie pourra être utilisée en spectroscopie Raman. Le volume de cette cellule est de 2 mL, le trajet optique est de 1 cm. La cellule électrochimique utilisée est représentée dans la figure 2.23. L'électrode de travail est une grille en or fixée sur une structure en polyméthylméthacrylate, la contre-électrode est constitué d'un fil de platine isolé de la solution par un pont salin et l'électrode de référence est une microélectrode Ag/AgCl/KCl 3M (Drif 2, World Precision Instruments). Un barreau aimanté est placé sous la cage d'or.

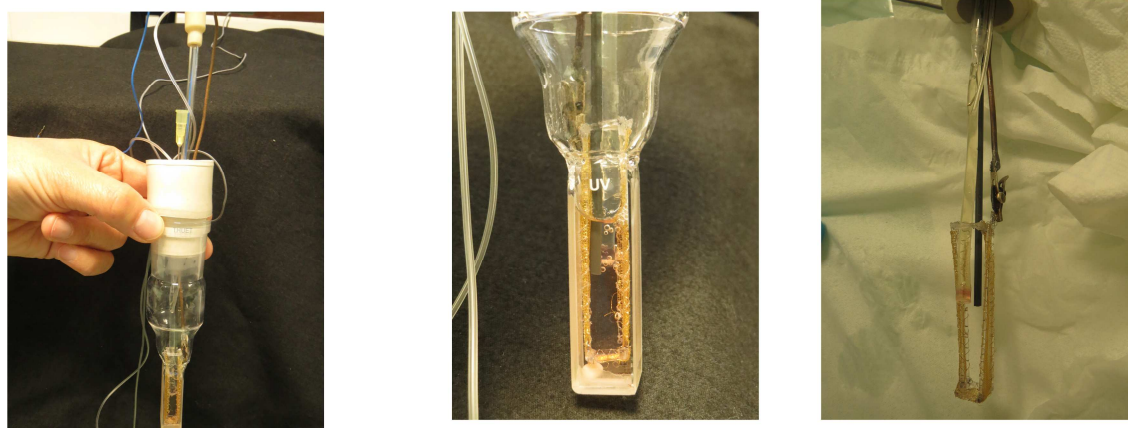


Figure 2.23 : Cellule de spectroélectrochimie avec une électrode de travail = cage en or, une contre électrode en platine et une électrode de référence Ag/AgCl.

Tous les potentiels sont indiqués par rapport à l'électrode standard à hydrogène (ESH) en tenant compte de l'électrode de référence Ag/AgCl. La cellule contenant les médiateurs est désoxygénée pendant 30 minutes sous flux d'azote puis placée dans le spectrophotomètre. L'échantillon lui-même désoxygéné est ensuite ajouté à l'aide d'une seringue. Un potentiel électrique est imposé au système grâce à un potentiostat. Le courant est mesuré et les spectres d'absorption sont enregistrés toutes les 2 minutes sur un spectrophotomètre d'absorption Uvikon XL, Secomam. Le système est considéré à l'équilibre quand les spectres d'absorption se superposent parfaitement dans le temps, quand la mesure du potentiel libre de la solution correspond au potentiel imposé et quand le courant dans la cellule est quasiment nul.

RESULTATS & DISCUSSIONS

3. Protéomique de la cyanobactérie

Thermosynechococcus elongatus

3.1. Introduction	90
3.2. Du calcium à la place du strontium dans les milieux de culture	91
a. Le calcium dans la cellule	91
b. Le calcium dans le PSII	91
3.3. Etude protéomique sur des cellules WT 43H de <i>T. elongatus</i> cultivées en présence de calcium ou de strontium	92
a. L'expression des protéines de la fraction membranaire	93
b. L'expression des protéines de la fraction soluble	97
3.4. Comparaison d'expression de protéines chez différents variants de D1 de <i>T. elongatus</i>	99
a. Carte 2D de référence	99
b. Points critiques pour la reproductibilité des gels 2D	100
c. Comparaison des fractions solubles des variants de D1	102
3.5. Mais où est donc passée la protéine Tll0287 ?	102
a. A la recherche de Tll0287 en 1 ^{ère} dimension	102
b. Un outil de recherche plus spécifique de Tll0287 : un anticorps polyclonal	105
c. A la recherche de Tll0287 en 2 ^{ème} dimension	107
3.6. Conclusion	110

3.1. Introduction

Il a été montré que certains changements d'acides aminés des différents mutants de D1 (voir paragraphe 2.1.b du chapitre matériels et méthodes) induisaient des changements au niveau moléculaire, lors de la catalyse de l'oxydation de l'eau (Sugiura and Boussac 2014). Dans la première partie de mon travail de thèse, nous nous sommes demandés si les différences d'acides aminés entre les différents variants de D1 induisaient aussi des changements au niveau du protéome. L'étude a été menée en utilisant des outils d'électrophorèse bidimensionnelle. Pour étudier un ensemble de protéines, la technique la plus simple est de les faire migrer sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes dans une dimension (*SDS-PAGE*). Les différentes souches mutantes de D1 de *T. elongatus* ont été cultivées dans des conditions standards (voir partie matériels et méthodes) et la fraction soluble des protéines a été analysée par *SDS-PAGE* (Figure 3.1).

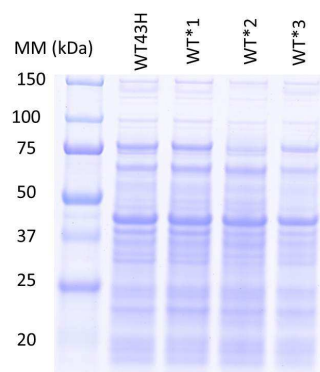


Figure 3.1 : Electrophorèse (*SDS-PAGE* 15% en présence d'urée 6M) de protéines (100 µg) de la fraction soluble des différents mutants de D1, les protéines du gel sont colorées au bleu de Coomassie.

Dans les conditions de l'expérience aucune différence significative entre les quatre souches n'est visible. Il a donc été décidé d'utiliser des outils de protéomique plus performants : les gels d'électrophorèse en deux dimensions afin de pouvoir comparer de façon plus précise l'expression des différentes protéines dans les différentes souches (WT 43H, WT*1, WT*2 et WT*3). Avant de rentrer dans le cœur de ce sujet, une étude protéomique préliminaire concernant l'influence du remplacement du calcium par le strontium sur l'expression des protéines dans la souche WT 43 H de *T. elongatus* a été réalisée. Cette étude m'a permis de mettre en place les différents protocoles de gels d'électrophorèse bidimensionnelle.

3.2. Du calcium à la place du strontium dans les milieux de culture

3.2.a. Le calcium dans la cellule

Le calcium joue un rôle très important chez les eucaryotes. Il sert de messenger universel, en transmettant des signaux de la surface vers l'intérieur des cellules. La régulation du calcium et son rôle n'ont pas été aussi bien étudiés chez les bactéries que chez les eucaryotes (Shi, Zhao et al. 2006) et encore moins chez les cyanobactéries. Chez les bactéries, il y a des évidences que les changements de concentration de calcium intracellulaire sont associés à la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires comme la maintenance de la structure cellulaire, la motilité, la division cellulaire, l'expression des gènes, la différenciation cellulaire (Dominguez 2004). Chez les cyanobactéries, il a été montré que le calcium était essentiel dans les réactions photosynthétiques et qu'il pouvait aussi être un signal de différenciation pendant la formation des hétérocystes. Il a également été montré que le calcium pouvait avoir un rôle dans le transport du bicarbonate par la protéine CcmpA qui fait partie d'un transporteur ABC (Koropatkin, Koppenaal et al. 2007) chez *Synechocystis PCC6803*. En 2000, pour la première fois, il a été mis en évidence un signal de transduction dû au calcium chez *Anabaena* (Torrecilla, Leganes et al. 2000).

3.2.b. Le calcium dans le PSII

Dans la première structure cristallographique du PSII publiée en 2001 à une résolution de 3.8 Å (Zouni, Witt et al. 2001), l'ion calcium n'avait pas été vu dans le site catalytique, le cluster de manganèse. Mais trois ans plus tard, une équipe de cristallographes de Londres a publié une structure à une résolution de 3.5 Å (Ferreira, Iverson et al. 2004) dans laquelle l'ion calcium était visible dans le cluster de manganèse. Pour étudier le rôle du calcium dans le PSII, il a été montré qu'il est possible de remplacer les ions calcium (Ca^{2+}) par des ions strontium (Sr^{2+}) *in vivo* dans le milieu de culture pendant la croissance des cellules (Boussac, 2004). Il a été montré par analyse de la diffraction des rayons X sur des cristaux de PSII que l'ion Ca^{2+} était remplacé par un ion Sr^{2+} dans l'OEC (Kargul, Maghlaoui et al. 2007). Le strontium a été dosé par absorption atomique sur des échantillons de PSII purifié, et il a été montré qu'il n'y avait qu'un seul ion Sr^{2+} par PSII. Naoko Ishida a montré pendant sa thèse que les cellules cultivées en présence de Sr^{2+} dégageaient 40 % d'oxygène en moins par rapport à celles cultivées en présence de Ca^{2+} . L'activité du PSII purifié à partir des cellules

en présence de Sr^{2+} est quant à elle diminuée de 60 %. Cette perte d'activité pouvait être due à une forte diminution d'activité de certains centres réactionnels ou à un ralentissement de l'activité enzymatique de tous les centres. Ishida et al. ont mis en évidence par des études spectroscopiques que cette baisse d'activité était liée à un ralentissement du transfert d'électrons et plus précisément dans la phase de S3 à S0 (Ishida, Sugiura et al. 2008). Il a été montré que ce ralentissement correspondait à une modification de l'environnement électrostatique de la chlorophylle P_{680} qui implique probablement des mouvements de protons. Sachant que l'ion Ca^{2+} est un cofacteur obligatoire du complexe d'oxydation de l'eau, qu'il est directement impliqué dans la fixation des molécules d'eau, le remplacement de l'ion Ca^{2+} par l'ion Sr^{2+} a permis de préciser le rôle du calcium dans le fonctionnement enzymatique du PSII (Ishida, Sugiura et al. 2008).

L'objectif de la première partie de ma thèse a été de vérifier si le remplacement du calcium par du strontium dans le milieu de culture induit des changements d'expression de protéines au niveau cellulaire dans la souche WT 43 H de *T. elongatus*.

3.3. Etude protéomique sur des cellules WT 43H de *T. elongatus* cultivées en présence de calcium ou de strontium

Dans un premier temps il a été vérifié que les cellules de la souche WT 43H de *T. elongatus* poussaient aussi bien en présence de strontium qu'en présence de calcium (Figure 3.2). La concentration en chlorophylle des cellules a été en même temps vérifiée. Elle est très peu affectée dans ces conditions de culture (Figure 3.3).

Des cellules de la souche WT 43H de *T. elongatus* cultivées dans du milieu contenant du calcium ou du strontium ont été récoltées en phase exponentielle de croissance à une densité optique à 750 nm proche de 0.55. Un spectre d'absorption entre 400 et 800 nm a été réalisé sur chaque type de culture et aucune différence n'a été observée, indiquant qu'il n'y a pas eu de changements significatifs au niveau des antennes photosynthétiques. Avant mon travail de thèse, la pratique d'électrophorèses en 2 dimensions pour l'analyse du protéome de *T. elongatus* n'était pas utilisée au laboratoire. Une partie de mon travail de thèse a consisté à mettre au point un protocole d'analyse par électrophorèse 2D d'échantillons issus du fractionnement cellulaire de *T. elongatus*. Les fractions membranaires et solubles des protéines ont été traitées indépendamment.

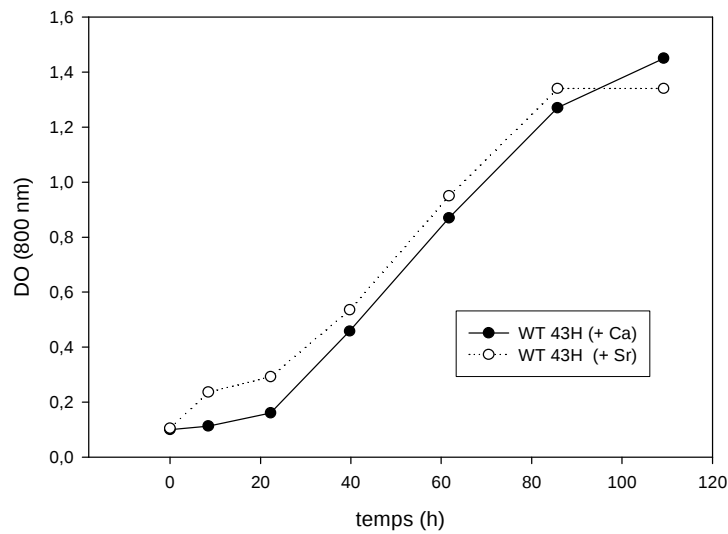


Figure 3.2 : Courbe de croissance de la souche WT 43 H de *T. elongatus* en présence de calcium (rond noir) ou en présence de strontium (rond blanc).

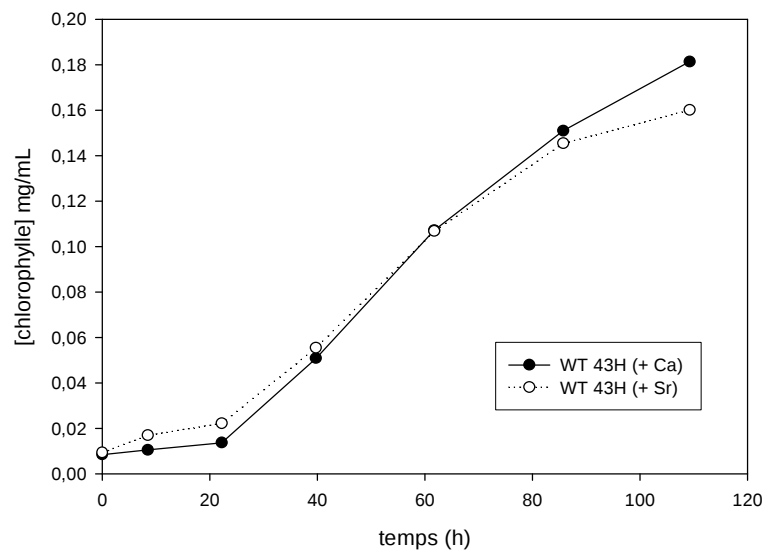


Figure 3.3 : Concentration en chlorophylle de la souche WT 43 H de *T. elongatus* au cours de la croissance en présence de calcium (rond noir) ou en présence de strontium (rond blanc).

3.3.a. L'expression des protéines de la fraction membranaire

Les protéines ont été séparées sur une gel bleu natif dans une première dimension selon le protocole décrit dans la partie matériels et méthodes (Figure 3.4). A l'issue de la première dimension sur gel en bleu natif, il est possible de distinguer neuf bandes individualisées (notées en chiffres romains de I à IX).

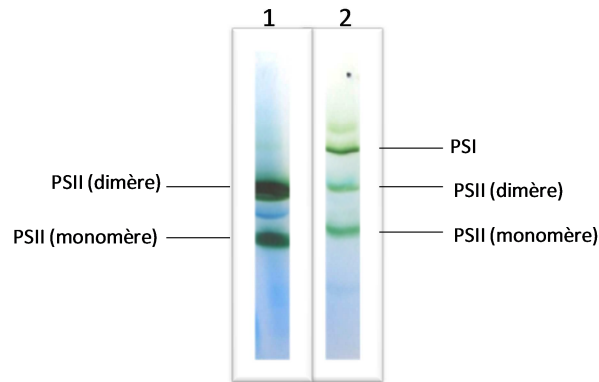


Figure 3.4 : Electrophorèse en bleu natif coloré au cours de la migration par le bleu de Coomassie présent dans le tampon de charge et de migration : PSII purifié à partir de cellules WT 43H de *T. elongatus* (puits 1) ; membranes solubilisées en β DM 2% de cellules WT 43H de *T. elongatus* (puits 2).

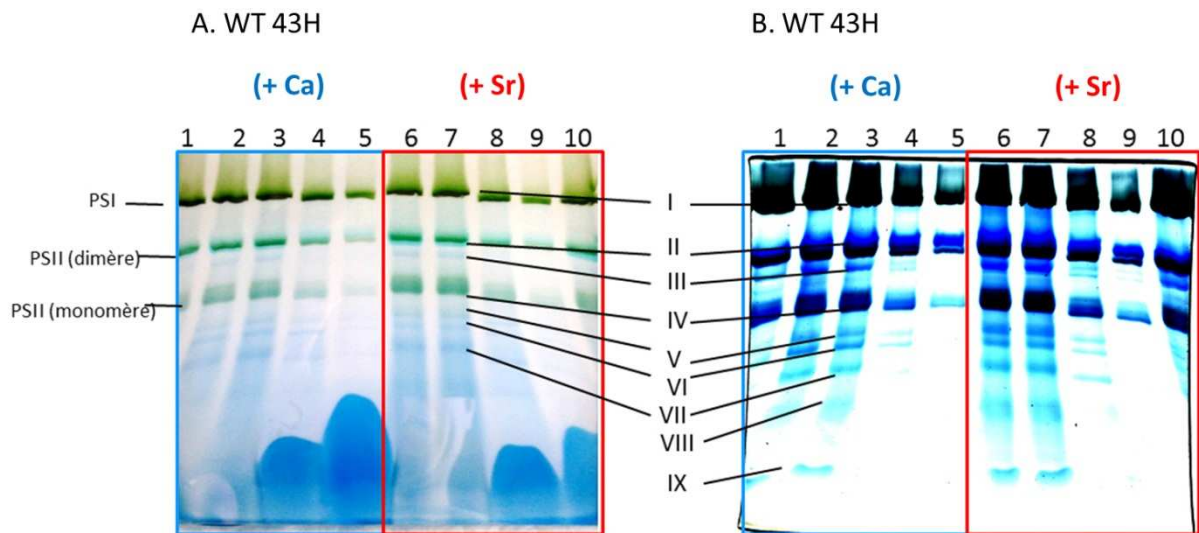


Figure 3.5 : Electrophorèse en bleu natif des protéines de la fraction membranaire de la souche WT 43H de *T. elongatus*. Les protéines sont colorées au cours de la migration par le bleu de Coomassie présent dans le tampon de charge et de migration (A) puis recolorées après migration sur le gel avec du bleu de Coomassie (B). Les cellules sont cultivées en présence de calcium (puits de 1 à 5) ou de strontium (puits de 6 à 10). Les quantités de chlorophylle déposées sont : 9 μ g (pistes 1-2-3-6-7-10) ; 4.5 μ g (pistes 4 et 8) et 2.25 μ g (pistes 5 et 9).

Un avantage de la séparation en condition native est que certains ligands et cofacteurs restent associés aux protéines. Par exemple, les bandes I, II et V apparaissent de couleur verte (Figure 3.5A) car les protéines contiennent de la chlorophylle. Cela permet de suivre visuellement la migration des protéines sur le gel. En parallèle de cette électrophorèse, des échantillons de

PSII purifié ont migré à côté de fractions membranaires de protéines solubilisés dans le détergent β -Dodécyl Maltoside (β DM) sur un gel en bleu natif (Figure 3.4).

Cette expérience m'a permis de repérer les bandes correspondant au PSII dans sa forme de monomère ou de dimère. Le complexe III (Figure 3.5) a été identifié comme étant le dimère de PSII et le complexe V comme étant le monomère de PSII. Les membranes des cyanobactéries sont constituées en grande partie par celles des thylakoïdes et il existe plusieurs autres complexes dans les membranes thylakoïdiennes (comme par exemple le cytochrome b_6f , la succinate déshydrogénase, la NADPH déshydrogénase, l'ATP synthase, la cytochrome c oxydase) (Nowaczyk, Sander et al. 2010; Carrieri, Wawrousek et al. 2011). Les bandes II, IV, VI à X (Figure 3.5) pourraient correspondre à certains de ces complexes.

En 1^{ère} dimension (Figure 3.5), aucune différence significative n'est observée entre les deux échantillons provenant de milieu de culture avec strontium et calcium. Les complexes protéiques de la fraction membranaire sont ensuite séparés en 2^{ème} dimension sur un gel dénaturant SDS-PAGE.

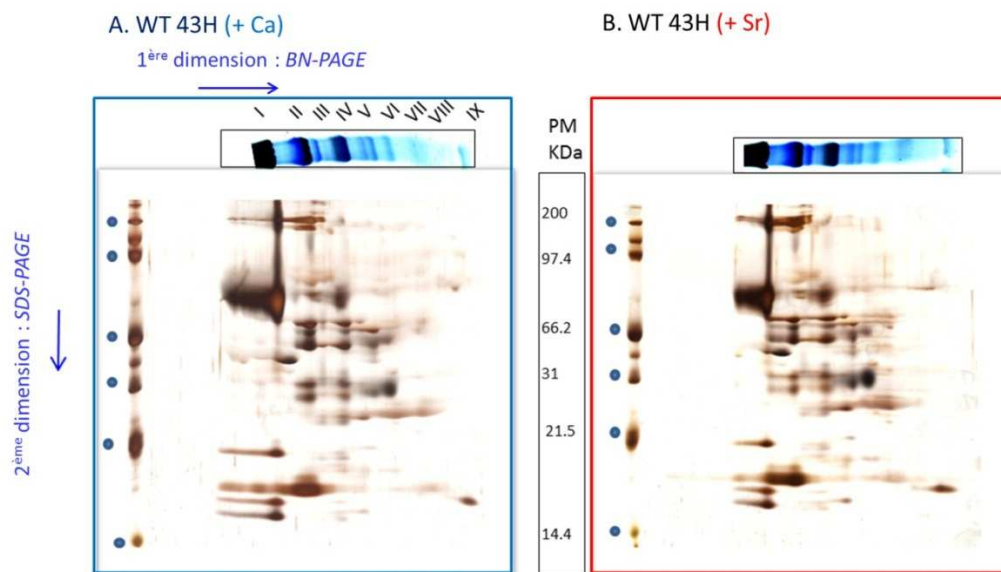


Figure 3.6 : Electrophorèse 2D en conditions dénaturantes (SDS-PAGE 15 %) de protéines de la fraction membranaire de cellules WT 43H de *T. elongatus* cultivées dans deux conditions (A) avec calcium ou (B) avec strontium. La piste 3 du BN PAGE de la figure 3.5 est déposée en haut du gel de 2^{ème} dimension (A) et la piste 7 du BN PAGE de la figure 3.5 est déposée en haut du gel de 2^{ème} dimension (B).

Aucune différence significative n'est observée entre les 2 gels 2D (Figure 3.6). Avec la coloration au nitrate d'argent, seules les sous-unités les plus abondantes sont détectées. Pour

simplifier la lecture du gel, les spots de protéines ont été identifiés par une lettre en minuscule (Figure 3.7).

WT 43H (+ Ca)

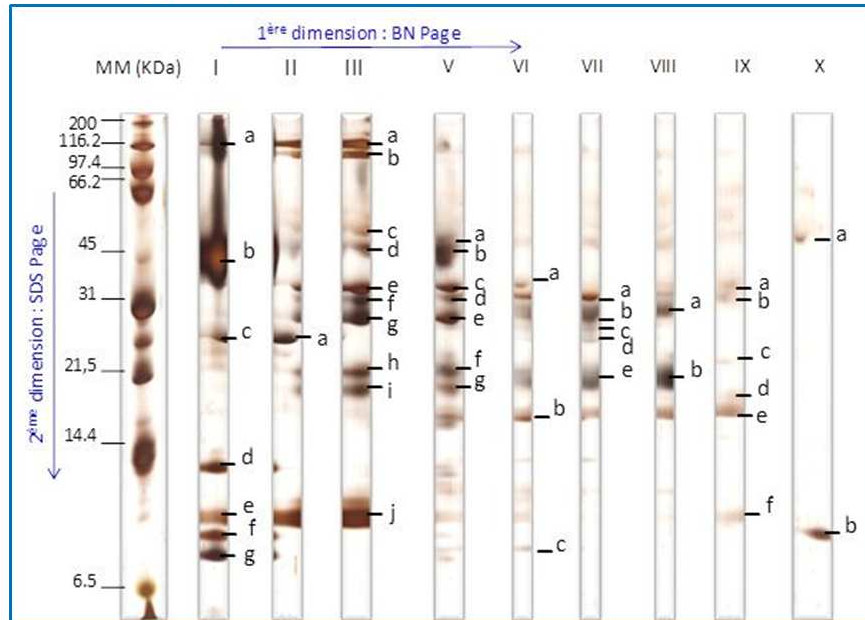


Figure 3.7 : Electrophorèse 2D en conditions dénaturantes (*SDS-PAGE* 15 %). Conditions avec calcium. Autre représentation de la figure 8. A.

Huit sous-unités sont attendues pour le PSII (pistes III et V Figure 3.6) chez *T. elongatus* (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Sous-unités du PSII séparées en 2 dimensions dans les pistes III et V sur la figure 3.6.

Piste III	Piste V	Protéines	Masse moléculaire (kDa)
III.c.	V.a.	CP 47	47
III.d.	V.b.	CP 43	43
III.e.	V.c.	D1	39,7
III.f.	V.d.	D2	39,3
III.g.	V.e.	PsbO	33
III.h.	V.f.	cytochrome c_{550}	15
III.i.	V.g.	PsbU	12
III.j.		sous-unité du cyt b_{559}	9,3

Les protéines III.a (environ 115 kDa) et III.b (environ 100 kDa) pourraient correspondre à des sous-unités non dissociées du PSII. Les protéines détectées provenant des cultures réalisées en présence de calcium ou de strontium migrent de façon identique sur les gels 2D et l'intensité des spots est équivalente (Figure 3.6). Ces résultats montrent que la composition des

membranes et la quantité des différentes sous-unités des complexes membranaires ne changent pas si les cellules sont cultivées dans un milieu contenant du strontium à la place du calcium. Cette information nouvelle n'était pas attendue. En effet, étant donné l'importance du calcium dans les cellules, nous pouvions nous attendre à observer des différences au niveau de l'expression des protéines de la fraction membranaire de *T. elongatus*. Ces premiers résultats montrent qu'en échangeant le calcium par le strontium, il n'y a pas d'altération dans la composition des membranes aussi bien qualitativement que quantitativement. Ceci confirme et renforce l'hypothèse que c'est bien le simple remplacement du calcium par le strontium dans le cluster de manganèse qui est responsable de l'altération de l'activité du PSII observée précédemment dans le travail de Naoko Ishida. Toutefois il ne faut pas oublier que la coloration au nitrate d'argent ne permet pas de détecter toutes les protéines. Les protéines de la fraction soluble ont ensuite été analysées..

3.3.b. L'expression des protéines de la fraction soluble

Les protéines de la fraction soluble WT 43H de *T. elongatus* sont également analysées sur gels 2D. Les protéines sont séparées dans une première dimension en fonction de leur point isoélectrique par isoélectrofocalisation (IEF). Elles sont ensuite séparées dans une deuxième dimension en fonction de leur masse moléculaire par *SDS-PAGE*. Comme pour les protéines de la fraction membranaire, la technique a été mise au point et testée sur des échantillons provenant de la souche WT 43H de *T. elongatus* cultivée en présence de calcium ou de strontium.

Plusieurs spots supplémentaires sont observés pour les cultures en présence de strontium (Figure 3.8, flèches rouges). Cette première comparaison de gels 2D montre qu'il y a des différences d'expression entre les cellules cultivées en présence de calcium ou de strontium. Pour valider ces différences, un triplicat de cultures indépendantes devra être réalisé ainsi qu'un triplicat de gels 2D pour chaque culture. La répétition de ce type d'expérience est indispensable pour pouvoir utiliser un logiciel de visualisation après numérisation des gels et avoir des données statistiques pour valider ou non l'existence de différences d'expressions de protéines des fractions solubles entre les deux conditions. Ensuite une analyse par spectrométrie de masse permettra d'identifier les protéines dont l'expression varie. Toutes ces expériences complémentaires n'ont pas pu être réalisées au cours de ma thèse.

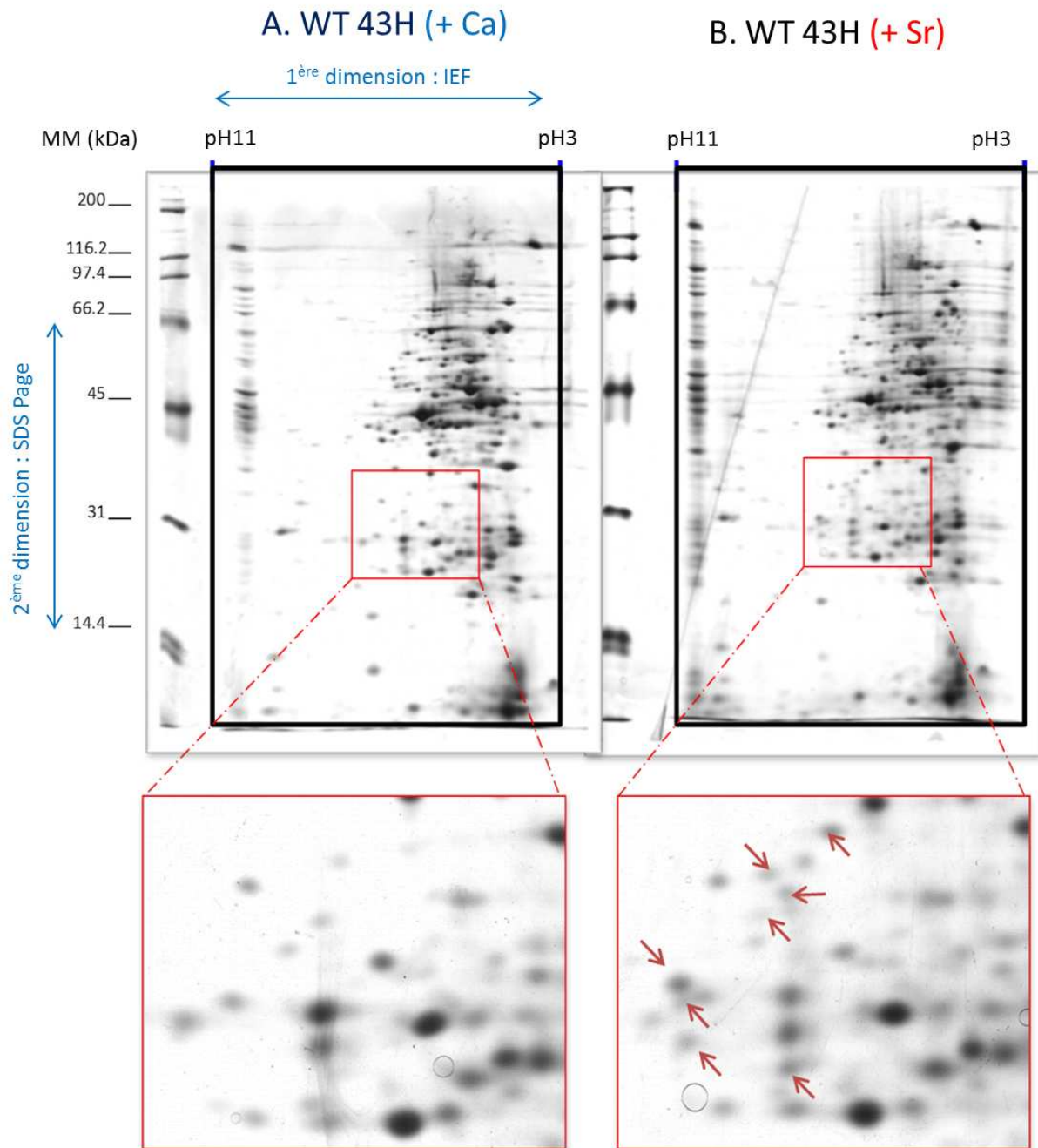


Figure 3.8 : Electrophorèse 2D des fractions solubles des protéines (300 µg) de la souche WT 43H de *T. elongatus*. Les cellules ont été cultivées (A) en présence de calcium ou (B) de strontium. Les flèches rouges indiquent quelques différences entre les 2 gels. Les gels ont été colorés au nitrate d'argent.

La suite de mon travail s'est focalisée sur l'étude des différents souches de variants de D1 toujours cultivées dans un milieu standard contenant des ions calcium.

3.4. Comparaison d'expression de protéines chez différents variants de D1 de *T. elongatus*

3.4.a. Carte 2D de référence

Les mêmes méthodes que celles développées pour l'étude de l'influence du calcium et du strontium sur la souche WT 43 H de *T. elongatus* ont été utilisées pour comparer les fractions solubles et membranaires des cellules des souches WT 43H et WT*2 dans un milieu standard contenant du calcium. Dans un premier temps, les gels d'électrophorèse de la fraction soluble ont été répétés deux fois sur les mêmes échantillons pour comparer les deux souches et sélectionner des spots de protéines présentant des variations de leur niveau d'expression. Plusieurs spots de protéines sur les gels 2D de fractions solubles ont été identifiés par spectrométrie de masse (Figure 3.9 et tableau 3.2). L'identification de ces protéines m'a permis de commencer à établir une carte de référence 2D. En effet, chaque protéine identifiée par spectrométrie de masse peut être repérée à l'aide de ses coordonnées, c'est-à-dire, sa masse moléculaire apparente et son pI apparent. Il sera donc possible de se référer à cette carte de référence 2D pour repérer des protéines dans les expériences ultérieures.

Il est cependant important de noter que la présence ou l'absence de ces spots pour les souches WT 43H et WT*2 est à prendre avec précaution. D'une part car les cultures n'ont pas été réalisées en triplicat et d'autre part car au cours des expériences, plusieurs paramètres étaient critiques pour une séparation reproductible des protéines ont été mis en évidence.

Tableau 3.2 : Identification par spectrométrie de masse des spots sélectionnés de la Figure 3.9. SOD pour superoxide dismutase.

n°spot	protéine identifiée par spectrométrie de masse
2	cystéine synthase
3	SOD + adénylate kinase
4	Protéines du phicobillisome
5	AhpC / TSA (alkyl hydroperoxide reductase / thiol specific antioxidant) family protein
6	protéine 33kDa
7	Phosphoadenosine phosphosulfate réductase
8	Nucléoside Diphosphate Kinase (sous forme de tétramère)

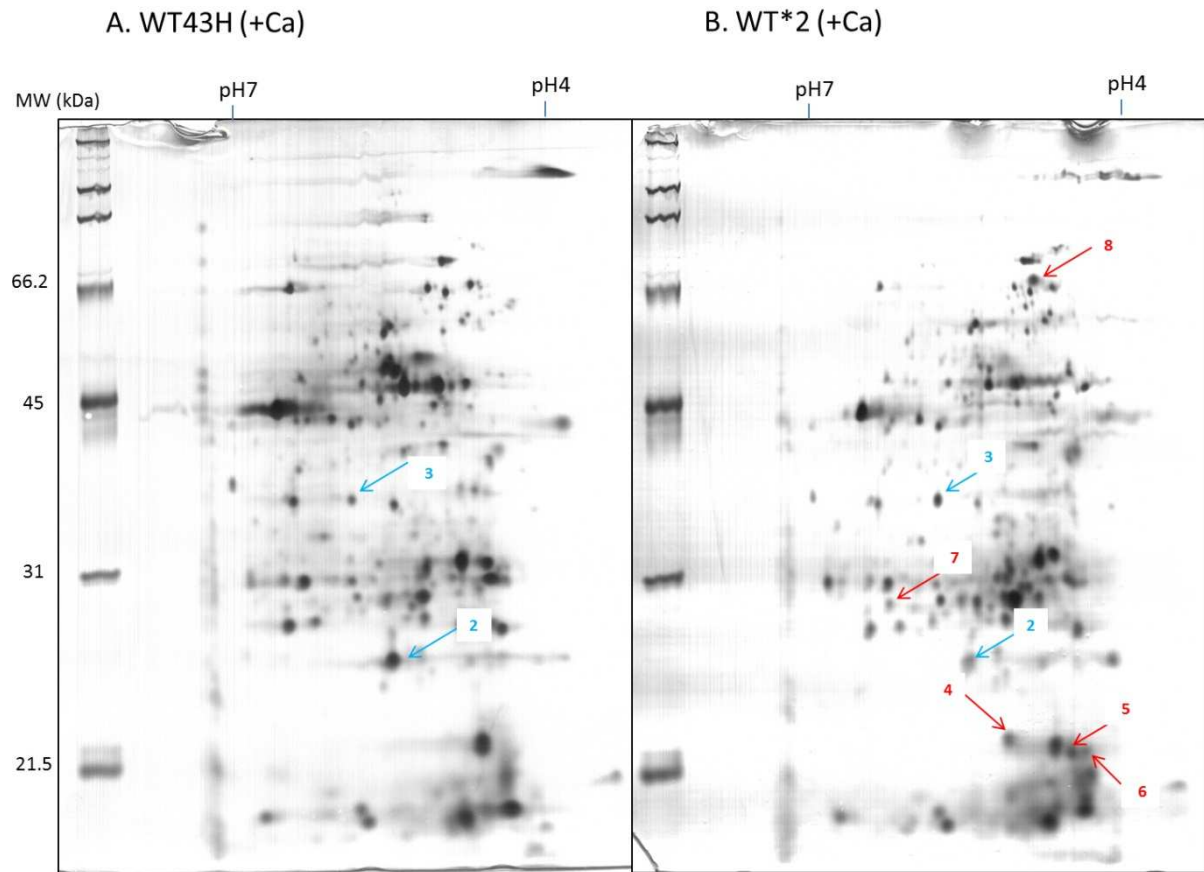


Figure 3.9 : Electrophorèse 2D de protéines (300 µg) des fractions solubles (A) des souches WT 43H et (B) WT*2 de *T. elongatus*. Les protéines présentes dans les souches WT 43 H et WT*2 et dont l'intensité varie sont indiquées par une flèche bleue (spots n°2 et 3) et celles uniquement trouvées dans la souche WT*2 sont indiquées par une flèche rouge (spots n°4 à 8). Le gel est coloré au nitrate d'argent.

3.4.b. Points critiques pour la reproductibilité des gels 2D

La reproductibilité est un des points cruciaux de la technique de gels d'électrophorèse 2D. L'étude des différences d'expression protéique de la souche WT 43H dans différentes conditions de culture (avec calcium ou avec strontium) et des différents variants de D1 de *T. elongatus* a été fortement ralentie à cause du manque de reproductibilité. Les détails des expériences sont indiqués dans le chapitre matériels et méthodes (2.7.d). Sur 90 gels 2D réalisés au cours de ma thèse, plus de deux tiers des gels n'ont pas pu être exploités. Plusieurs expériences ont permis d'obtenir des gels d'électrophorèse 2D reproductibles (Figure 3.10).

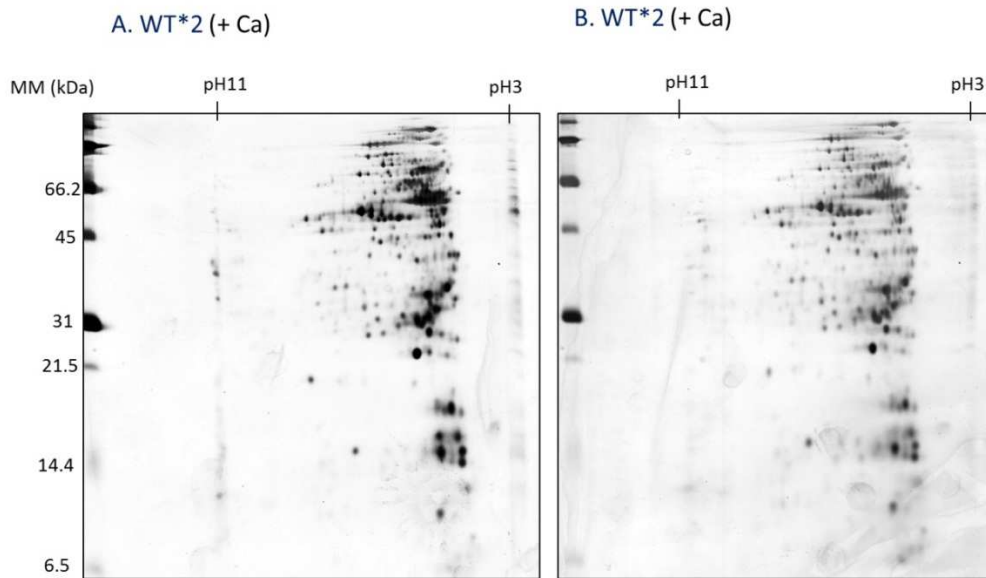


Figure 3.10 : Electrophorèse 2D de protéines solubles (300 μ g) de la souche WT*2 de *T. elongatus*. Les mêmes échantillons sont déposés sur les gels A et B.

Un autre paramètre pouvant améliorer la séparation est la longueur et la nature du gradient de pH (linéaire ou non linéaire) de la bandelette d'IEF en 1^{ère} dimension (Figure 3.11) .

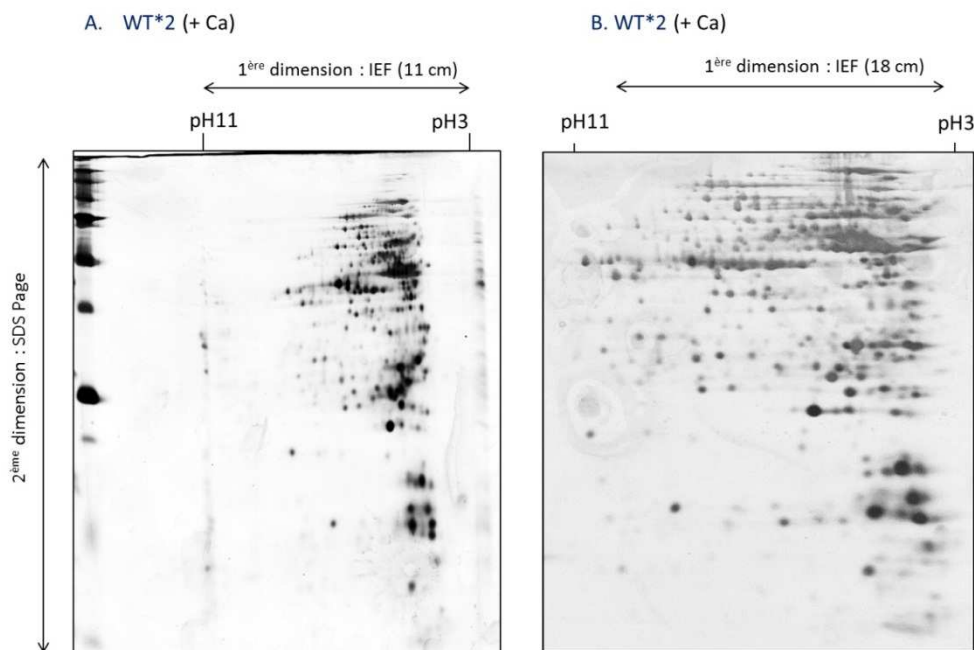


Figure 3.11 : Electrophorèse 2D des protéines de la fraction soluble de la souche WT*2 de *T. elongatus*. Séparation des protéines dans la 1^{ère} dimension sur une bandelette de 11 cm avec un gradient de pH linéaire (A) et de 18 cm avec un gradient de pH non linéaire (B).

En utilisant les bandelettes de 18 cm avec un gradient de pH non linéaire, les spots de protéines sont mieux répartis sur l'ensemble du gel. Ces bandelettes sont donc plus appropriées pour séparer dans une première dimension par IEF les protéines de la fraction soluble de *T. elongatus*. Après de multiples essais, les bonnes conditions expérimentales permettant d'obtenir des gels d'électrophorèse 2D reproductibles sur la fraction soluble des protéines de *T. elongatus* ont été identifiées. Grâce à ces outils de protéomique mis en place, il est maintenant possible d'étudier si certaines protéines de la fraction soluble sont sur-, sous- ou non exprimées chez les différents variants de D1.

3.4.c. Comparaison des fractions solubles des variants de D1

Les souches WT 43H, WT*1, WT*2 et WT*3 ont été cultivées dans les conditions standards dans un milieu contenant du calcium puis récoltées en phase exponentielle. A l'issue du fractionnement cellulaire, la fraction soluble a été analysée par électrophorèse 2D. Aucune différence importante n'est observée entre l'intensité des spots de protéines de la fraction soluble des 4 différentes souches sur les gels d'électrophorèse 2D (Figure 3.12). Nous nous attendions cependant à observer au moins une différence : la protéine Tll0287 découverte au laboratoire (Boussac, Koyama et al. 2013) qui est exprimée uniquement dans la souche WT*2 et dont l'étude a fait partie de mon travail de thèse (voir le chapitre 4). Nous savions déjà que la protéine Tll0287 se trouve sous deux formes : soit faisant partie des protéines extrinsèques du photosystème II, soit dans la fraction des protéines solubles (Boussac, 2013). Seule la forme soluble de Tll0287 a été ici étudiée. En comparant les gels d'électrophorèse 2D des différentes souches (WT 43H, WT*1, WT*2, WT*3) aucune trace de Tll0287 (masse moléculaire = 19 kDa, pI = 8.82) pour la souche WT*2 n'est visible sur le gel (3.12C) à la position attendue.

3.5. Mais où est donc passée la protéine Tll0287 ?

3.5.a. A la recherche de Tll0287 en 1^{ère} dimension

Dans un premier temps, Tll0287 a été cherché dans les conditions d'électrophorèse les plus simples, c'est-à-dire par *SDS-PAGE* à une dimension avec deux types de coloration

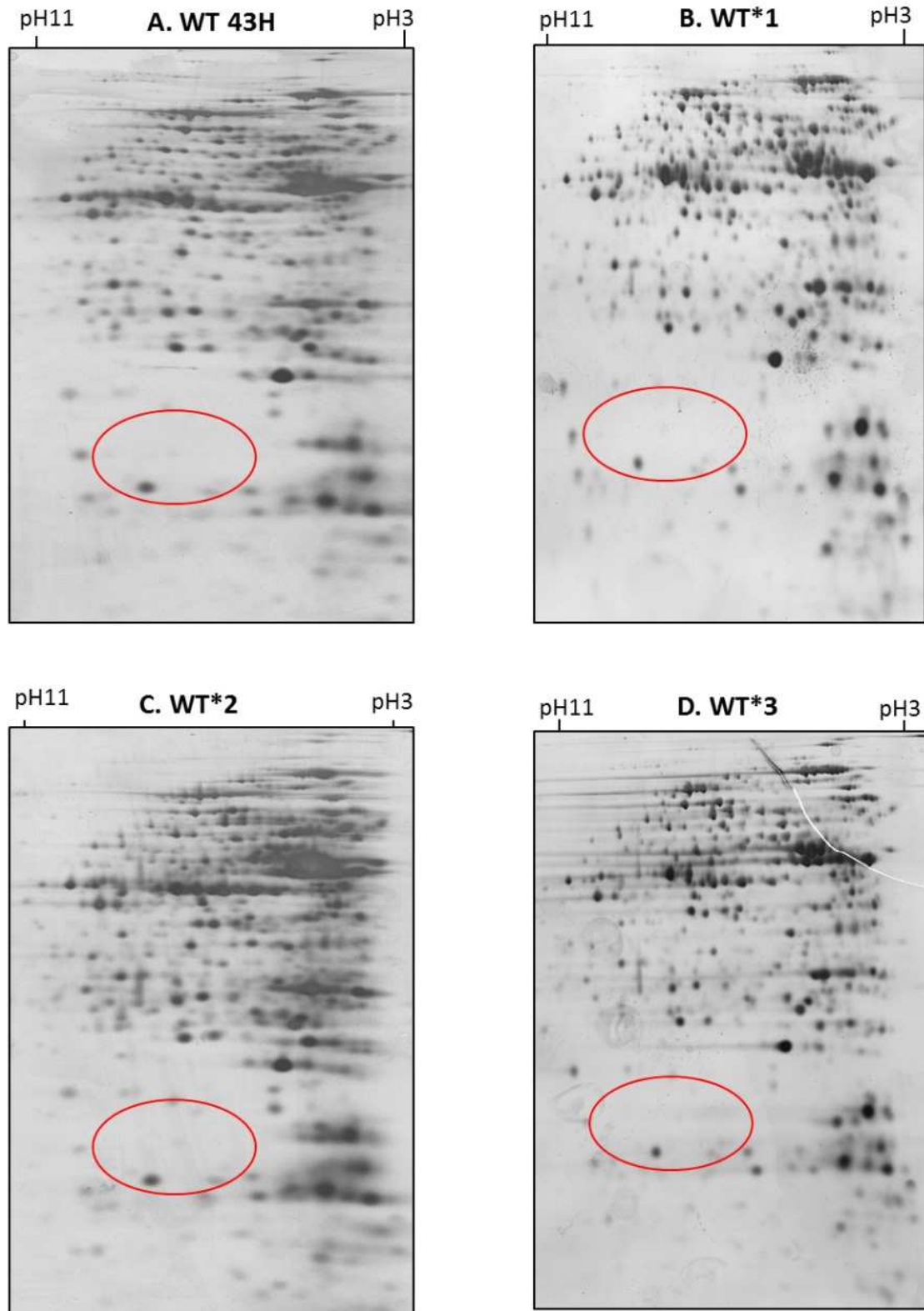


Figure 3.12 : Electrophorèse 2D de protéines (300 µg) de la fraction soluble de 4 souches de *T. elongatus*: WT 43H (A), WT*1 (B), WT*2 (C), WT*3 (D). La zone entourée en rouge est celle où la protéine TII0287 est attendue dans la souche WT*2. Les gels sont colorés au nitrate d'argent.

spécifiques des protéines à hèmes. Le premier type de coloration utilise le TMBZ (voir paragra paragraphe 2.4.a. du chapitre matériels et méthodes) (Figure 3.13). Dans cette expérience, Tll0287 et le cytochrome c_{550} sont détectés dans la fraction soluble de la souche WT*2 (Figure 3.13B, piste 1) à leur masses moléculaires apparentes attendues (respectivement 19 kDa et 15 kDa).

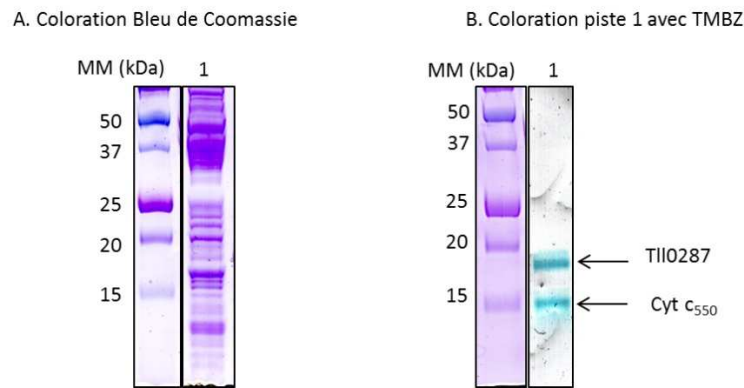


Figure 3.13 : *SDS-PAGE* (15%, urée 6M) en 1 dimension. Piste 1 (A) : protéines (250 μ g) de la fraction soluble de la souche WT*2 de *T. elongatus* colorées au bleu de Coomassie (A) et avec le TMBZ (B).

Le deuxième type de coloration utilisé met en jeu l'activité peroxydase des hèmes et l'oxydation du luminol, c'est une coloration directe par ECL (Vargas, McEwan et al. 1993) (Voir aussi le paragraphe 2.4.a. du chapitre matériels et méthodes) (Figure 3.14). Dans l'expérience suivante, des échantillons de protéines des fractions solubles des 4 variants de D1 ont été déposés sur *SDS-PAGE* puis transférés sur membrane.

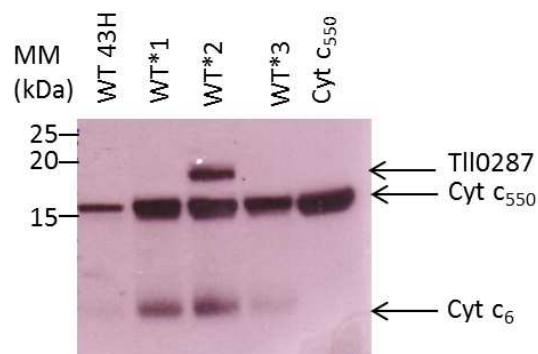


Figure 3.14 : Protéines de la fraction soluble des différentes souches de variants de D1 après séparation sur *SDS-PAGE* puis transfert sur membrane. Les hèmes sont révélés avec une coloration directe par ECL. Le Cyt c_{550} partiellement purifié est déposé comme témoin positif (piste de droite). Quantité de protéines déposées : 30 μ g (pour WT 43H) , 62.5 μ g (pour WT*1 et WT*2), 45 μ g (pour WT*3).

Comme le montre la figure 3.14, le cytochrome c_{550} (15 kDa) est comme attendu présent chez toutes les souches des variants de D1 (WT 43H, WT*1, WT*2 et WT*3). Le cytochrome c_6 (9.1 kDa) est aussi détecté pour les 4 variants mais la quantité de protéines déposée sur gel ne permet de le voir que sous forme de trace pour les souches WT 43H et WT*3. Une protéine supplémentaire est détectée uniquement pour le mutant WT*2 avec une mobilité apparente identique à celle observée avec la coloration en TMBZ (Figure 3.13B puits 1), elle correspond à Tll0287 (19 kDa) avec son hème. Ces résultats de gels en conditions dénaturantes en une dimension montre que Tll0287 est bien présent comme attendu dans les protéines de la fraction soluble de WT*2 de *T. elongatus*. Tll0287 a été détecté par les deux types de colorations spécifiques des protéines à hème (Figures 3.13 et 3.14) ainsi qu'après coloration au nitrate d'argent (Figure 3.15). Pourtant lors de la comparaison des protéines des fractions solubles des différents mutants de D1 par électrophorèse 2D et coloration au nitrate d'argent, aucune protéine n'a été observée à la masse moléculaire et au pI attendu de Tll0287 dans la souche WT*2. Etant à ce stade convaincue que cette absence de détection n'est pas liée à un problème de coloration, il a été possible d'émettre deux hypothèses : soit Tll0287 est en trop faible quantité sur le gel 2D, soit Tll0287 ne migre pas en IEF à la position attendue.

3.5.b. Un outil de recherche plus spécifique de Tll0287 : un anticorps polyclonal

Afin de comprendre pourquoi Tll0287 n'est pas détectée sur gel d'électrophorèse 2D, le développement d'un outil de détection plus spécifique s'est avéré nécessaire. Nous avons fait produire pour le laboratoire un anticorps dirigé contre la protéine Tll0287. La méthode d'immunisation et d'obtention des anticorps est décrite dans le paragraphe 2.6.a du chapitre matériels et méthodes. Après chaque purification de la protéine Tll0287 utilisée pour l'immunisation, sa pureté a été vérifiée sur gel *SDS-PAGE* coloré au nitrate d'argent (Figure 3.15) pour être sûre de ne pas avoir de protéines contaminantes pouvant compromettre l'obtention d'un anticorps spécifique. La fraction de Tll0287 purifiée est suffisamment pure pour qu'aucune autre protéine ne soit détectée sur un gel coloré au nitrate d'argent (piste 2 du *SDS-PAGE* de la figure 3.15). Le titre en anticorps est estimé avant immunisation (sérum s0) et après chaque rappel (ici s1 et s2) (Figure 3.16). Le principe du test de dosage consiste à révéler spécifiquement la réaction dirigée contre l'antigène Tll0287 (voir paragraphe 2.6.b du chapitre matériels et méthodes).

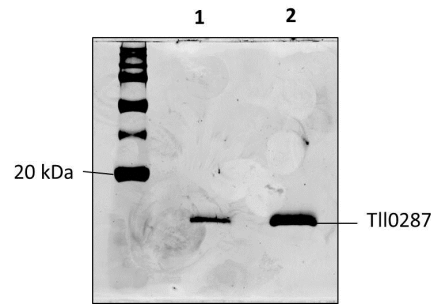


Figure 3.15 : *SDS-PAGE* (15% urée 6M) coloré au nitrate d'argent sur deux échantillons de Tll0287 purifié (1.5 µg dans la piste 1 et 3 µg dans la piste2).

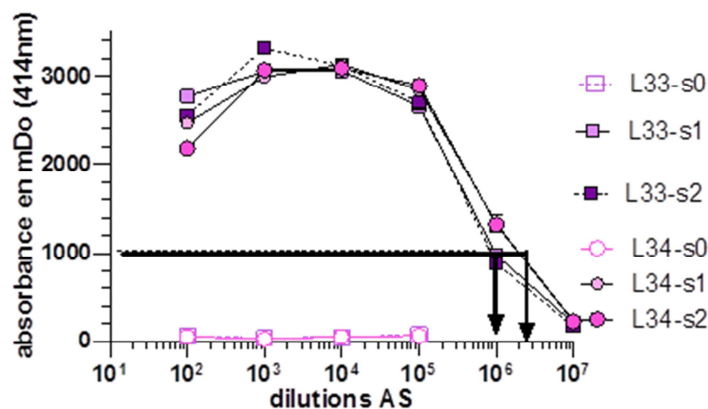


Figure 3.16 : Titrage des sérums des deux lapins (L33 et L34). Trois saignées ont été effectuées : avant la première injection (s0), 7 jours après le premier rappel (s1) et 7 jours après le deuxième rappel (s2).

Ce test montre qu'il y a bien une réponse spécifique contre la protéine Tll0287 purifié dès 7 jours après le premier rappel (s1). Le titre du sérum est défini ici par l'inverse de la dilution du sérum nécessaire pour avoir une $D_0 = 1$. Les sérums s2 des lapins (L33 et L34) ont des titres approchant respectivement 1/10 000 et 1/40 000. En parallèle, la réponse du sérum s2 du lapin L33 a été testé en *Western blot* (Figure 3.17). Le *Western blot* (Figure 3.17) montre que Tll0287 est détecté uniquement dans la fraction soluble des protéines de la souche WT*2 par les anticorps polyclonaux du sérum (s2). Des résultats similaires ont été obtenus avec le sérum s2 du lapin L34. Les anticorps polyclonaux produits reconnaissent donc très spécifiquement Tll0287 en *Western blot*.

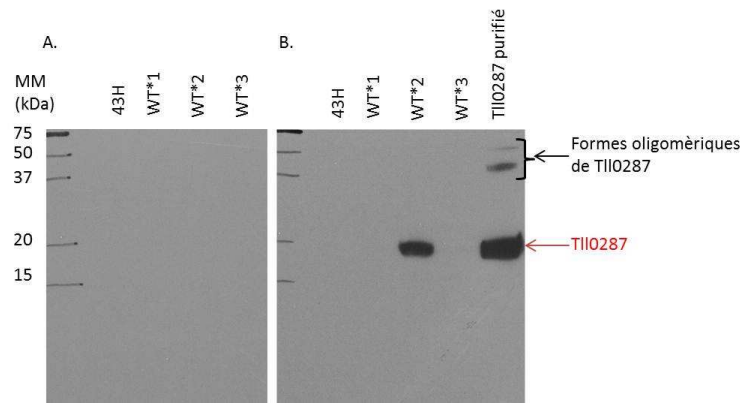


Figure 3.17 : Western blot obtenu avec les sérums issus de la première saignée s0 (A) et ceux issus de la 3^{ème} saignée s2 (B) du lapin L33 dilués au 1/10 000. 250 µg de protéines des fractions solubles des différentes souches de mutants de D1 ont été déposés dans chaque puits. Tll0287 purifié est utilisé comme témoin positif (puits à droite sur la Figure B).

3.5.c. A la recherche de Tll0287 en 2^{ème} dimension

Un duplicat de gel 2D (IEF suivi d'un *SDS-PAGE*) sur les protéines de la fraction soluble de WT*2 a été réalisé. Le premier gel 2D a été coloré au nitrate d'argent (Figure 3.18A) et le deuxième gel 2D a été transféré sur une membrane de PVDF puis révélé avec le sérum s2 du lapin L33 contenant les anticorps anti Tll0287 (Figure 3.18B). Ce gel d'électrophorèse a été appelé gel d'électrophorèse en 3 dimensions (gel 3D). Sur ce gel 3D, 4 spots de protéines sont détectés avec les anticorps polyclonaux anti Tll0287, dans la zone où Tll0287 est attendu (masse moléculaire et pI). Par contre, sur le gel 2D (Figure 3.18A) coloré au nitrate d'argent, aucune protéine n'est détectée dans la même zone entourée en rouge. Tll0287 n'a pas été révélé avec la coloration au nitrate d'argent (Figure 3.18A) mais a été révélé grâce aux anticorps (Figure 3.18B). Cela suggère que la quantité de Tll0287 transférée dans la 2^{ème} dimension n'est pas suffisante pour être détectée avec la coloration au nitrate d'argent. Quatre spots correspondant à Tll0287, mais à des pI différents ont été révélés grâce aux anticorps. C'est la première fois que différentes formes de Tll0287 ont pu être observées. La question maintenant est de savoir à quelle forme de Tll0287 correspondent ces spots observés avec différents pI. Afin de savoir si ces différentes formes de Tll0287 comportent un hème, un autre gel d'électrophorèse 3D avec une détection des protéines à hème a été réalisé (Figure 3.19).

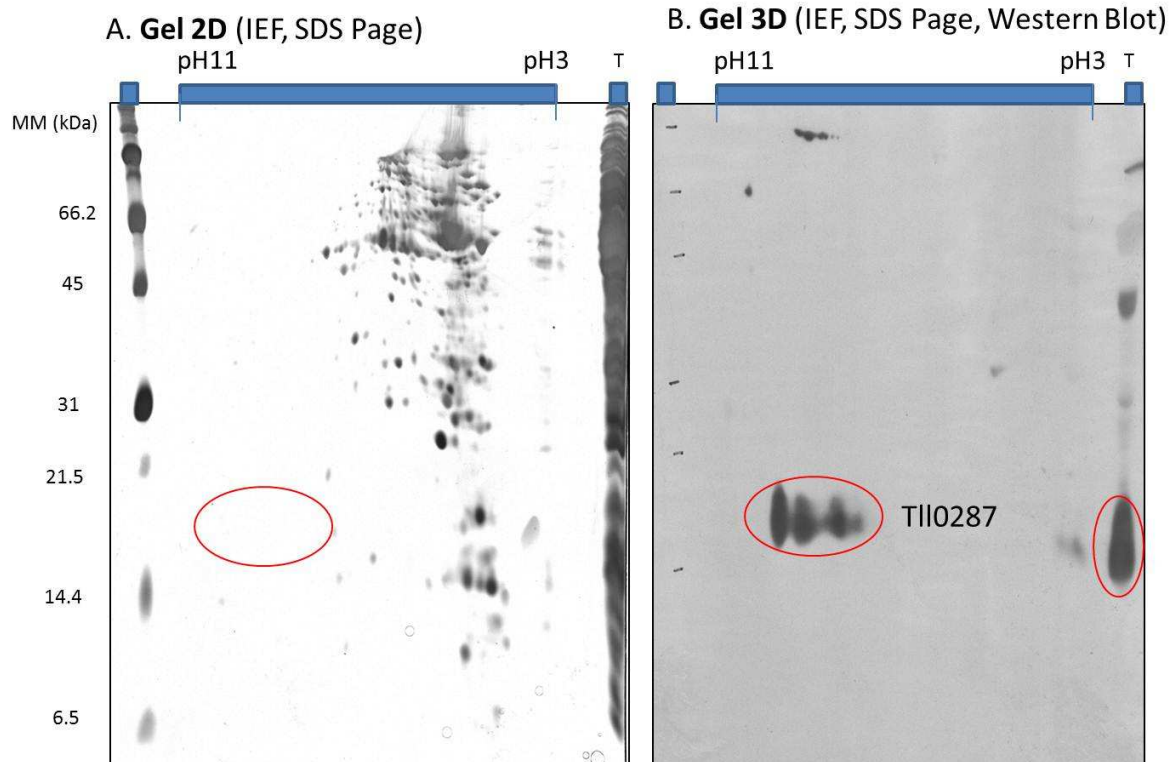


Figure 3.18 : (A) Electrophorèse 2D de protéines (300 µg) de la fraction soluble de WT*2 avec une coloration au nitrate d'argent (IEF suivi de *SDS-PAGE*). (B) Electrophorèse 3D (IEF suivi de *SDS-PAGE* puis d'un Western Blot) avec une détection avec les anticorps. Sur le côté droit de chaque gel, des protéines (300 µg) de la fraction soluble de WT*2 sont déposés comme témoin T. Ce témoin est séparé uniquement par *SDS-PAGE*. La zone entourée en rouge est celle (A) où TII0287 est attendu et celle (B) où TII0287 est observé.

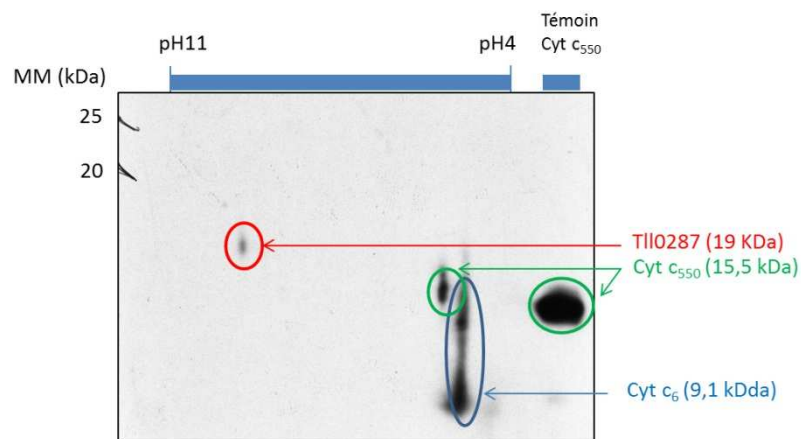


Figure 3.19 : Electrophorèse 3D (IEF puis *SDS-PAGE* 12.5 % suivi d'un transfert sur membrane) de protéines (1 mg) de la fraction soluble de la souche WT*2 de *T. elongatus*. Les protéines à hèmes sont révélées avec une coloration directe par ECL. Le Cyt c₅₅₀ purifié est déposé comme témoin positif (piste de droite) sur le gel *SDS-PAGE* en 2^{ème} dimension.

Comme attendu, les Cyt c_6 (9.1 kDa, en bleu) et Cyt c_{550} (15,5 kDa, en vert) sont détectés par la coloration directe ECL sur gel d'électrophorèse 3D. Il est possible de distinguer deux spots pour le Cyt c_6 , ce résultat n'était pas attendu et est difficilement interprétable. Il se pourrait que le Cyt c_6 soit sous formes de monomères et de dimères. Une seule forme de Tll0287 contenant une hème est visible dans cette expérience. La fraction soluble de la souche WT*2 a été analysée avec la même technique de coloration directe par ECL des hèmes après transfert sur membrane, dans deux systèmes différents : sur gel d'électrophorèse en une dimension (1D) (Figure 3.14) et sur gel d'électrophorèse bidimensionnelle (2D) (Figure 3.19). Les quantités de protéines déposées sont respectivement 62.5 μ g et 1 mg. La quantité relative de Cyt c_6 par rapport aux 2 autres hémoprotéines (Tll0287 et Cyt c_{550}) semble plus importante dans la deuxième méthode. Par contre, la quantité de Tll0287 est moins importante dans la 2^{ème} méthode, ce qui laisse penser qu'une partie de Tll0287 n'a pas été bien transférée de la 1^{ère} vers la 2^{ème} dimension (de la bandelette après IEF vers le gel d'électrophorèse) ou de la 2^{ème} vers la 3^{ème} dimension (du gel 2D vers la membrane). Ceci pourrait expliquer que Tll0287 ne soit pas vu sur gel 2D coloré au nitrate d'argent (Figure 3.18A). Il semblerait donc que le transfert de la 1^{ère} vers la 2^{ème} dimension soit limitant. Il se pourrait que Tll0287 qui a un pI très élevé ne puisse pas être bien transféré de la bandelette d'IEF vers la 2^{ème} dimension. En ce qui concerne les 4 spots trouvés sur la figure, il semble qu'une seule de ses formes contiennent un hème (Figure 3.18B). Ces 4 spots pouvaient-ils correspondre aux différentes formes tronquées de Tll0287 cités dans le papier de Boussac et al. ? (Boussac, Koyama et al. 2013). Les différents pI théoriques de ces 4 formes tronquées sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 3.2 : pI théoriques des différentes formes tronquées de Tll0287.

1 ^{ers} acides aminés	pI théorique
ASLWI	8,84
GSPAP	8,83
APLAS	8,84
SANPE	8,82

Les pI calculés de ces formes sont trop peu différents pour que ces formes tronquées correspondent aux 4 spots bien séparés, vus sur gel d'électrophorèse 2D (Figure 3.18.B). Cette possibilité ne peut pas être exclue complètement car il s'agit de pI calculés théoriques et non déterminés expérimentalement.

3.6. Conclusions

L'étude des différents variants de D1 a permis de mettre en évidence la protéine Tll0287 exprimée uniquement chez le variant WT*2. La détection de Tll0287 a été réalisée grâce à une coloration spécifique des hèmes (Figure 3.14) et à l'utilisation d'anticorps (Figures 3.17 et 3.18B). Il serait intéressant d'utiliser une technique plus sensible que celle utilisée pour les gels d'électrophorèse 2D comme la 2D *difference gel electrophoresis* (DIGE) (Casati, Zhang et al. 2005; Tabuse, Nabetani et al. 2005; Granlund, Hall et al. 2009). Cette technique est basée sur la quantification des protéines couplées à des molécules fluorescentes et limite les problèmes de reproductibilité des gels 2D classiques et pourrait permettre de voir d'autres différences entre les différents variants de D1.

4. Caractérisation de l'hémoprotéine Tll0287 de *T. elongatus*

4.1. Introduction	114
4.2. Spectres d'absorption UV-visible de Tll0287	116
4.3. Spectres de résonance Raman (RR)	119
a. Les vibrations moléculaires	120
b. Les excitations des spectres RR des cytochromes de type c	121
c. Attribution des modes de résonance Raman de l'hème	122
d. Spectres de RR de Tll0287 oxydé et réduit à pH 7,6	123
e. Sensibilité au pH des spectres RR de Tll0287 oxydé et réduit	129
4.4. Titrages redox de Tll0287	142
4.5. Structure cristallographique de Tll0287	144
4.6. Hypothèse sur la fonction de Tll0287	146
4.7. Discussions	149

4.1. Introduction

Tll0287 est une protéine de la cyanobactérie *T. elongatus* qui a été découverte dans la souche WT*2 au laboratoire (Boussac, Koyama et al. 2013). Comme décrit dans l'introduction, la protéine D1 est codée par 3 gènes *psbA* différents dans la souche sauvage de la cyanobactérie *T. elongatus*. Nous disposons au laboratoire de la souche WT*2, une souche dans laquelle seul le gène *psbA2* est présent. Le gène *psbA2* est transcrit dans la souche sauvage uniquement dans des conditions de microaérobie (Sicora, Ho et al. 2009). Tll0287 est exprimée quand la souche WT*2 est cultivée dans nos conditions de laboratoire classique, c'est-à-dire en présence d'air contenant 20 % d'oxygène et enrichi en CO₂. Dans de précédents travaux, il a été montré que Tll0287 avait été repérée dans la fraction soluble de WT*2 par sa signature en RPE : un signal d'hémoprotéine à fer, oxydée, à bas spin. Le séquençage N-ter de cette protéine a permis d'identifier cette nouvelle protéine comme étant le produit du gène *tll0287*. Jusqu'alors, le produit du gène *tll0287* était référencé dans la cyanobase comme hypothétique avec une fonction inconnue. La protéine n'avait jamais été isolée, ni observée auparavant. Un alignement de séquence a montré que *tll0287* était présent dans d'autres cyanobactéries (Boussac, Koyama et al. 2013). Les auteurs ont montré que Tll0287 était associée au PSII et qu'elle se trouvait aussi sous forme soluble. Tll0287 est une hémoprotéine qui a une signature de cytochrome de type c. En effet, sa séquence contient le motif caractéristique CXXCH (Figure 4.1).

MVRIFLMALLMASLWIQGSP~~APLA~~SANPEELGKVVTAIEQLDQMRIGLASTLEGGTSEPTLDTFKAVCAPVGKQAK
EIAAANGWQVRQVALKYRNPNHAPRTALDVQALNQFDNNHHLQAFWQTDKEGVHYFRRIDVQAS~~CLACH~~GAKN
RRPAFIQEKYPSDRAYGFRVGDRLRGMYAVTIPQIQALQTSP

Figure 4.1 : Séquence en acides aminés de Tll0287 de *T. elongatus* avec le site de clivage prédit du peptide signal situé après la séquence APLA (en jaune), le motif CXXCH (en bleu).

Tll0287 a été purifié à partir de la fraction soluble (voir paragraphe 2.5.d du chapitre matériels et méthodes). Les différentes étapes de purification sont résumées dans la figure 4.2. La figure 4.3 montre les fractions protéiques des deux dernières étapes de purification de Tll0287 séparées sur *SDS-PAGE* : dans le puits 1, après la chromatographie échangeuse d'anions et dans le puits 2, après la chromatographie échangeuse de cations. La présence d'une bande unique sur *SDS-PAGE* coloré au nitrate d'argent (puits 2) indique que Tll0287 est pure.

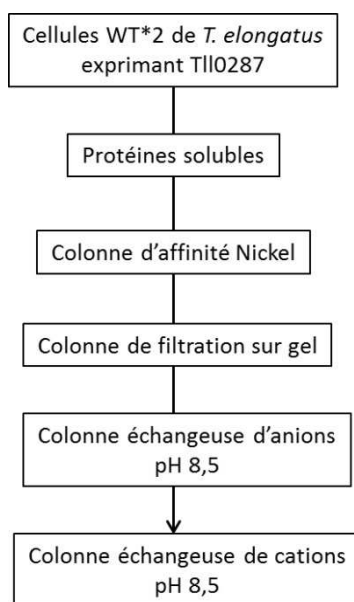


Figure 4.2 : Etapes de purification de Tll0287.

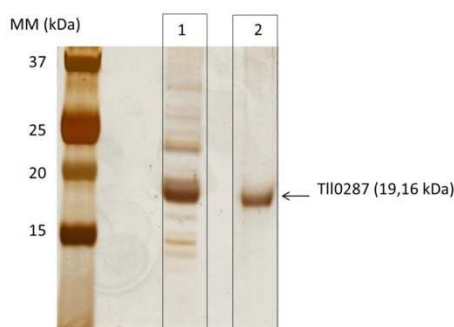


Figure 4.3 : *SDS-PAGE* coloré au nitrate d'argent avec les fractions contenant Tll0287 obtenues (puits 1) après l'étape de purification sur colonne de chromatographie échangeuse d'anions et (puits 2) après l'étape de purification sur colonne de chromatographie échangeuse de cations .

Le spectre d'absorption électronique de Tll0287 oxydé (Figure 4.4) présente un pic d'absorbance à 280 nm de 0.2 et à 415 nm de 0,5. Le rapport entre l'absorbance à 415 nm et celle à 280 nm supérieur à 2 confirme une bonne pureté de l'échantillon. Un des objectifs de ma thèse a été de caractériser Tll0287. L'oxydoréduction de Tll0287 par spectroscopie d'absorption électronique a été étudié. Avec le Dr. Alain Desbois les changements de structure de l'hème oxydé et réduit de Tll0287 à différents pH par spectroscopie de résonance Raman ont été analysés. J'ai ensuite déterminé par spectro-électrochimie avec le Dr. Frauke Baymann certaines propriétés d'oxydoréduction de Tll0287. Pour émettre des hypothèses quant à sa fonction, j'ai modélisé la structure de Tll0287 afin de trouver des protéines ayant

un repliement similaire. La structure cristallographique de Tll0287 a également été résolue en 2014 en collaboration avec l'équipe du Dr. J. R. Shen au Japon.

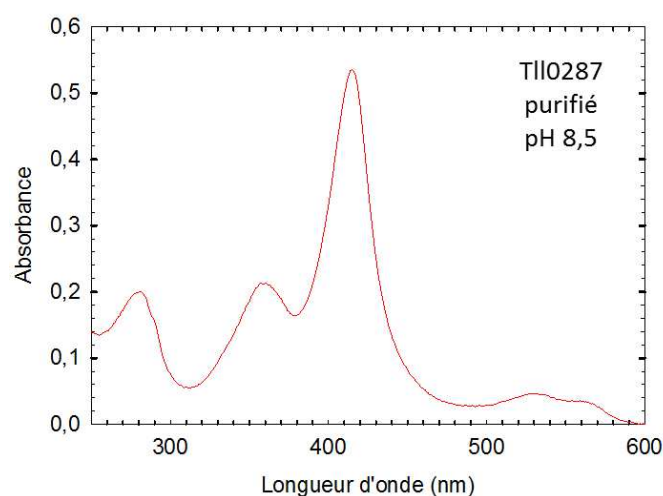


Figure 4.4 : Spectre d'absorption électronique de Tll0287 oxydé après purification.

4.2. Spectres d'absorption UV-visible de Tll0287

Comme rien n'était connu concernant le potentiel redox de Tll0287, j'ai dans un premier temps regardé si Tll0287 était réductible par un réducteur fort comme le dithionite de sodium à différents pH. Le spectre de Tll0287 a été enregistré dans sa forme oxydée puis réduite par le dithionite. Le spectre d'absorption électronique de Tll0287 oxydé est relativement constant de pH 5,0 à 7,6 (Figures 4.5 à 4.8 et Tableau 4.1) avec des bandes observées à 359-360 nm (δ), 415 nm (Soret ou γ), 528-530 nm (β) et 559 nm (α). A pH 10, nous observons de légers déplacements vers le rouge des bandes α , β et γ (561, 531 et 416 nm). Ces spectres sont typique d'un ferrihème hexacoordonné (6c) de bas spin (LS).

Des modifications spectrales plus profondes sont détectées pour la forme réduite. En milieu acide (pH 5-6), une espèce majoritaire 6cLS présente des bandes α , β et γ à respectivement 552-553, 524, et 420-421 nm. Des contributions d'une espèce mineure pentacoordonné (5c) de haut spin (HS) sont détectées à 541-543, 532, et 438-439 nm. A pH 7,6, une espèce majoritaire 6cLS présente des positions de bandes α , β et γ légèrement déplacées par rapport à celles détectées en milieu acide (554, 528, et 419 nm). Un épaulement de la bande principale à 444 nm signe la présence d'une espèce 5cHS. L'origine de la contribution mineures à 410 nm n'est pas claire. A pH 10, le spectre d'absorption est fortement modifié avec des bandes

principales à 558, 533 et 437 nm, espèce 5cHS, et des contributions mineures 6cLS à 541 et 416 nm.

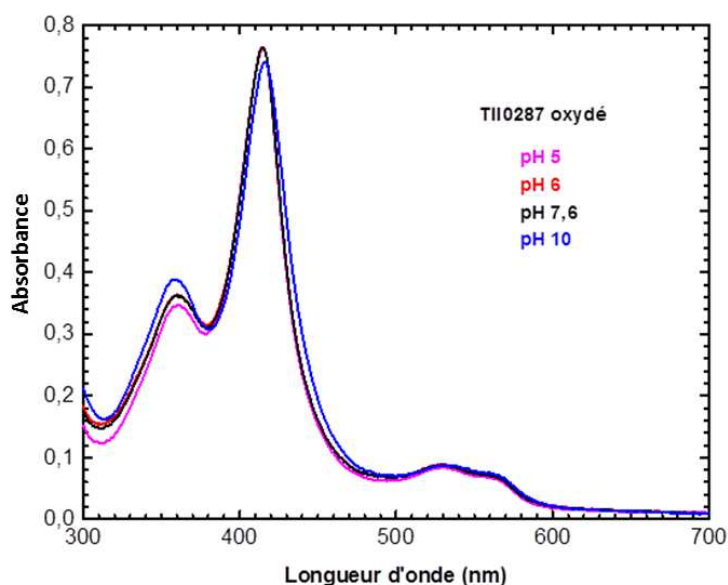


Figure 4.5 : Effet du pH sur le spectre d'absorption électronique de Tll0287 oxydé.

Les spectres de Tll0287 oxydé à différents pH varient très peu. Par contre, le pH a un effet important sur le spectre de la forme réduite de Tll0287 (Figure 4.8). Après un ajout de dithionite, le spectre évolue dans le temps (figure 4.6). Après 160 minutes d'incubation à pH 7,6 le spectre est complètement réduit. En ajoutant davantage de dithionite dans l'échantillon, le spectre n'évolue plus. Avec la quantité ajoutée initialement, le processus de réduction par le dithionite est lent. Les figures 4.6, 4.7 et 4.8 présentent l'évolution des spectres d'absorption électronique UV-Visible de Tll0287 en fonction du temps à différents pH. Aux différents pH, les spectres réduits sont très différents (Tableau 4.1). Ils présentent tous des épaulements (Figure 4.8) au niveau de la bande de Soret. Ces épaulements indiquent que la bande de Soret est composée de deux formes de spectres. Les spectres réduits obtenus à pH 5 et pH 6 sont eux quasi identiques (non montré).

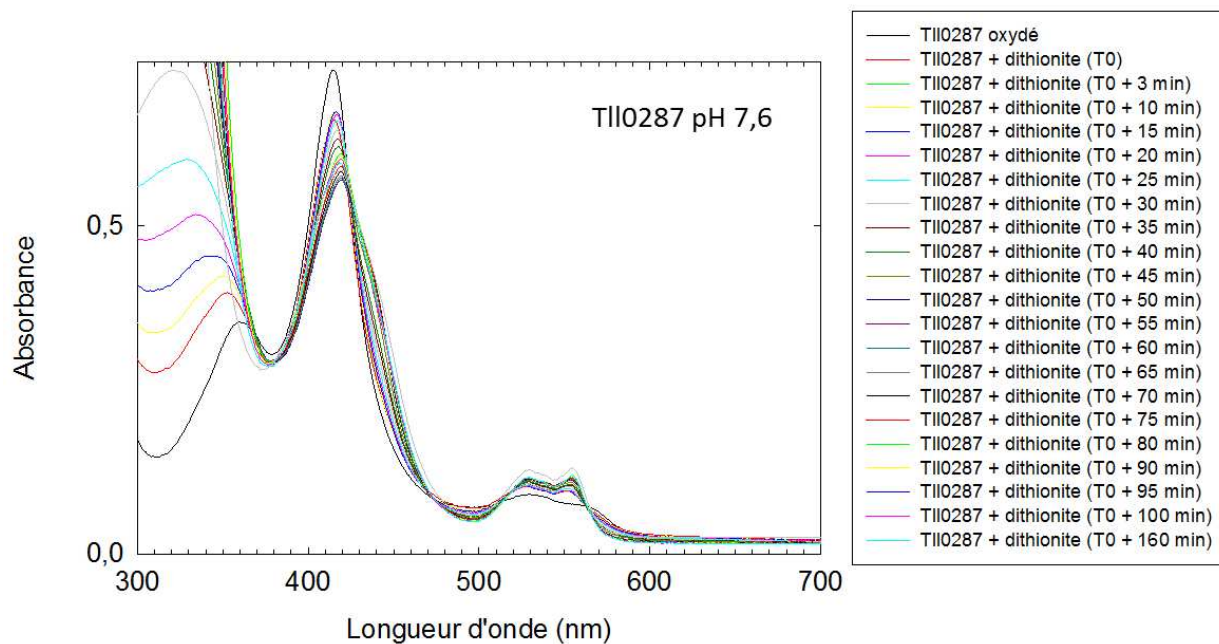


Figure 4.6 : Spectres d'absorption électroniques de TII0287 après ajout de dithionite (50 fois plus concentré que TII0287) à pH 7,6.

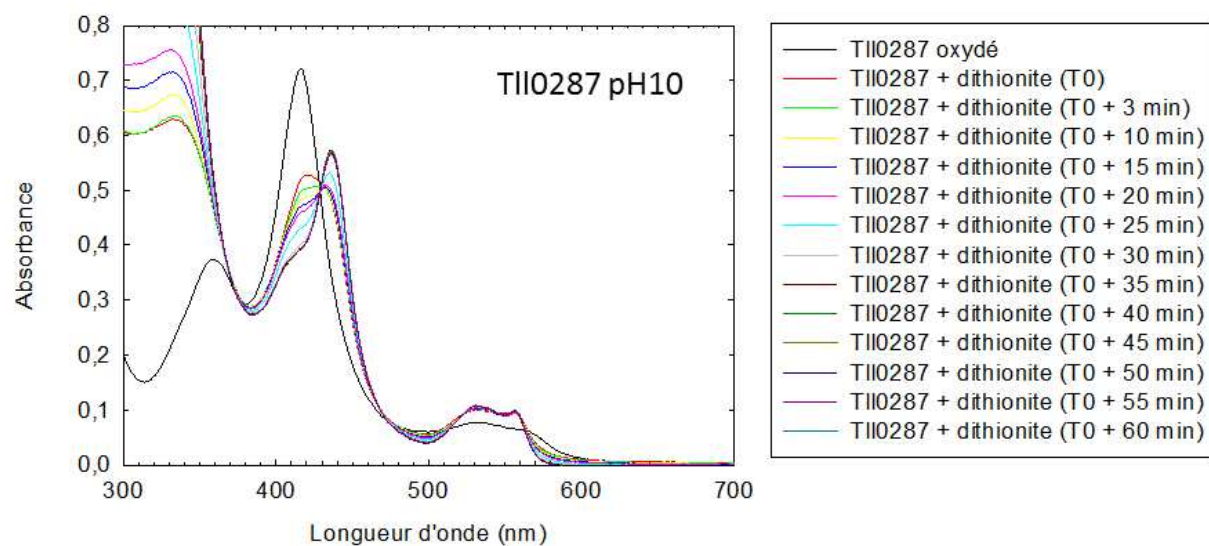


Figure 4.7 : Spectres d'absorption électroniques de TII0287 après ajout de dithionite (50 fois plus concentré que TII0287) à pH 10.

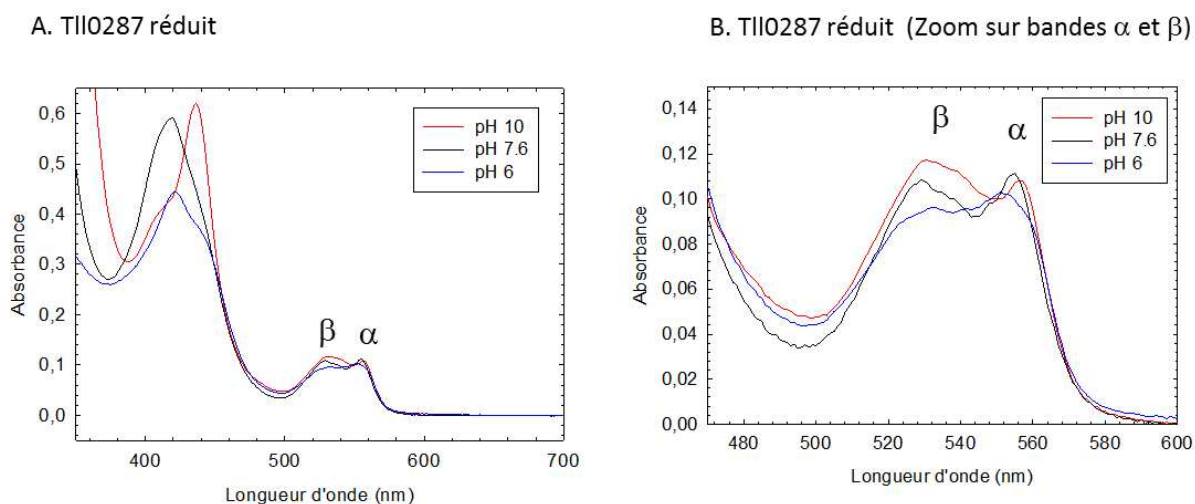


Figure 4.8 : Spectres d'absorption UV-visible de TII0287 réduit après ajout de dithionite à différents pH.

Tableau 4.1 : Absorption maxima (nm) de TII0287 oxydé (en rouge) et réduit (en bleu) à pH 5, 6, 7.6 et 10. Ep : épaulement, f : faible, Nc : nombre de coordinats du Fer, LS : Low spin et HS : High spin.

TII0287	δ	Soret (Υ)	β	α	Nc-spin
pH 5.0					
Fe^{3+}	360	415	530	559	6cLS
Fe^{2+}		421 439 (ep)	524 532 (f)	553 543 (f)	6cLS 5cHS
pH 6.0					
Fe^{3+}	359	415	530	559	6cLS
Fe^{2+}		420 438 (ep)	524 532 (f)	552 541 (f)	6cLS 5cHS
pH 7.6					
Fe^{3+}	359	415	528	559	6cLS
Fe^{2+}		419 444 (ep) 410	528 538 (f)	554 548 (f)	6cLS 5cHS
pH 10.0					
Fe^{3+}	358	416	531	561	6cLS
Fe^{2+}		437 416 (ep)	533	541 (f) 558	5cHS 6cLS

4.3. Spectres de résonance Raman (RR)

Les spectroscopies Raman et infrarouge (IR) sont basées sur la même origine physique : les vibrations des liaisons entre atomes d'une molécule qui correspondent à des transitions permises entre les différents niveaux d'énergie vibrationnelle. Un mode normal de vibration sera actif en IR si le mouvement correspondant s'accompagne d'une variation du moment

dipolaire électrique de la molécule. Il sera actif en Raman si le mouvement correspondant s'accompagne d'une variation de la polarisabilité de la molécule. La nature différente de ces deux processus d'interaction à l'origine de l'effet Raman et de l'IR font que certaines vibrations d'une molécule pourront être seulement actives en Raman, d'autres seulement actives en IR, d'autres le seront pour les deux, et d'autres pour aucun. La spectroscopie de résonance Raman est particulièrement adaptée pour étudier la structure, l'environnement et les propriétés électroniques de l'hème dans les hémoprotéines. Cette spectroscopie vibrationnelle est un outil puissant pour explorer la force des liaisons chimiques du chromophore inséré dans la protéine. Elle permet une grande sélectivité et un degré élevé de résolution. Cette sélectivité repose sur le phénomène de résonance qui permet de minimiser les contributions provenant de la protéine ou du solvant. La résonance se produit lorsque la longueur d'onde excitatrice est proche d'une transition électronique du chromophore étudié. Considérant les propriétés d'absorption des hèmes dans les domaines ultra-violet (UV) proche, visible et IR, cette technique est entièrement adaptée à l'étude de l'environnement et de la structure de l'hème des cytochromes. Les spectres Raman des cytochromes, excités dans la transition électronique la plus intense de l'hème (bande de Soret), contiennent exclusivement des modes de l'hème et de ses liens avec la protéine (ligands axiaux, liaisons covalentes de groupements périphériques).

4.3.a. Les vibrations moléculaires

Les modes normaux de vibrations sont des mouvements dans lesquels tous les atomes ou un groupe d'atome d'une molécule se déplacent à la même fréquence et en phase, chacun d'entre eux pouvant être excité indépendamment. Les vibrations moléculaires de molécules polyatomiques sont de deux types, les élongations et les déformations. Les élongations (ν) correspondent à des changements de longueur de liaison et sont soit symétriques (ν_s), soit antisymétriques (ν_{as}) (Figure 4.9A). Les déformations (δ) sont associées à des changements plans ou non-plans d'angle de liaison. Les déformations planes sont soit symétriques de type cisaillement (scissoring), soit non symétriques de type balancement (rocking) (Figure 4.9B). Les déformations non-planes sont de type hochement (wagging) ou torsion (twisting) (Figure 4.9B). Pour les hèmes, les modes de déformations du noyau tétrapyrrolique sont classés selon qu'ils sont dans le plan moyen de ce noyau ou hors de ce plan (δ).

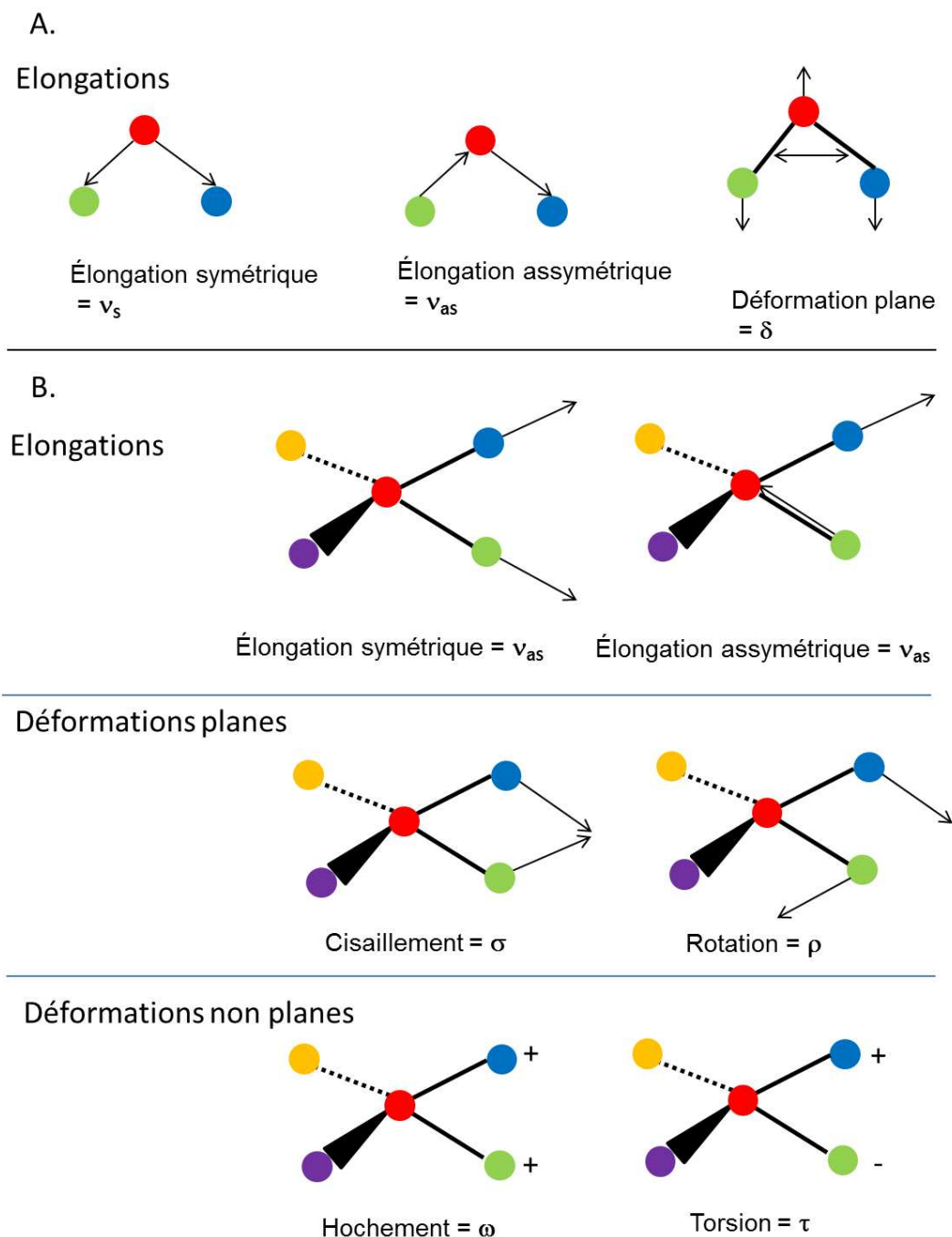
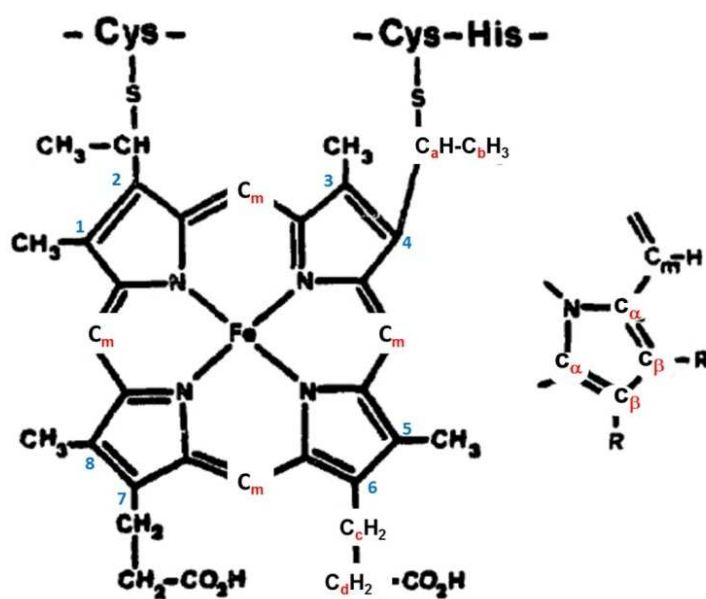


Figure 4.9 : Représentation de modes de vibrations d'une molécule triatomique (A) et d'une molécule penta-atmique (B). Pour les déformations non planes, le signe + indique un déplacement atomique au-dessus du plan des 3 atomes impliqués (atomes bleu, rouge et vert) et le signe - un déplacement atomique au-dessous de ce plan.

4.3.b. Spectres de résonance Raman des cytochromes de type c

L'attribution des différents modes pour les hèmes de type c a été publiée (Hu, Morris et al. 1993; Desbois 1994). Les bandes d'absorption électronique α , β et γ (ou Soret) correspondent



**** Marqueur de l'état d'oxydation**

La fréquence du mode ν_4 (1355-1375 cm^{-1}), mode correspondant principalement à l'élongation des liaisons $\text{C}_\alpha\text{-N}$ du squelette tétrapyrrolique est utilisée comme marqueur de l'état d'oxydation de l'hème. Ce mode ν_4 constitue la bande la plus intense du spectre Raman des cytochromes c en résonance de Soret. Il est visible à 1370-1375 cm^{-1} quand l'atome de fer de l'hème est oxydé et à 1355-1363 cm^{-1} quand il est réduit. La fréquence ν_4 est légèrement mais significativement sensible à la nature des ligands axiaux.

***** Marqueurs de structure du macrocycle de la porphyrine**

Les modes du squelette porphyrine ν_2 , ν_3 , ν_{10} et ν_{11} sont observés entre 1460 et 1640 cm^{-1} ; Ils correspondent à des élongations des liaisons $\text{C}_\alpha\text{C}_m$ (ν_3 , ν_{10}) ou $\text{C}_\beta\text{C}_\beta$ (ν_2 , ν_{11}) et sont sensibles à la taille du cœur de l'hème. La fréquence du mode ν_{11} des hèmes réduits hexacoordonnés est aussi particulièrement sensible à la nature des ligands axiaux.

Les modes suivants des régions de basses et moyennes fréquences servent à caractériser les interactions hème-protéine.

****** Modes de la région des basses fréquences (100-700 cm^{-1})**

La région des basses fréquences des spectres des hèmes c contient de nombreuses bandes attribuées à deux modes : i) des modes d'élongation des liaisons équatoriales ($\nu(\text{Fe-N}(\text{pyrrole}))$), axiales (modes Fe-ligand(s)) et périphériques (modes des ponts thioéther) et ii) des modes de déformation planes et non-planes de la porphyrine et des noyaux pyrroliques avec les groupements périphériques.

****** Modes de la région des moyennes fréquences (700-1300 cm^{-1})**

Dans la région des moyennes fréquences des spectres des hèmes c sont observées des bandes attribuées à deux modes : i) des modes d'élongation et de déformation des liaisons équatoriales ($\nu(\text{Fe-N}(\text{pyrrole}))$) et axiales (modes Fe-ligand(s)) des pyrroles et ii) des modes d'élongation des groupements périphériques (méthyls-1,3,5,8 et propionyls-6,7) et des liaisons C_mH .

4.3.d. Spectres de RR de Tll0287 oxydé et réduit à pH 7,6

Dans une première série d'expériences, nous nous sommes intéressés à la forme oxydée puis réduite au dithionite de Tll0287 à pH 7.6.

*** Dans la région du marqueur redox ν_4 ($1355\text{-}1375\text{ cm}^{-1}$),** deux espèces sont distinguables sous la forme oxydée comme sous la forme réduite de Tll0287 à pH 7,6 : une espèce LS et une espèce HS (voir définition dans le paragraphe 1.3.c de l'introduction). La forme 6c et 5c correspondent aux formes hexa- et pentacoordonnée, à bas spin (LS pour Low Spin) ou à haut spin (HS pour High Spin).

Comme indiqué dans le tableau 4.2, pour la forme oxydée (Fig. 4.11, spectre a), les bandes majeures détectées à 1375 , 1505 , 1596 et 1640 cm^{-1} (respectivement ν_4 , ν_3 , ν_2 , et ν_{10}) peuvent être associées à une espèce 6cLS. Les épaulements à 1366 (ν_4), 1499 (ν_3) et 1585 (ν_{10}) cm^{-1} sont attribués à une espèce penta ou hexacoordonnée HS. Pour la forme réduite par le dithionite (Fig. 4.11, spectre b), les bandes majeures (ν_4 , ν_3 , ν_2 , et ν_{10} , respectivement à 1360 , 1497 , 1597 et 1623 cm^{-1}) correspondent à une espèce 6cLS et les contributions à 1353 (ν_4), et 1586 (ν_2) cm^{-1} à une espèce 5cHS.

On observe que les deux bandes de faible intensité situées dans la région $1300\text{-}1320\text{ cm}^{-1}$ sont significativement déplacées ($1310/1307\text{ cm}^{-1}$ et $1315/1311\text{ cm}^{-1}$). Ces bandes sont attribuées à des modes de déformation des liaisons C_aH des ponts thioéther ($\delta(\text{C}_a\text{H})_{2,4}$) (Hu, Morris et al. 1993). Il faut noter que, pour le Tll0287 réduit, les modes ν_3 (1497 cm^{-1}) et ν_2 (1597 cm^{-1}) sont observés à des fréquences atypiques comparées à celles de divers ferrocyclochromes de type c (respectivement, $1491\text{-}1493$ et $1589\text{-}1594\text{ cm}^{-1}$) (Desbois 1994). Pour la forme oxydée de Tll0287, seul ν_2 (1596 cm^{-1}) est à une fréquence significativement plus élevée que celle des ferricyclochromes ($1590\text{-}1594\text{ cm}^{-1}$).

Tableau 4.2 : Fréquences (cm^{-1}) des principaux modes RR du squelette porphyrinique de Tll0287 oxydé à pH 7.6. Nc = nombre de coordinations. LS : Low spin et HS : High spin.

Tll0287 pH 7.6	ν_4	ν_3	ν_2	ν_{10}	Nc, spin
Fe^{3+}	1375 1366	1505 1499	1596	1640 1585	6cLS 5c ou 6cHS
Fe^{2+}	1360 1353	1497	1597 1586	1623	6cLS 5c ou 6cHS

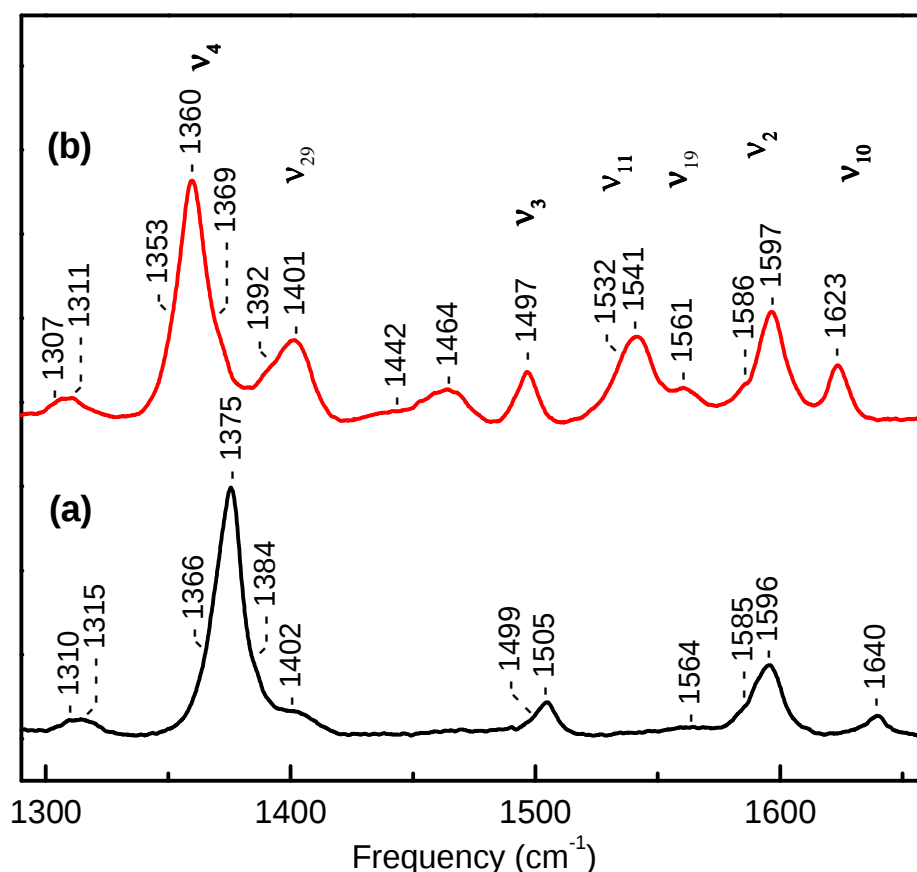


Figure 4.11 : Région des hautes fréquences ($1300\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) des spectres de résonance Raman de Tll0287 à pH 7,6. Spectre (a) : forme oxydée (noir) ; spectre (b) forme réduite par le dithionite (en rouge).

*** * Dans la région des basses fréquences ($220\text{-}620\text{ cm}^{-1}$)** (Fig. 4.12), nous observons entre la forme oxydée et la forme réduite des modifications de fréquence ou/et d'intensité d'un grand nombre de bandes. Parmi celles les plus affectées dans la transition oxydée vers réduite, on détecte :

- dans la région des modes ν_9 et ν_{51} , attribués à des modes de déformation des liaisons pyrrole-substituent périphérique ($\delta(\text{C}_\beta\text{C}_R)$), la bande à 294 cm^{-1} (forme oxydée) éclatée en deux composantes à 280 et 291 cm^{-1} (forme réduite) et les bandes à 320 et 333 cm^{-1} déplacées à 316 et 325 cm^{-1} ;
- le déplacement d'un mode de déformation des groupements propionyls-6,7 ($\delta(\text{C}_\beta\text{C}_c\text{C}_d)$) ($383/387\text{ cm}^{-1}$) ;
- l'activation du mode γ_{22} (déformation non-plane des pyrroles) sur le spectre de la forme réduite (442 cm^{-1}) ;

iv) dans la région du mode ν_{33} , déformation plane des pyrroles, deux bandes détectées à 461 et 480 cm^{-1} sur le spectre de la forme oxydée sont fusionnées en une seule bande à 476 cm^{-1} sur le spectre de la forme réduite ;

v) la fréquence de deux déformations non planes des pyrroles, γ_{12} et γ_{21} , également fortement affectée (respectivement, 516/512 et 569/563 cm^{-1}). Il est à noter que le mode γ_{21} est un mode sensible à la nature des ligands axiaux de l'hème (Desbois 1994).

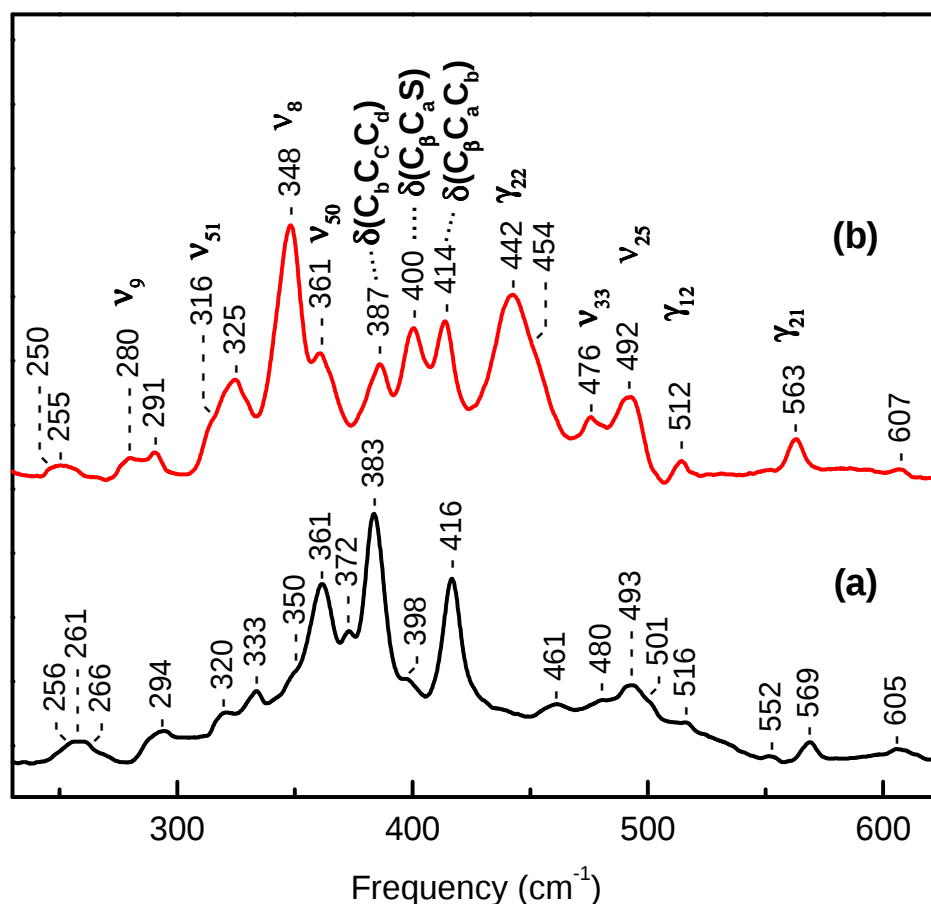


Figure 4.12 : Région des basses fréquences (230-620 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de Tll0287 à pH 7,6. Spectre (a) : forme oxydée (noir) ; spectre (b) forme réduite par le dithionite (en rouge).

*** * * Dans la région 600-860 cm^{-1} des spectres** (Figure 4.13), les modes suivants sont significativement affectés en fréquence :

- i) le mode d'élongation des ponts thioéther ($\nu(\text{C}_a\text{S})$) (690/684 cm^{-1}) ;
- ii) les modes de déformations planes des pyrroles ν_{48} et ν_7 (632/638 et 702/693 cm^{-1}) ;
- iii) les modes de déformations non planes des pyrroles γ_{20} et γ_{11} (658/653, 671/668 et 724/719 cm^{-1}) ;
- iv) les modes de respiration des pyrroles ν_{15} et ν_6 (757/748 et 792/788 cm^{-1}).

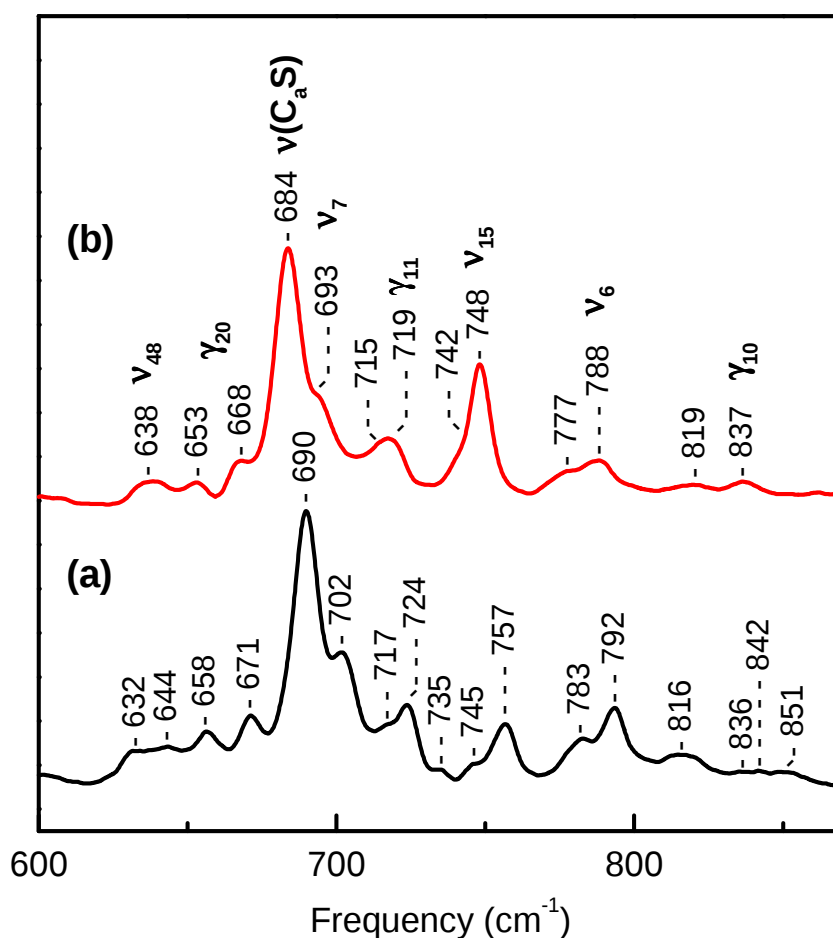


Figure 4.13 : Région des moyennes fréquences (600-870 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de TII0287 à pH 7,6. Spectre (a) : forme oxydée (noir) ; spectre (b) forme réduite par le dithionite (en rouge).

***** Dans la région 900-1250 cm^{-1} des spectres** (Figure 4.14), nous observons à nouveau entre la forme oxydée et la forme réduite, des modifications spectrales importantes. On relève en particulier les déplacements de fréquence du mode d'élongation $\nu(\text{C}_\text{c}\text{C}_\text{d})$ des propionyls-6,7 (980/974 cm^{-1}), du mode de déformation des méthyls-2,4 (1048/1052 cm^{-1}) et des modes d'élongation symétriques ν_5 , ν_{44} et ν_{14} des liaisons C_β -substituants ($\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\text{R})$) (1122/1116, 1130/1126, et 1135/1132 cm^{-1}). On remarque également sur le spectre de la forme réduite la disparition d'une bande observée à 1222 cm^{-1} sur le spectre de la forme oxydée. On peut également observer dans la région du mode ν_{30} , mode d'élongation des pyrroles, la coalescence de deux bandes à 1171 et 1176 cm^{-1} (forme oxydée) en une bande intense à 1174 cm^{-1} (forme réduite), et enfin, l'activation sur le spectre de la forme réduite d'un mode de déformation des méthyls -2,4 à 1186 cm^{-1} .

L'ensemble des modifications spectrales enregistrées entre 200 et 1330 cm^{-1} sont l'indice d'une modification très importante de l'environnement de l'hème entre la forme oxydée et la forme réduite. Les modes affectés sont ceux qui concernent les vibrations planes et non-planes des noyaux pyrroliques, couplées à des interactions avec les ligands axiaux et les groupements périphériques comme les méthyls, les ponts thioéther et les propionyls.

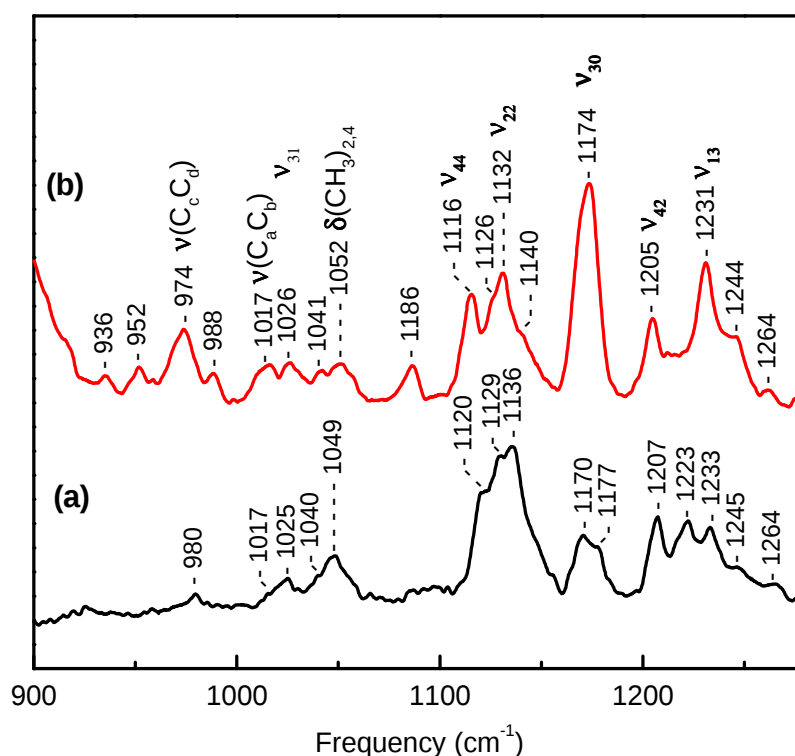


Figure 4.14 : Région des moyennes fréquences (900-1270 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de Tll0287 à pH 7,6. Spectre (a) : forme oxydée (noir) ; spectre (b) forme réduite par le dithionite (en rouge).

Si nous comparons les spectres Raman des formes oxydée et réduite du cyt c de cheval (Desbois 1994 et spectres non publiés), du cyt c_2 de *Rhodobacter capsulatus* (Othman, Fitch et al. 1997) ou du cyt c_{550} de *Thermosynechoccus elongatus* (Boussac & Desbois, données non publiées), les variations spectrales des modes périphériques se situent entre 0 et 4 cm^{-1} , ce qui indique une stabilité de l'environnement de l'hème entre les deux états redox. Ceci est en accord avec les changements structuraux minimaux de l'hème, observés dans les structures du cyt c déterminées à haute résolution (Berghuis and Brayer 1992). Les déplacements de fréquence des modes périphériques de Tll0287 sont détectés entre 3 et 9 cm^{-1} , signature d'un remaniement structural important au voisinage de l'hème.

4.3.e. Sensibilité au pH des spectres RR de Tll0287 oxydé et réduit

* Spectres de Tll0287 oxydé à différents pH

Les figures 4.15 à 4.18 présentent les spectres RR de Tll0287 oxydé en fonction du pH. Dans toutes les régions explorées, nous observons comme pour les spectres d'absorption électronique, des modifications spectrales relativement mineures. Dans la région des hautes fréquences, les spectres à pH 6 et 7.6 ne sont pas significativement différents (Figure 4.15, Tableau 4.3). A pH 10, on observe l'activation de nouvelles bandes de faible intensité ($1340, 1393, 1538, 1549 \text{ cm}^{-1}$) et d'un troisième composant de ν_{10} à 1632 cm^{-1} . Dans la région des basses fréquences (Figure 4.16), nous enregistrons de petites modifications de la forme d'un massif constitué de 4 bandes à *ca.* $251, 256, 261$ et 267 cm^{-1} ($\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\text{R})$), et un déplacement de la bande à 294 cm^{-1} ($\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\text{R})$), indice de petites modifications périphériques. Dans la région spectrale $600\text{-}850 \text{ cm}^{-1}$ (Figure 4.17), le mode d'élongation des ponts thioéther ($\nu(\text{C}_\text{a}\text{S})$) n'est pas affecté (684 cm^{-1}). Seul le mode ν_{48} (mode de déformations planes des pyrroles) montre une dispersion en fréquence de 630 à 638 cm^{-1} . Dans la région $900\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ (Figure 4.18), les modifications spectrales sont aussi assez mineures. On note à pH 6 l'absence d'activité du mode d'élongation $\nu(\text{C}_\text{c}\text{C}_\text{d})$ des propionyls-6,7 ($979\text{-}980 \text{ cm}^{-1}$) et une modification en fréquence et/ou en intensité des bandes situées dans la région $1010\text{-}1060 \text{ cm}^{-1}$. Ces bandes correspondent aux modes périphériques $\nu(\text{C}_\text{a}\text{C}_\text{b})_{2,4}$, $\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\text{R})$ et $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\text{R})$.

Dans l'ensemble, les légers effets du pH détectés sur les spectres Raman de Tll0287 oxydé traduisent de petites modifications périphériques associées à des protonations/déprotonations des propionyls et d'acides aminés à proximité du ferrihème c, la structure du macrocycle et ses interactions avec les ligands axiaux étant stables.

Tableau 4.3 : Fréquences (cm^{-1}) des principaux modes RR du squelette porphyrinique de TII0287 oxydé. Nc: nombre de coordinations du Fer. 5c: pentacoordonné, 6c: hexacoordonné, LS : Low Spin, HS : High Spin.

TII0287 Oxydé (Fe^{3+})	ν_4	ν_3	ν_{11}	ν_2	ν_{10}	Nc, spin
pH 6	1375	1504	1562	1596	1639	6cLS
	1368	1497		1587	1619	5c ou 6cHS
pH 7.6	1375	1505	1564	1595	1640	6cLS
	1366	1499		1585		5c ou 6cHS
pH 10	1374	1505		1594	1640	6cLS
	1368	1501		1587	1632, 1620	5c ou 6cHS

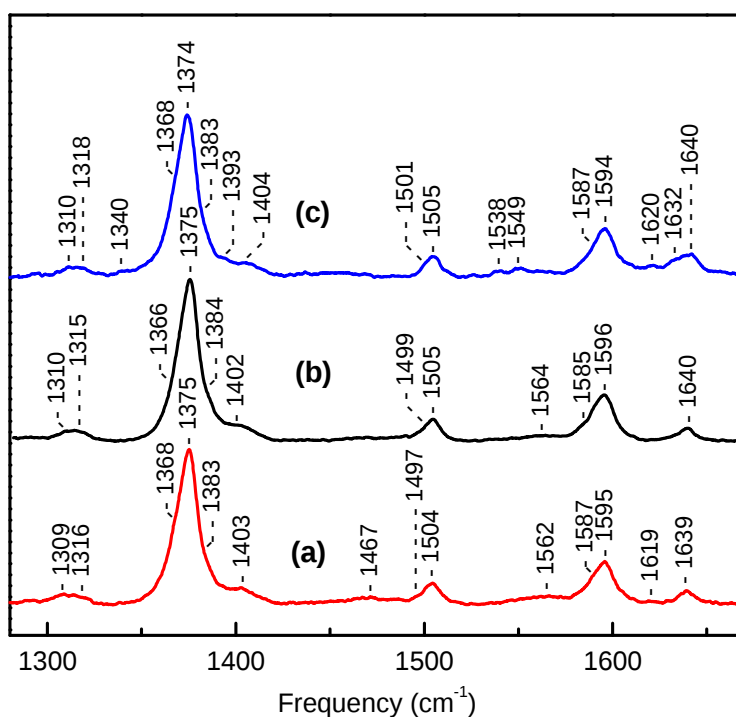


Figure 4.15 : Région des hautes fréquences ($1300\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) des spectres de résonance Raman de TII0287 oxydé à pH 6 (a, en rouge), pH 7,6 (b, en noir), et pH 10 (c, en bleu).

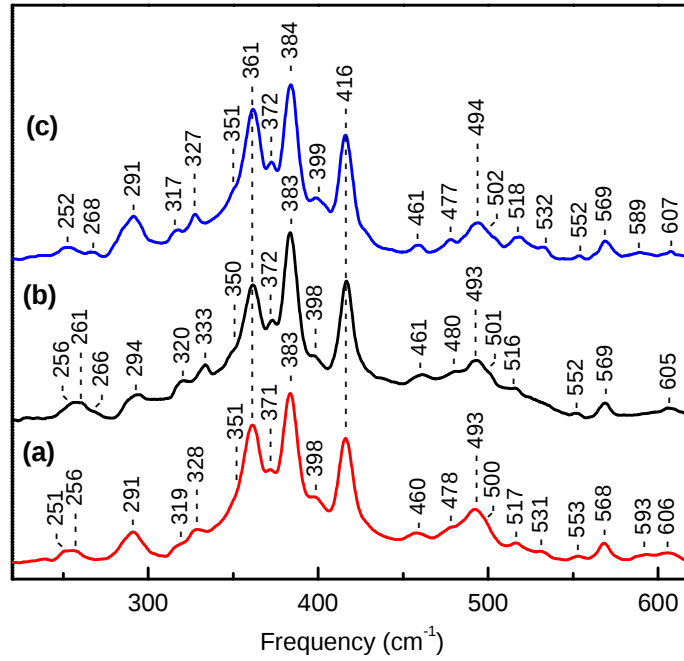


Figure 4.16 : Région des basses fréquences (220-610 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de Tll0287 oxydé à pH 6 (a, en rouge), pH 7,6 (b, en noir), et pH 10 (c, en bleu).

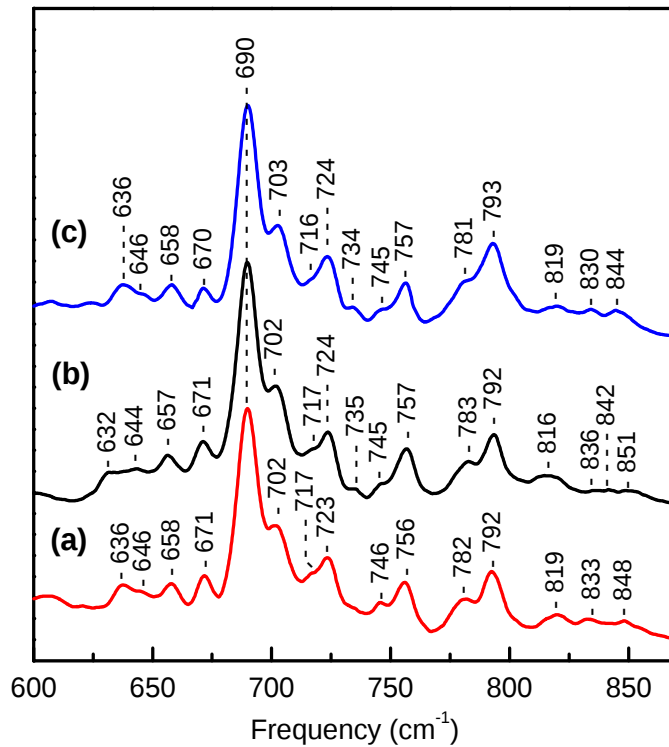


Figure 4.17 : Région des moyennes fréquences (600-870 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de Tll0287 oxydé à pH 6 (a, en rouge), pH 7,6 (b, en noir), et pH 10 (c, en bleu).

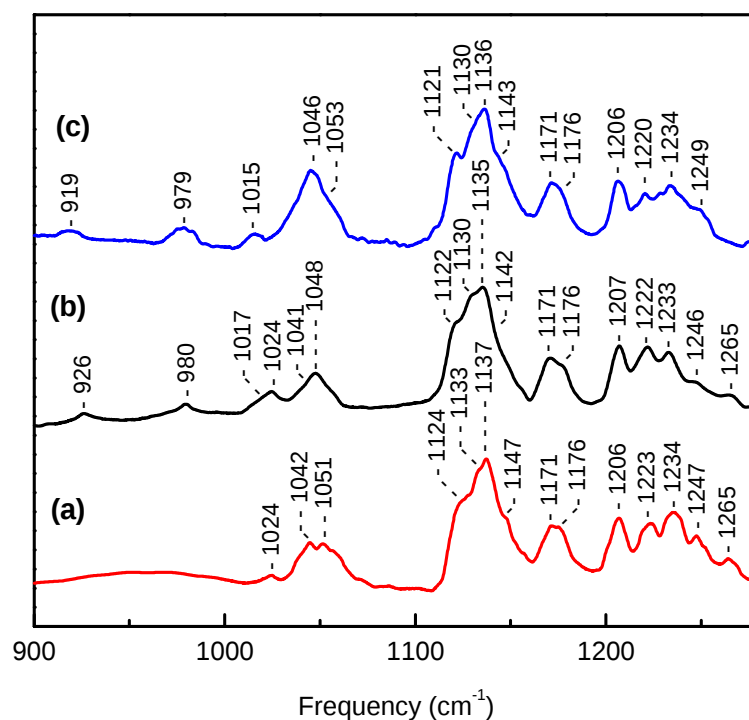


Figure 4.18 : Région des moyennes fréquences (900-1270 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de Tll0287 oxydé à pH 6 (a, en rouge), pH 7,6 (b, en noir), et pH 10 (c, en bleu).

**** Spectres de Tll0287 réduit à différents pH**

Contrairement à la forme oxydée, les spectres de résonance Raman de la forme réduite de Tll0287 sont très sensibles au pH (Figures 4.19 - 4.22). Cette propriété est différente de celle des spectres des Cyt c mitochondriaux, du Cyt c_2 ou du Cyt c_{550} qui ne montrent qu'une faible sensibilité redox entre pH 6 et 10.

Considérant les spectres obtenus à pH 7,6 et 6, les plus grandes différences concernent :

- i) un déplacement des composantes de ν_4 vers les hautes fréquences (1360 et 1353 cm^{-1} vs 1363 et 1357 cm^{-1}) ;
- ii) un changement d'intensité relative des bandes correspondant à ν_{11} (1532-1533/1541-1542 cm^{-1}) et ν_{29} (1555/1561 cm^{-1})
- iv) des déplacements de fréquence et des changements de forme des massifs de la région de ν_2 et de ν_{11} (1586-1597 cm^{-1} et 1621-1626 cm^{-1}) (Tableau 4.4).

La comparaison des spectres de Tll0287 à pH 7,6 et 10 montre d'autres variations spectrales avec notamment l'apparition de deux composantes 5cHS à 1469 et 1608 cm^{-1}

(en plus de l'épaule à 1353 cm^{-1}). Ces contributions apparaissent faibles sur le spectre excité à 413.1 nm , mais en tenant compte du spectre d'absorption électronique, elles correspondent en fait à l'espèce majoritaire en solution (bande de Soret à 437 nm). La faible quantité de protéine purifiée n'a pas permis d'exciter le spectre de cette espèce HS dans de meilleures conditions de résonance.

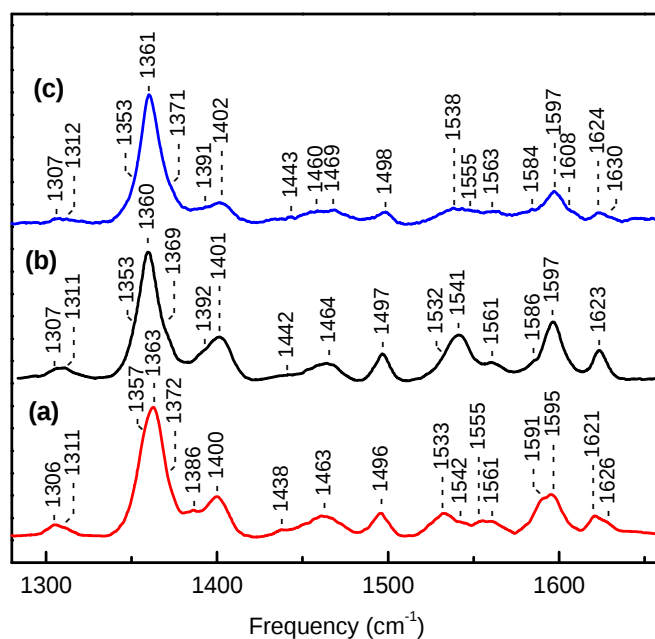


Figure 4.19 : Région des hautes fréquences ($1300\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$) des spectres de résonance Raman de TII0287 réduit par l'ion dithionite à pH 6 (a, en rouge), pH 7,6 (b, en noir), et pH 10 (c, en bleu).

Tableau 4.4 : Fréquences (cm^{-1}) des modes RR du squelette porphyrinique de Fe^{2+} -TII0287 à différents pH. 5c : pentacoordonné, 6c : hexacoordonné, LS : Low Spin, HS : High Spin.

TII0287 réduit (Fe^{2+})	ν_4	ν_3	ν_{11}	ν_2	ν_{10}	Nc,spin
pH 6	1363	1496	1533	1595	1621	6cLS
	1357		1542	1591	1626	5cHS
pH 7.6	1360	1497	1541	1597	1623	6cLS
	1353		1532	1586		5cHS
pH 10	1361	1498	1538	1597	1624	6cLS
	1353	1469		1584	1630, 1608	5cHS

La région des basses fréquences (Figure 4.20) met encore en évidence des modifications spectrales importantes à la fois en fréquence et en intensité relative. A pH 6, on observe

par rapport au spectre à pH 7,6 :

- i) la disparition de certaines bandes (315-316 (ν_9), 325, 442-446 (γ_{22}) cm^{-1}) et l'activation d'une bande à 495 cm^{-1} (γ_{25}) ;
- ii) un déplacement vers les basses fréquences du mode ν_{50} (357 cm^{-1}) ;
- iii) un dédoublement et/ou un déplacement des modes de déformation des propionyls-6,7 et des ponts thioéther ($\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\epsilon\text{C}_\delta)$ à 378 et 384 cm^{-1} ; $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{S})$ à 390 et 404 cm^{-1} ; $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\beta)$ à 417 cm^{-1}) ;
- iv) un déplacement du mode γ_{21} (565 cm^{-1}).

A pH 10, les bandes principales observées à pH 7.6 sont assez peu modifiées. On observe des déplacements de fréquence des modes $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{S})$ (404 cm^{-1}), $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\beta)$ (416 cm^{-1}), γ_{22} (446 et 456 cm^{-1}), ν_{33} (483 cm^{-1}), γ_{12} (518 cm^{-1}), et γ_{21} (567 cm^{-1}). On distingue également l'apparition de nouvelles bandes (341 (ν_8), 534 552, 588 cm^{-1}) associées à l'espèce HS.

Dans la région 600-840 cm^{-1} des spectres RR (Figure 4.22), le mode ($\nu(\text{C}_\alpha\text{S})$) n'est pas affecté. Seul le mode ν_{48} , un mode de déformation des pyrroles, présente une variation de fréquence significative (630/638/634 cm^{-1}). La région 900-1280 cm^{-1} (Figure 4.23) présente des altérations spectrales en fréquence et intensité pour les modes périphériques que sont $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_\beta)$ (1014-1017 cm^{-1}), ν_{33} (1023-1026 cm^{-1}), $\delta(\text{C}_\beta\text{H}_3)$ (1040-1044 cm^{-1}) et $\delta(\text{C}_m\text{H})$ (1214-1218 cm^{-1}).

De l'ensemble des données RR collectées et compte tenu de l'origine vibrationnelle des modes sensibles au pH, nous pouvons conclure à des modifications de l'état de coordination axiale de l'hème, et des interactions hème-ligands et hème-protéine. En milieu acide, une protonation et/ou un changement de conformation d'au moins un des groupements propionyls pourraient être à l'origine des altérations spectrales enregistrées.

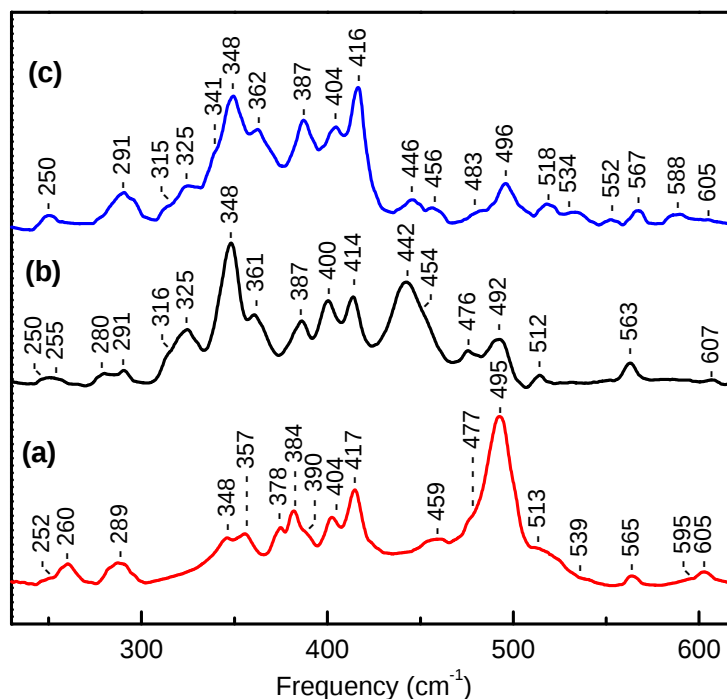


Figure 4.20 : Région des basses fréquences (230-620 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de Tll0287 réduit par l'ion dithionite à pH 6 (a, en rouge), pH 7,6 (b, en noir), et pH 10 (c, en bleu).

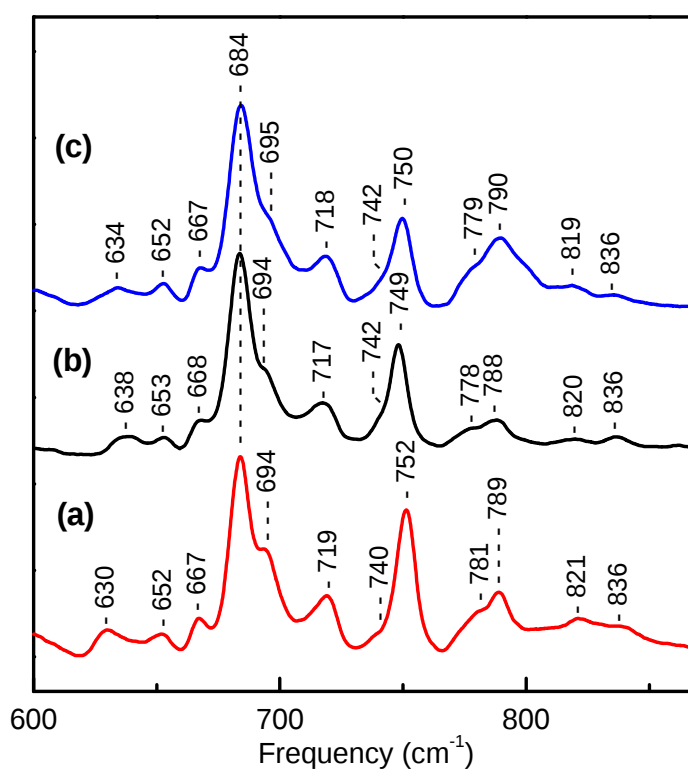


Figure 4.22 : Région des moyennes fréquences (600-860 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de Tll0287 réduit par l'ion dithionite à pH 6 (a, en rouge), pH 7,6 (b, en noir), et pH 10 (c, en bleu).

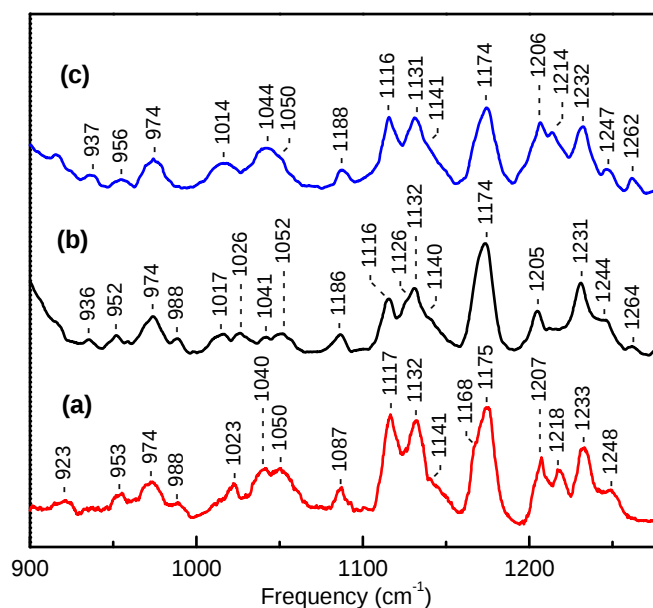


Figure 4.23 : Région des moyennes fréquences (900-1270 cm^{-1}) des spectres de résonance Raman de Tll0287 réduit par l'ion dithionite à pH 6 (a, en rouge), pH 7,6 (b, en noir), et pH 10 (c, en bleu).

La comparaison des données d'absorption électronique et RR obtenues pour Tll0287 avec celles disponibles pour des systèmes modèles, de type microperoxydase (MP8), et des protéines à hème c permet de proposer des schémas de coordination de l'hème de Tll0287 oxydé et réduit en fonction du pH (Tableaux 4.5 - 4.8) .

Concernant la forme oxydée, les spectres de l'espèce majeure sont très peu ou pas sensibles au pH. La récente détermination structurale de Tll0287 oxydé a montré que son hème c est axialement coordonné par une histidine (His 145) et une cystéine (Cys 68). Une bande δ très intense et une bande de Soret à 415-416 nm signent un spectre caractéristique d'une coordination His- Fe^{3+} hème-thiolate (Tableau 4.5). La cystéine 68 de Tll0287 oxydée est donc déprotonée. La charge globale +1 du ferrihème ((complexe Fe^{3+} -porphyrine dianion) $^{+1}$) et l'anion cystéinate (Cys^-) stabilisent fortement la liaison axiale Fe-Cys. Les données Raman, quoique assez peu sensibles pour les formes ferriques, ne contredisent pas cette conclusion (Tableau 4.6).

Tableau 4.5 : Maxima d'absorption (nm) de divers Fe³⁺-hémoprotéines et Fe³⁺-hémopeptides à hème c. ep : épaulement.

Dérivés Hème c oxydés(Fe ³⁺)	δ	Soret (γ)	β	α	ligand(s)	références
MP8		399 403	530		His/H ₂ O His/OH ⁻	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt c'		401			His	(Meyer and Kamen 1982)
DcrA-N		400			His/H ₂ O	(Yoshioka, Kobayashi et al. 2005)
Domaine senseur 0582		401			His/H ₂ O	(Pokkuluri, Pessanha et al. 2008)
MP8 + Im		407 414	526 540	555 556	His/Im His/Im ⁻	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt c₃	350	410			His/His	(Meyer and Kamen 1982)
MP8 + AcMet		409 412	526 537	557 557	His/Met His ⁻ /Met	(Othman and Desbois 1998)
Cyt c		409	529		His/Met	(Meyer and Kamen 1982)
Cyt c₂	362	411			His/Met	(Meyer and Kamen 1982)
Cyt c₅₅₁	356	409			His/Met	(Meyer and Kamen 1982)
MP8 + Lys		405 408	530 532	556 560	His/Lys His ⁻ /Lys	(Othman and Desbois 1998)
Cyt c₅₅₀ M100K	357	408	526		His ⁻ /Lys	(Ubbink, Van Beeumen et al. 1992)
AcMP8 + AcCys		417	538 (ep.)	567	His-Cys ⁻	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt c M80C		416	540		His-Cys ⁻	(Raphael and Gray 1989; Wallace and Clark-Lewis 1992)
Cyt c T78C/L79G/M80L	355	418	538		His-Cys ⁻	(Zhong, Lisi et al. 2013)
NaxLS	350	419	540	580	His-Cys ⁻	(Ukita, Fujii et al. 2010)
PsbV2	354	417	538	562	His-Cys ⁻	(Kerfeld, Sawaya et al. 2003)
Tll0287	359	415	530	559	His-Cys ⁻	Non publié

Tableau 4.6 : Fréquences (cm^{-1}) des modes RR du squelette porphyrinique de divers Fe^{3+} -hémoprotéines et Fe^{3+} -hémopeptides à hème c. 5c : pentacoordonné, 6c : hexacoordonné, LS : Low Spin, HS : High Spin.

Dérivés Hème c oxydés (Fe^{3+})	ν_4	ν_3	ν_{11}	ν_2	ν_{10}	Nc,spin	Ligand(s)	Références
MP8	1373	1491	1556	1578	1629	5cHS	His	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt c'	1370	1495	1558	1580	1625	5cHS	His	(Othman, Richaud et al. 1996)
DcrA-N	1370	1481 1509		1568 1580	1612 1643	6cHS 6cLS	His/ H_2O His/ OH^-	(Yoshioka, Kobayashi et al. 2005)
Cyt c (intermédiaires de repliement)	1370 1369 1374	1492 1483 1506		1574 1571 1588	1621 1640	5cHS 6cHS 6cLS	His His/ H_2O His/His	(Yeh and Rousseau 1998)
MP8 + Im	1377 1375	1504 1502	1554 1557	1587 1588	1639 1634	6cLS 6cLS	His/Im His ⁻ /Im ⁻	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt c₅₅₀	1374	1505	1551	1585	1640	6cLS	His/His	Boussac A, Desbois A, non publié
MP8 + AcMet	1373 1377	1505 1503	1553 1555	1590 1591	1635 1633	6cLS 6cLS	His/Met His ⁻ /Met	(Othman and Desbois 1998)
Cyt c (pH 7.5)	1372	1503	1562	1583	1637	6cLS	His/Met	Desbois A, non publié
Cyt c₂	1369	1503	1555	1582	1638	6cLS	His/Met	(Othman, Fitch et al. 1997)
MP8 + Lys	1377 1374	1506 1503	1557 1552	1589 1587	1639 1635	6cLS 6cLS	His/Lys His ⁻ /Lys	(Othman and Desbois 1998)
Cyt c (pH 12)	1374	1503	1562	1586	1640	6cLS	His/Lys	Desbois A, non publié
Cyt c M80C	1373	1503	1567	1589	1636	6cLS	His/Cys ⁻	(Smulevich, Bjerrum et al. 1994)
PsbV2	1377	1505		1591	1639	6cLS	His/Cys ⁻	(Kerfeld, Sawaya et al. 2003)
Tll0287	1375	1505	1564	1595	1640	6cLS	His/Cys ⁻	Non publié

Les spectres d'absorption et RR montrent que le passage de la forme ferrique à la forme ferreuse entraîne des bouleversements importants de la structure autour de l'hème de Tll0287. Comme pour toutes les protéines à hème de type c, la 5^{ème} position de coordination (His) est fortement stabilisée par les deux ponts thioéther de la séquence caractéristique CXXCH. En revanche, la 6^{ème} position de coordination peut être très instable pour l'hème ferreux. Du fait que le pK_a d'un ligand ionisable de l'hème est plus élevé par 3 à 4 unités quand il est fixé à un ion ferreux qu'à un ion ferrique (Desbois and Lutz 1992), l'ion thiolate fixe un proton quand

le ferrihème est réduit dans une gamme de pH de 5 à 8 (pK_a Cys-SH en solution = 8,3). Le ligand neutre ainsi formé (thiol) est un ligand faible pour un hème ferreux. Soit par proximité spatiale, soit par changement conformationnel, la cystéine neutre peut alors être substituée par un ligand plus fort de type N(His), S(Met), N(Lys) ou NH_2 -terminal. Ce mécanisme est assez général pour les senseurs hème-thiolate de type 2 (Smith, Pazicni et al. 2015). De pH 5 à pH 7,6, la forme majeure de Tll0287 présente une bande de Soret à 419-420 nm (Tableau 4.1). La comparaison des données d'absorption collectées sur diverses hémoprotéines à Fe^{2+} -hème c et de coordination axiale connue est en faveur d'une coordination His/His (Tableau 4.7), les bandes de Soret des coordinations His/Met ou His/amine étant situées dans la région 415-417 nm. Parmi les modes RR de hautes fréquences, ν_{11} est le plus sensible à la coordination axiale. A pH 6 et 7,6, deux composantes de ν_{11} sont détectées à 1532-1533 et 1541-1542 cm^{-1} . Ces deux fréquences peuvent être associées à un jeu de ligands His/His pour lesquels le degré d'interaction par liaison H ou d'ionisation d'au moins un cycle imidazole de l'histidine est différent, la composante à 1532-1533 cm^{-1} représentant un caractère électronégatif global des His plus important que celui de la composante à 1541-1542 cm^{-1} (Tableau 4.8). Une arginine conservée (Arg 94) à proximité de l'histidine (His 145) du motif CXXCH (3,45 Å) pourrait moduler l'électronégativité du cycle imidazole de l'histidine 145 (Figure 4.24). L'examen des séquences en acides aminés de huit Tll0287 (Figure 4.25) ne montre que deux histidines conservées : l'histidine 145 du motif CXXCH et l'histidine 98. Selon le schéma d'une coordination His/His pour Tll0287 réduit entre pH 6 et 7,6, l'histidine 98 pourrait donc être le 6^{ème} ligand. En milieu basique, Tll0287 réduit apparaît, selon les données d'absorption et RR, être 5cHS avec une coordination axiale de l'acide aminé His 145, la 6^{ème} position étant vacante pour fixer des ligands exogènes (Figure 4.26).

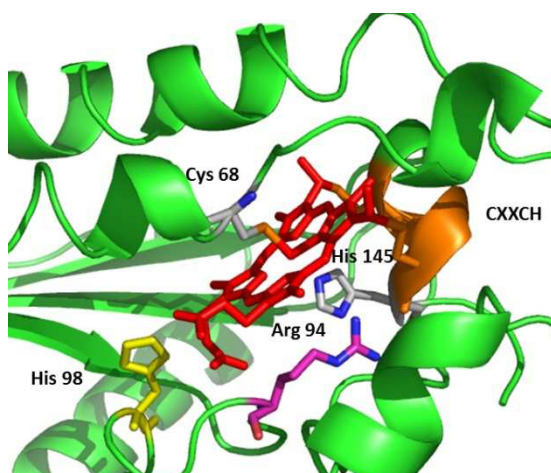


Figure 4.24 : Environnement de l'hème dans la structure cristallographique de Tll0287. L'hème est en rouge, le motif CXXCH est en orange.

Tableau 4.7 : Maxima d'absorption (nm) de divers Fe²⁺-hémoprotéines et Fe²⁺-hémopeptides à hème c.

Dérivés hème c réduits (Fe ²⁺)	Soret (Y)	β	α	Hème ligand(s)	Références
MP8	428 434	550 554	559 583	His His ⁻	(Othman, Le Lirzin et al. 1993)
Cyt c'	424	550		His	(Meyer and Kamen 1982)
MP8 + Im	417 422	522 525	551 553	His/Im His/Im ⁻	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt c M80H	417	522	551	His/His	(Raphael and Gray 1989)
Cyt c ₃	419	522	552	His/His	(Meyer and Kamen 1982)
Cyt c ₅₅₀	419	521	550	His/His	(Meyer and Kamen 1982)
MP8 + AcMet	416	523	552	His/Met	(Othman and Desbois 1998)
Cyt c	416	520	549	His/Met	(Meyer and Kamen 1982)
Cyt c ₂	416	520	550	His/Met	(Meyer and Kamen 1982)
Cyt c ₅₅₁	416	521	551	His/Met	(Meyer and Kamen 1982)
MP8 + Lys	415 416	519 521	548 550	His/Lys His ⁻ /Lys	(Othman and Desbois 1998)
Cyt c ₅₅₀ M100K	417	521	550	His/Lys	(Ubbink, Van Beeumen et al. 1992)
AcMP8 + AcCys	416	520	550	His/Cys	(Zhong, Lisi et al. 2013)
Cyt c T78C/L79G/M80L	417	521	549	His/Cys	(Zhong, Lisi et al. 2013)
TII0287	419	528	554		Non publié

Tableau 4.8 : Fréquences (cm⁻¹) des modes RR du squelette porphyrinique de divers Fe²⁺-hémoprotéines et Fe²⁺-hémopeptides. 5c : pentacoordonné, 6c : hexacoordonné, LS : Low Spin, HS : High Spin.

Dérivés Hème c réduits (Fe ²⁺)	v ₄	v ₃	v ₁₁	v ₂	v ₁₀	NC, spin	Ligand(s)	Références
MP8	1354 1353	1469 1471	1556 1555	1572 1571	1605 1606	5cHS 5cHS	His His ⁻	(Othman, Le Lirzin et al. 1993)
Cyt c'	1354	1468	1553	1573	1604	5cHS	His	(Othman, Richaud et al. 1996)
MP8 + Im	1360 1357	1491 1491	1539 1527	1590 1590	1621 1618	6cLS 6cLS	His/Im His ⁻ /Im ⁻	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt c ₃	1358	1492	1541	1591	1620	6cLS	His/His	(Desbois 1994)
Cyt c ₅₅₀	1358	1493	1534	1590	1622	6cLS	His/His ⁻	(Kerfeld, Sawaya et al. 2003)
MP8 + AcMet	1361 1358	1492 1492	1545 1540	1590 1590	1622 1618	6cLS 6cLS	His/Met His ⁻ /Met	(Othman and Desbois 1998)
Cyt c	1362	1492	1548	1594	1623	6cLS	His/Met	(Desbois 1994)
Cyt c ₂	1359	1492	1545	1592	1622	6cLS	His/Met	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt c ₅₅₁	1363	1492	1545	1592	1622	6cLS	His/Met	(Desbois 1994)
MP8 + Lys	1359 1356	1492 1491	1535 1529	1591 1590	1620 1614	6cLS 6cLS	His/Lys His ⁻ /Lys	(Othman, Le Lirzin et al. 1994)
Cyt f	1357	1491	1533	1589	1618	6cLS	His/NH ₂	(Desbois 1994)
TII0287	1360	1497		1597	1623	6cLS		Non publié

<i>Filamentous cyanobacterium</i>	-----MSKLIS--RLILSCAIAIIWFSQMPMAQAAN--PAELSKAVE	39
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	-----MIKKLW--KMVLSILCVSLIWFSGGNKILHADTLPLNDLGKAVT	41
<i>Leptolyngbya sp. PCC 6406</i>	-----MRPIYRIAFICIGMAITVMLL---QPTATWAAVNPAELAKAVQ	39
<i>Arthrospira platensis</i>	-----MLRALS--KFVLGLLVAVFLLGSYRTTPVYAGVVPEELAKAVE	41
<i>Spirulina subsalsa</i>	-----MRFLP--SALILGLILCLFCGFS--FPKVAQADILPENLAKVVQ	40
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	-----MVR--IFLMALLMASLWIQG--SPAPLASANPEELGKVVT	36
<i>Synechococcus sp. RS9917</i>	MNNLTSALSQLLA--ALIAGLLFTVQPAIA--LANQGTAPVDPVAVLAKAVD	47
<i>Cyanobium sp. PCC 7001</i>	--MATSAAMLMLG--AFLIG----VAPCAA--LAAPPEAPVNPEVLAKAVD	41
Cys 68		
<i>Filamentous cyanobacterium</i>	EIEYLDATRSGLASSLEGRTPEPTKQTMKEV	89
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	EIENLDEMRSHLASFLESTPDKPTPDTFKQV	91
<i>Leptolyngbya sp. PCC 6406</i>	EIEQLDMLRSLASTLEGQTAEPTMTKTMKEV	89
<i>Arthrospira platensis</i>	AIENLDGLRRLASTLEGQTTEPTGQTFKEV	91
<i>Spirulina subsalsa</i>	EIEYLDQMRSGLASTLEGRSEETPTQTMQEV	90
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	AIEQLDQMRIGLASTLEGGTSEPTLDTFKAV	86
<i>Synechococcus sp. RS9917</i>	QMEALDRMRISLASSLEGSTEEPTMDTMREV	97
<i>Cyanobium sp. PCC 7001</i>	QMEQLDRLRIGLAATLEGSTEEPTMATMKEV	91
Arg 94 His 98		
<i>Filamentous cyanobacterium</i>	KQIATKYRNPNHAPQSETEENALELFEQNPDLIGFWQKDTVS GEMGDRYF	139
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	KQIAKKYRNPNHAPQNLQEVMA LAKFEQDENLKGFWQPEIVDGVKGTKYY	141
<i>Leptolyngbya sp. PCC 6406</i>	KQIATKYRNPAPHAPDTLHSRIALAQFEQKPELMGFWEKATIDGQAGDRYY	139
<i>Arthrospira platensis</i>	KQIANKYRNPAPHAPDNLHAKMALAQFEQNRRLMGFWE PETIDGNSGFYY	141
<i>Spirulina subsalsa</i>	KQMASKYRNRHKKPDSQAVQALNRFSEDELLAFWQKDTVKGQEGMHYF	140
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	RQVALKYRNPNHAPRTALDVQALNQFDNNHHLQAFWQTD ----KEGVHYF	132
<i>Synechococcus sp. RS9917</i>	RQVASKYRNPDHAPIGSQETEVIDLFAKHPEINGLWEPASAEQAGVNY	147
<i>Cyanobium sp. PCC 7001</i>	RQVATKYRNPDHAPANAQEREVIDLFSRHPQIQGLWQPAAGQPAGVSYY	141
His 145		
<i>Filamentous cyanobacterium</i>	RRINVESSCLACHGAKNSRPDFVKANYPEDHAFDFQVGD LRGMYSVFVPE	189
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	RRINVESSCLACHGLKNERP SFVQQKYPQDLAYNFHVGDLRGMYSVFIPE	191
<i>Leptolyngbya sp. PCC 6406</i>	RRINVEASCLACHGQQNRRPQFVKEGYFQDLAYDFNVGDLRGMYAVFIPE	189
<i>Arthrospira platensis</i>	RRINVEATCLACHGSQNSRPQFVKDKYPQDLAFDFKEGDLRGMYAVFIPE	191
<i>Spirulina subsalsa</i>	RRINVEASCLACHGAKENRPKFVQEKYPQDLAFDFQVGD LRGMYSVFVPE	190
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	RRIDVQASCLACHGAKNRRPAFIQEKYPSDRAYGFRVGD LRGMYAVTIPQ	182
<i>Synechococcus sp. RS9917</i>	RRIDVQASCLACHGSRDSRPFAFIQEKYPNDRAFNFKVGD LRGMYAVYIPE	197
<i>Cyanobium sp. PCC 7001</i>	RRIDVQPSCLACHGSKDSRPFAFVKERYSQDRAFD FKPGDLRGMYAVFIPE	191
<i>Filamentous cyanobacterium</i>	-IQAGLKAALQ--	199
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	DAIEALKDN----	200
<i>Leptolyngbya sp. PCC 6406</i>	-VQQSIQAALQP-	200
<i>Arthrospira platensis</i>	-IQAALEAK----	199
<i>Spirulina subsalsa</i>	-VQQALQQALTE-	201
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	-IQQALQTSP---	191
<i>Synechococcus sp. RS9917</i>	-VQAALAAQSPMG	209
<i>Cyanobium sp. PCC 7001</i>	-VAQALEAATGG-	202

Figure 4.25 : Alignements de séquence de Tll0287 de plusieurs cyanobactéries. Les cystéines du motif CxxCH sont représentées en rouge, le 5^{ème} ligand axial, His 145, est entouré en bleu et le 6^{ème} ligand axial, Cys 68, est entouré en vert.

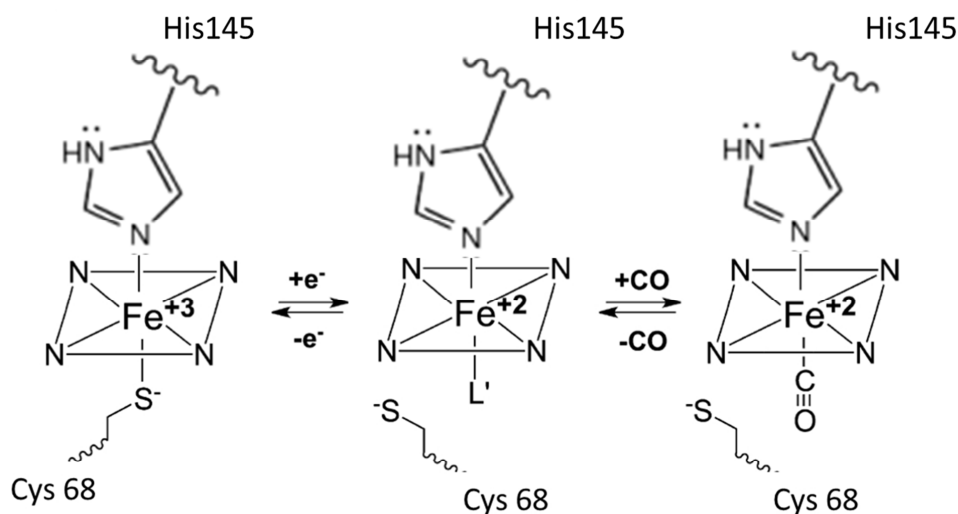


Figure 4.26 : Coordination de l'hème de Tll0287 en fonction de l'état redox. Après réduction de l'ion métallique, la cystéine (thiolate) est remplacée par un ligand L' que nous proposons être l'His 98. Une molécule de CO peut déplacer L' (de pH 5 à 7,6) ou se fixer directement (pH 10). Inspiré de (Smith, Pazicni et al. 2015).

4.4. Titrages redox de Tll0287 de *T. elongatus*

Afin de déterminer le potentiel redox moyen (E_0) de Tll0287, des expériences de titrage d'oxydoréduction par spectro-électrochimie ont été réalisées avec le Dr. Frauke Baymann au BIP à Marseille. Le montage expérimental et la méthode utilisée sont décrits dans le paragraphe 2.9.a du chapitre matériels et méthodes.

* Deux potentiels redox moyens de Tll0287 à pH 10

Les spectres d'absorption électroniques de Tll0287 sont enregistrés lorsque différents potentiels électriques sont imposés dans la cellule d'électrochimie. Les variations d'absorbance (Figure 4.27) correspondent à la différence : (spectre réduit à -422 mV) – (spectre mesuré). Les absorbances à 416 et 440 nm ont été déterminées et leur différence a été calculé. Le choix de ces longueurs d'onde a été basé sur les différences d'absorption entre les formes réduite et oxydée qui sont maximales à ces deux longueurs d'ondes. Nous avons ensuite tracé la variation de cette variation d'absorbance en fonction du potentiel imposé. La courbe expérimentale a été simulée à l'aide de l'équation de Nernst avec un nombre d'électron échangé égale à 1 ($n=1$) (Figure 4.28).

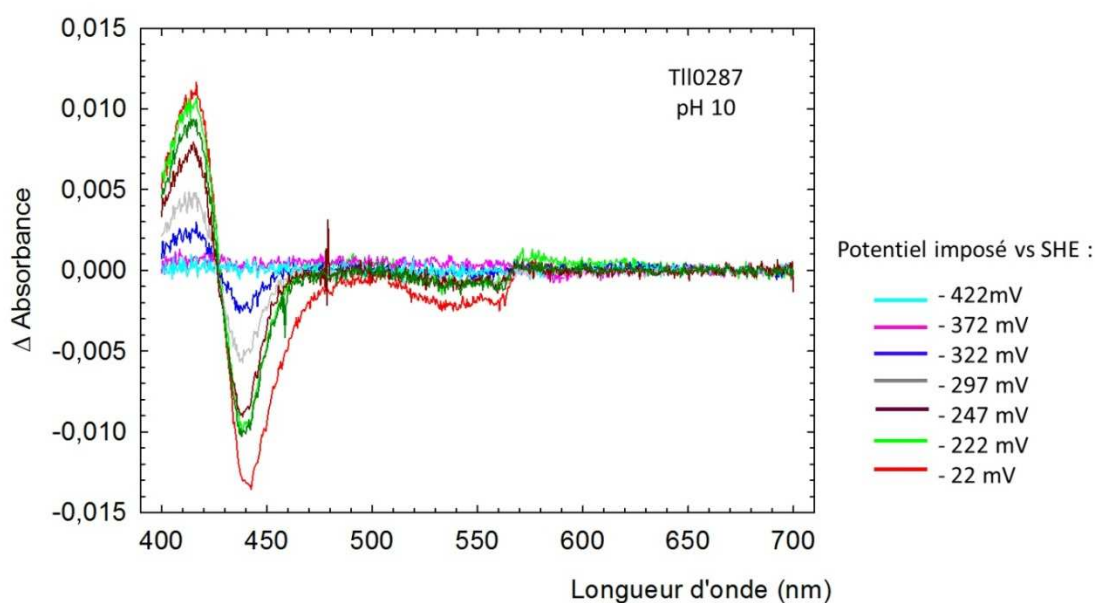


Figure 4.27 : Spectres de différence obtenus lors du titrage redox de TII0287 de *T. elongatus* à pH 10.

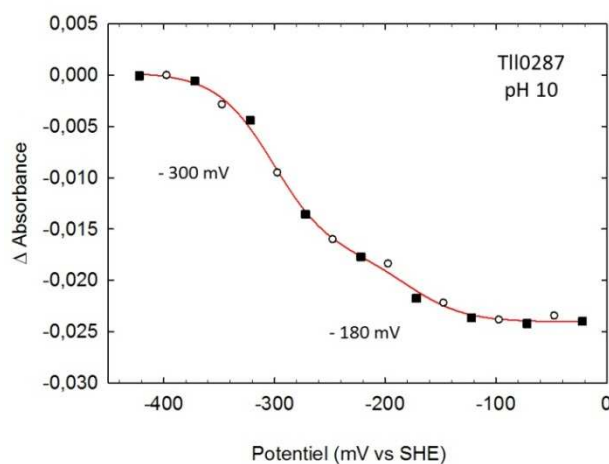


Figure 4.28 : Titrage redox de TII0287 de *T. elongatus* à pH 10 dans les sens de la réduction (carrés noirs) et de l'oxydation (ronds blancs). Les points expérimentaux correspondent à la différence des absorbances entre 416 et 440 nm. Ils sont ajustés avec la somme de deux courbes de Nernst (en rouge).

Sur la courbe de titrage (Figure 4.28), les points dans le sens de l'oxydation et de la réduction sont bien ajustés avec la courbe de Nernst indiquant que le phénomène d'oxydoréduction de TII0287 à pH 10 est réversible. La courbe présente 2 vagues. Deux potentiels redox moyens ont été déterminés : $E_0 = (-300 \text{ mV})$ et $E_0' = (-180 \text{ mV})$. L'existence de deux potentiels redox moyens suggèrent la présence de 2 types d'hèmes.

** Titrage redox de Tll0287 à pH 5

Les expériences suivantes ont été réalisées à pH 5, pH qui est le proche du pH physiologique à l'intérieur du lumen des thylakoïdes. A la fin des expériences, la forme des spectres de Tll0287 permet de dire que le cytochrome n'a pas été dénaturé à pH 5 lors de l'expérience.

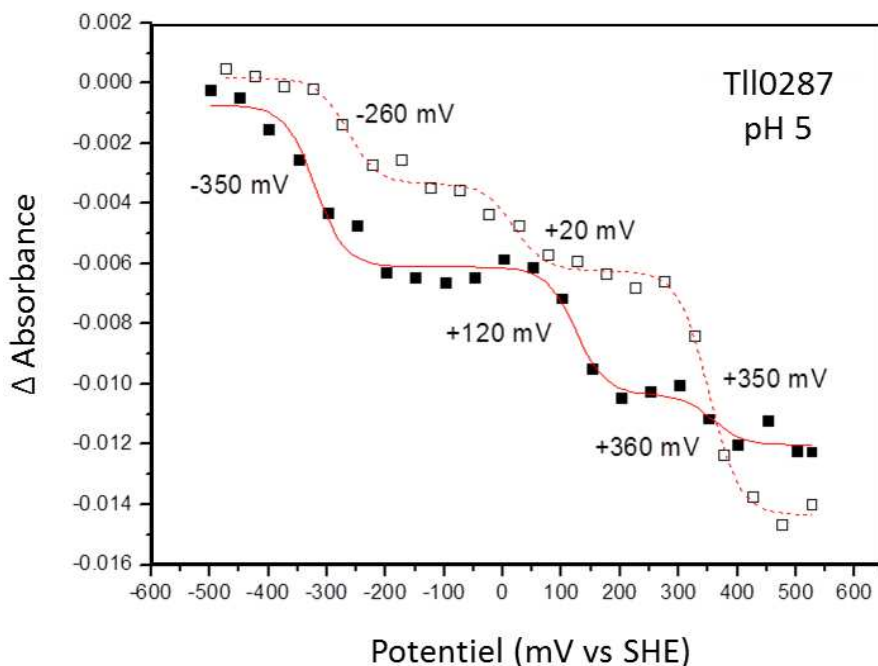


Figure 4.29 : Titrage redox de Tll0287 à pH 5. Variation de la différence d'absorption en fonction du potentiel imposé dans le sens de la réduction (carrés noirs) et dans le sens de l'oxydation (carrés blancs). Les points expérimentaux correspondent à la différence des absorbances entre 403 et 425 nm. Ils sont ajustés avec l'équation de Nernst dans le sens de la réduction (trait plein rouge) et dans le sens de l'oxydation (trait pointillé rouge).

Le phénomène d'oxydo-réduction de Tll0287 à pH 5 n'est pas réversible, contrairement à pH 10. La courbe présente trois vagues dans le sens de la réduction et de l'oxydation. Trois potentiels redox moyens ont été déterminés dans le sens de la réduction : (+360 mV), (+120 mV) et (-350 mV) et dans le sens de l'oxydation : (+350 mV), (+20 mV) et (-260 mV). La non réversibilité de la réaction pourrait être due à un changement de conformation irréversible ou à une réversibilité de conformation très lente de la protéine.

4.5. Structure cristallographique de Tll0287

Les données de la structure cristallographique de Tll0287 obtenues en collaboration avec l'équipe du Dr. J-R. Shen (Motomura, Suga, Sugiura, Lai, Boussac, Shen) ont été présentées

pour la première fois dans un poster en décembre 2014 lors d'une réunion au Japon. Ces données n'ont pas encore été publiées. La protéine Tll0287 à partir de laquelle les cristaux ont été obtenus a été purifiée au laboratoire par le Dr. A. Boussac. La résolution de la structure cristallographique obtenue est de 2 Å et a permis de déterminer le 6^{ème} ligand axial du fer hémique, il s'agit d'une cystéine en position 68 (Figure 4.30).

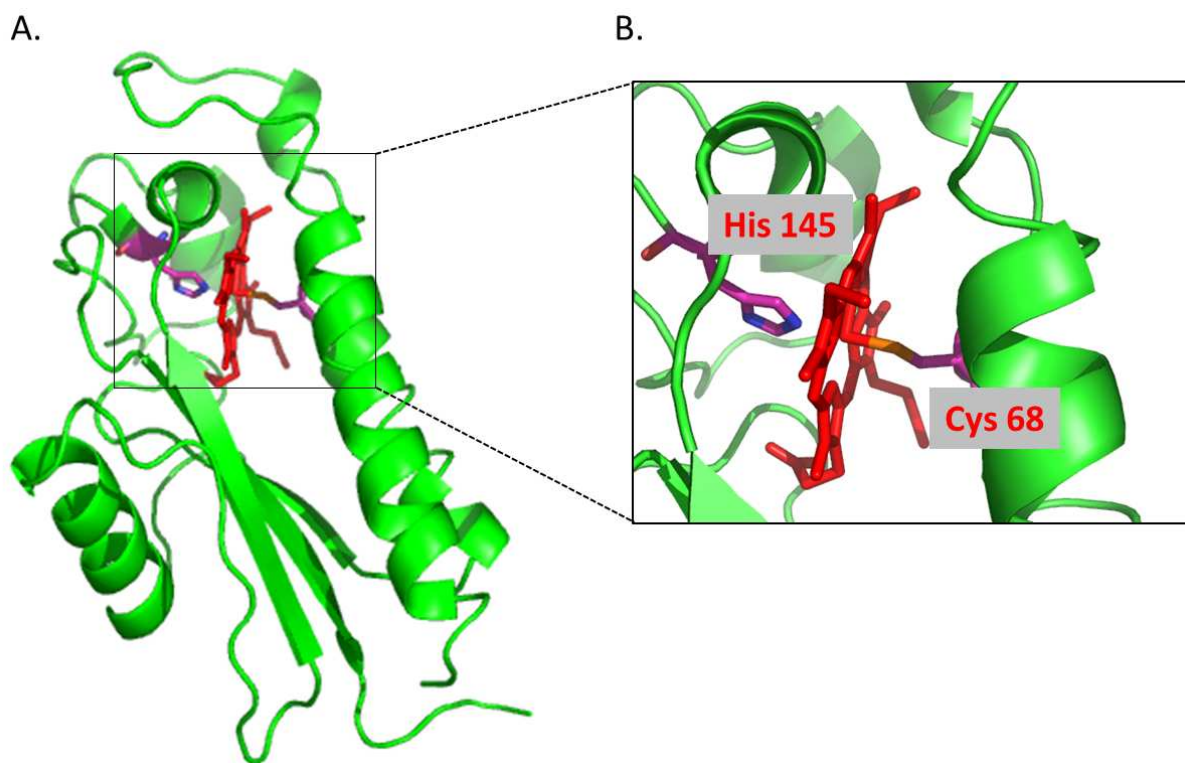


Figure 4.30 : Structure cristallographique de Tll0287 (en vert) avec son hème (en rouge). Agrandissement sur les ligands axiaux du fer hémique (B). Les squelettes carbonés des 5^{ème} et 6^{ème} ligands axiaux du fer hémique (His 145 / Cys 68) sont représentés en rose, les atomes d'azote en bleu, les atomes d'oxygène en rouge et l'atome de soufre en orange.

Les ligands axiaux, cystéine et histidine, sont conservés dans les séquences des cyanobactéries comme le montre les alignements de séquence (Figure 4.24). La structure de Tll0287 ne ressemble pas à la structure connue d'autres cytochromes de type c de *T. elongatus* comme le Cyt c₆, le Cyt c₅₅₀ ou PsbV2 (Figure 4.31) contrairement à ce qui pouvait être attendu.

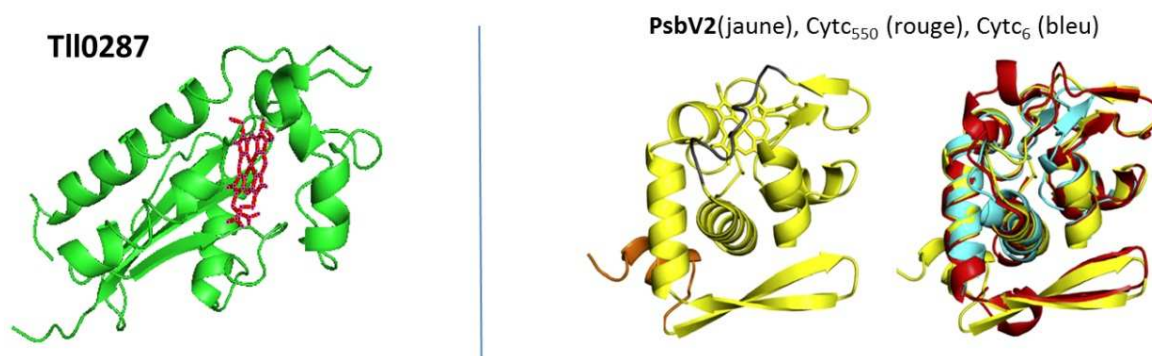


Figure 4.31 : Comparaison de la structure cristallographique de Tll0287 avec celles d'autres cytochromes de type c de *T. elongatus*.

4.6. Hypothèse sur la fonction de Tll0287

La structure cristallographique de Tll0287 n'était pas encore disponible lorsque j'ai commencé à réfléchir à sa fonction. Dans un premier temps, des protéines de séquence primaire proche de Tll0287 dont la fonction était connue ont été recherchées. Avec un alignement de séquences peptidiques avec l'outil Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) du NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>], aucune des protéines trouvées n'avaient été étudiées et toutes étaient annotées comme des « protéines hypothétiques ». J'ai donc décidé de modéliser la structure de Tll0287 pour rechercher des protéines dans la *protein data bank* (PDB) dont la structure serait similaire à celle prédite pour Tll0287. Différentes modélisations moléculaires de Tll0287 ont été réalisées avec plusieurs logiciels : Phyre² développé à l'*Imperial College of London* [<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>] (Kelley and Sternberg 2009) ; Swiss MODEL développé à l'Université de Bâle en Suisse [<http://swissmodel.expasy.org>] (Guex and Peitsch 1997; Schwede, Kopp et al. 2003; Arnold, Bordoli et al. 2006; Kiefer, Arnold et al. 2009) et i-TASSER développé à l'Université du Michigan aux Etats-Unis [<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>] (Zhang 2008; Roy, Kucukural et al.; Yang, Yan et al.). Les trois logiciels utilisés ont proposé les deux mêmes protéines. Il s'agit de deux protéines de signalisation de *Geobacter sulfurreducens* : GSU0582 (code pdb. 3B47) et GSU0935 (code pdb. 3B42). Les structures et la fonction de ces deux protéines ont été bien décrites (Londer, Dementieva et al. 2006; Pokkuluri, Pessanha et al. 2008; Silva, Valente et al. 2014). GSU0582 et GSU0935 sont deux protéines avec des domaines senseurs. Disposant ensuite des coordonnées de la structure cristallographique expérimentale de Tll0287, celle-ci a été comparée à celle de la chaîne (b) de la protéine GSU0935 (code pdb 3B42) (Figure 4.32).

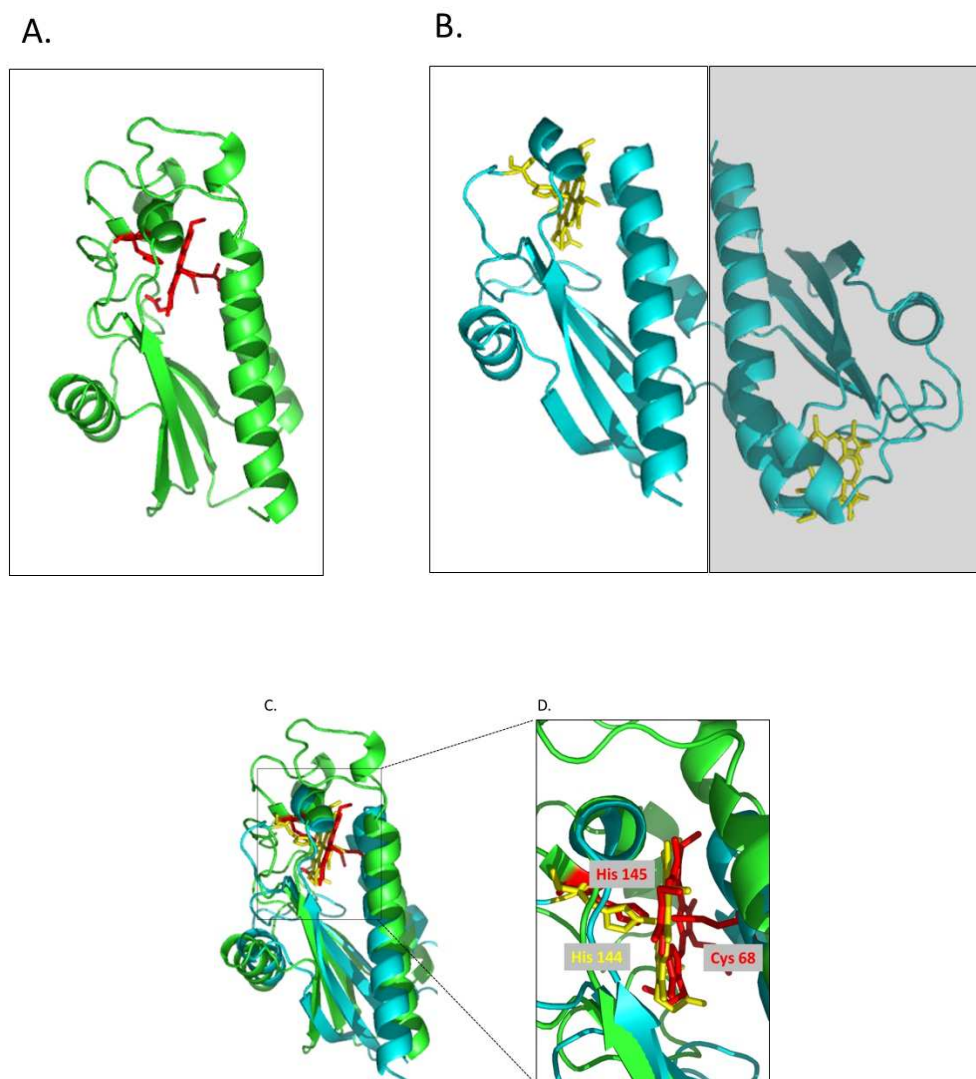


Figure 4.32 : Structures cristallographiques (A) de Tll0287 en vert avec son hème en rouge et (B) de la chaîne (b) de GSU0935 en bleu cyan avec son hème en jaune. Zoom sur les ligands axiaux de l'hème (D). Le 6^{ème} ligand de l'hème de la chaîne b de GSU0935 est une molécule d'eau non représentée.

Les structures de Tll0287 et de GSU0935 ne se superposent pas complètement, mais une forte similarité de structure est observable. Le nombre d'hélices et de feuillets sont identiques et leurs localisations sont très proches. Les deux hèmes se superposent aussi dans la même région. Il y a cependant une boucle supplémentaire au-dessus de l'hème chez Tll0287 (Figure 4.32). L'équipe de Pokkuluri et al. a été la première à mettre en évidence l'existence d'une nouvelle famille de protéines à laquelle appartiennent GSU0935 et GSU0582. La structure des domaines senseurs périplasmiques des protéines GSU0582 et GSU0935 montre un hème de type c lié de façon covalente et une nouvelle façon de former des domaines de type PAS (décrit ci-dessous) avec un entrelacement de deux hélices α de chaque monomère (Pokkuluri, Pessanha et al. 2008). Les autres domaines senseurs avec un domaine PAS connus jusqu'à présent contenaient un hème de type b et

étaient localisés dans le périplasma. Le domaine PAS (pour Per : period circadian protein, Arnt : aryl hydrocarbaryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein et Sim : single-minded protein, qui sont les trois premières protéines découvertes possédant ce domaine) est présent chez un grand nombre de protéines de signalisation qui fonctionnent comme des senseurs. Un grand nombre de protéines avec un domaine PAS possède un hème qui permet de détecter le signal (Taylor and Zhulin 1999). Dans la structure cristallographique de GSU0935, le fer hémique de la chaîne (a) est hexacoordonné avec l'acide aminé His 144 de la chaîne (a) et l'acide aminé Met 260 de la chaîne (b), alors que celui de la chaîne (b) est penta-coordonné avec l'acide aminé His 144 de la chaîne (b) et une molécule d'eau. Tll0287 n'a pas été cristallisé sous forme de dimère, contrairement à GSU0935. La structure cristallographique du monomère de Tll0287 ne laisse pas suggérer que Tll0287 puisse avoir un repliement en dimère entrelacé comme décrit pour GSU0935. Cependant la similarité de structure de Tll0287 avec GSU 0935 suggère que Tll0287 pourrait aussi avoir un rôle de protéine senseur.

Pokkuluri et al. ont montré que GSU0935 est capable de fixer une molécule de CO (Pokkuluri, Pessanha et al. 2008). Une réduction de Tll0287 en présence de CO à pH 7,6 a été effectuée et son spectre d'absorption électronique a été enregistré (Figure 4.33). Quand le spectre de Tll0287 passe de la forme oxydée à la forme réduite en présence de CO à pH 7.6, le maximum dans la bande de Soret se déplace de 415 nm à 412 nm et double de valeur. Ce changement de spectre indique qu'une molécule de CO s'est fixée sur le fer ferreux de Tll0287. Une bande de Soret à 412 nm est en effet caractéristique d'une coordination His/CO (Figure 4.33). Une coordination Cys/CO donnerait une bande de Soret beaucoup plus déplacée vers le rouge.

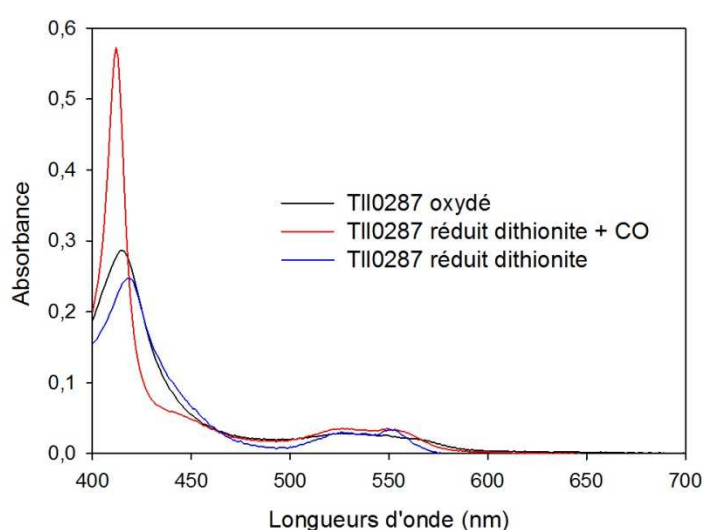


Figure 4.33 : Spectres d'absorption visible de Tll0287 à pH 7.6 oxydé (noir), réduit au dithionite (bleu) et réduit au dithionite en présence de CO (rouge).

4.7. Discussion

Tll0287 présente le motif CXXCH caractéristique des cytochromes de type c. A notre connaissance, le ligand cystéine de l'hème c est peu décrit. Dans un contexte plus général, un grand nombre d'hémoprotéines contenant notamment des hèmes b et ayant une cystéine comme ligand axial de l'hème ont été décrites. La récente revue de Smith *et al.* (2015) a répertorié et classifié ces différentes protéines à hème thiolate en deux types en fonction de leurs caractéristiques spectroscopiques et selon leur capacité à changer de ligand axial dans leurs formes réduites (type 1 : pas de changement, type 2 : changement de ligands) (Smith, Pazicni et al. 2015). Les hèmes thiolate de type 2 sont des centres senseurs de petites molécules ou de transport. Le ligand cystéine (thiolate) est labile, ce qui est fondamental pour sa fonction. Après réduction de l'hème, le ligand cystéine est protoné, puis est remplacé par un ligand de la protéine ou un ligand exogène. La poche de l'hème est flexible permettant facilement un changement de ligand. La nature labile de la cystéine (thiol) est exploitée par l'hème senseur pour assurer la cascade de signal transmise de l'hème jusqu'à la région active de la protéine (Smith, Pazicni et al. 2015).

Certaines propriétés spectroscopiques décrites dans le chapitre 4 permettent de classer Tll0287 comme une protéine à hème thiolate de type 2. En effet, les spectres de résonance Raman montrent que l'hème réduit présente un changement de ligand. Les spectres de RR montrent aussi qu'à différents pH, il y a deux formes d'hème à l'état oxydé comme à l'état réduit : l'une étant 6cLS et l'autre étant 5c ou 6cHS. Les spectres d'absorption électronique montrent aussi ces formes de Tll0287 à ces mêmes pH. Ces données spectroscopiques suggèrent un équilibre conformationnel de Tll0287 en solution à 20° C. En revanche la structure cristallographique présente un hème hexacoordonné uniquement. Il se pourrait que la formation de cristaux n'ait sélectionné qu'un seul type de coordination. Le modèle suivant d'oxydo-réduction de l'hème peut être proposé pour Tll0287 (Figure 4.34).

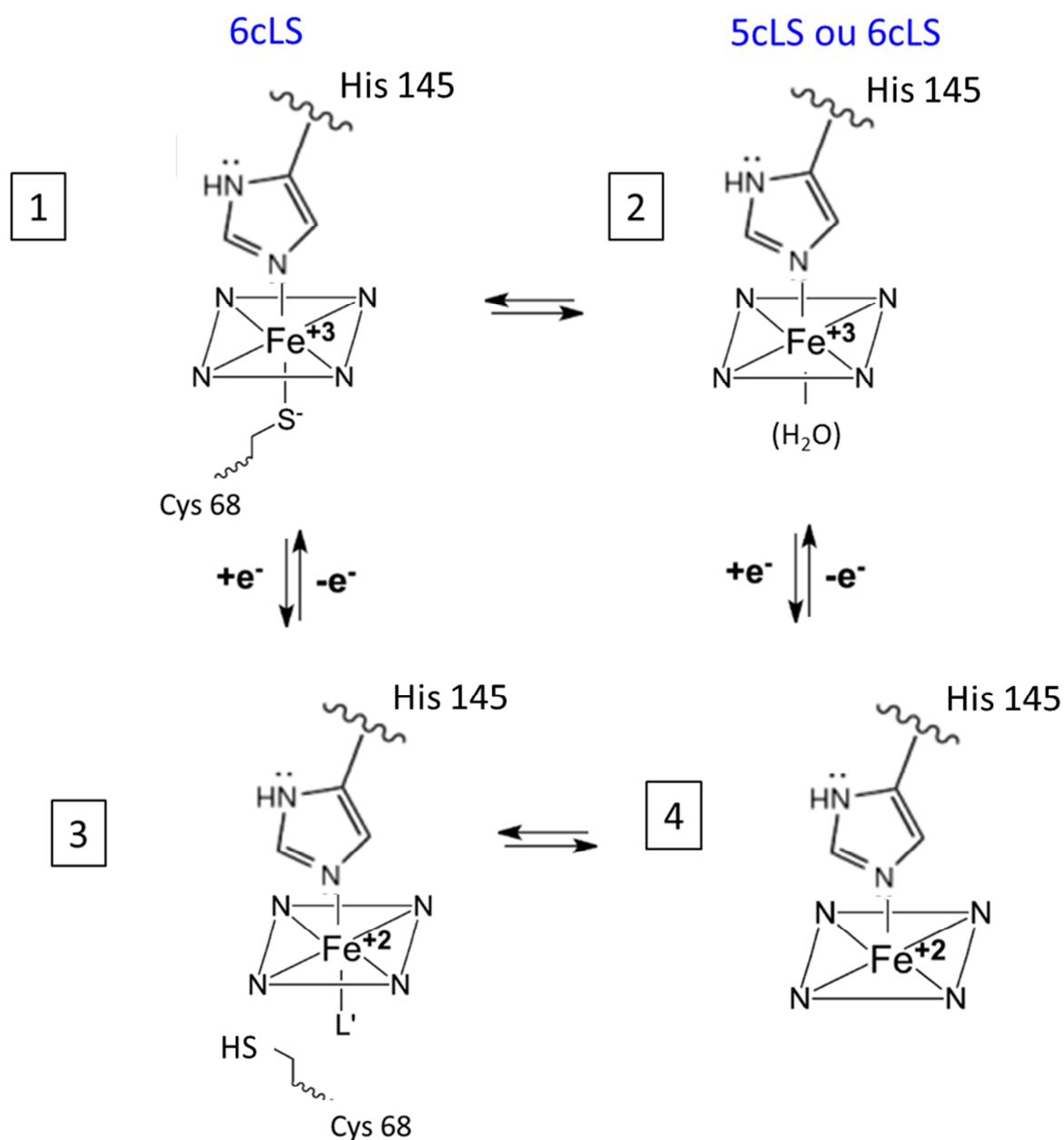


Figure 4.34 : Modèle de l'oxydo-réduction des 2 formes d'hèmes de Tll0287 (hexa- et pentacoordonnées). « L' » représente un autre ligand que la cystéine 68.

A ma connaissance, c'est la première protéine de cyanobactéries avec un hème de type c qui peut être répertoriée dans ce groupe.

Le titrage redox de Tll0287 montre une réaction redox réversible avec deux potentiels redox moyen à pH 10 (Figure 4.27). Selon le modèle de la figure 4.34, le comportement redox de Tll0287 peut être complexe. Les 4 formes possibles de Tll0287 pourraient expliquer l'existence des 2 potentiels observés. Le fait que le ligand axial cystéine soit labile quand il est déprotoné suggère que le ligand qui le remplace puisse être un ligand exogène. En accord

avec cette hypothèse, il a été montré que Tll0287 réduit pouvait fixer une molécule de CO comme décrit dans la figure 4.35.

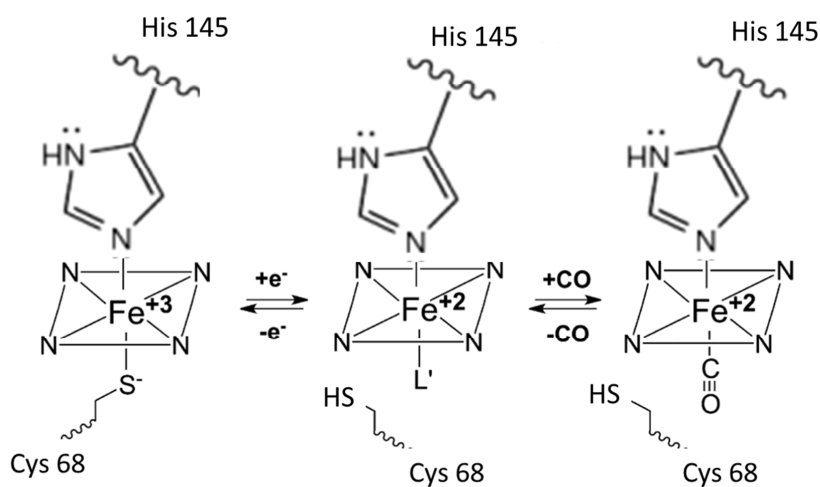


Figure 4.35 : Coordination de l'hème de Tll0287 en fonction de l'état redox. Après réduction la cystéine (thiolate) est remplacée par un ligand L'. Une molécule de CO apportée lors de l'expérience se fixe ensuite à la place du ligand L'. Inspiré de (Smith, Pazicni et al. 2015).

L'appartenance de Tll0287 au groupe des protéines comportant un hème thiolate de type 2 suggère que Tll0287 soit une protéine senseur. La similarité de la structure cristallographique de Tll0287 avec le domaine senseur GSU0935 renforce cette hypothèse (voir la suite de la discussion partie 7).

5. Caractérisation du cytochrome c PsbV2 de *T. elongatus*

5.1. Introduction	155
5.2. Expression homologue de PsbV2 de <i>T. elongatus</i>	155
5.3. Structure cristallographique de PsbV2	156
5.4. Potentiel redox très bas de PsbV2	159
5.5. Discussions et perspectives	169

5.1. Introduction

La protéine PsbV2 de *T. elongatus* est constituée de 175 acides aminés. Un site de clivage du peptide signal est prédit par la séquence en acides aminés. Un site de fixation d'un hème c caractéristique avec le motif CXXCH est présent dans la séquence, prédisant un hème lié de façon covalente à la protéine (Figure 5.1).

```
MYQPHFWQRSIGWLCGGLLILLGWTIAPATALAAAGVDNYVIQYLKVTDTVELPVNDRGETKTFTAVDLTRG
KRLFEENCKNCHVGGSTLPNPLVSLKDLKGATPPRDTIASLVAFQRSPKSYDGSEESYSCRRVSEDWLTTEQL
ETLAAFILRAAAVAPGWGVESFPDSAP
```

Figure 5.1 : Séquence en acides aminés de la protéine PsbV2 avec le site de clivage prédit du peptide signal situé après la séquence ALA (en jaune) et le motif CXXCH (en bleu).

L'existence du produit du gène *psbV2* avait déjà été soupçonnée par Katoh et al. en 2001 (Katoh, Itoh et al. 2001). Les auteurs avaient appelé le produit supposé du gène *psbV2* : le « cytochrome c_{550} -like » car dans le génome de *T. elongatus*, le gène *psbV2* (au locus *tll1284*) est localisé en amont du gène *psbV1* (au locus *tll1285*) codant le cytochrome c_{550} . Le produit du gène *psbV2* ne sera pas appelé « cytochrome c_{550} -like » mais simplement PsbV2 car PsbV2 présente un certain nombre de différences comparé au Cyt c_{550} . Deux ans plus tard, en 2003, l'existence de PsbV2 est mise en évidence au laboratoire par le Dr. A. Boussac (Kerfeld, Sawaya et al. 2003). La protéine PsbV2 a été co-purifiée avec le Cyt c_{550} . Il a été montré que les deux protéines, le Cyt c_{550} et PsbV2, avaient des signatures très proches mais cependant différentes en RPE et en spectroscopie UV-visible et de résonance Raman. Les auteurs ont aussi montré que PsbV2 se trouve en très faible quantité dans les protéines solubles de *T. elongatus* et qu'il représente moins de 1 % de la quantité de Cyt c_{550} .

Un des objectifs de mon travail de thèse a été de caractériser PsbV2. Pour cela, un système de surexpression a été mis en place pour produire suffisamment de protéine pour la caractériser avec différentes techniques spectroscopiques. PsbV2 a été dans un premier temps surexprimé de façon hétérologue chez *E. coli* en plaçant le gène *psbV2* sous le contrôle d'un promoteur fort en présence des facteurs de maturation des cytochromes c (pour les détails, voir paragraphe 2.3.d du chapitre matériel et méthodes). Ce travail n'a pas permis d'obtenir de cytochrome dans sa forme mature.

5.2. Expression homologue de PsbV2 de *T. elongatus* chez *E. coli*

Dans un deuxième temps surexprimé PsbV2 a été surexprimé de façon homologue chez *T. elongatus* en plaçant le gène *psbV2* sous contrôle du promoteur fort de la Rubisco. Cette approche permet de s'affranchir du problème de maturation du cytochrome rencontré en système hétérologue chez *E. coli*. Les constructions de biologie moléculaire ont été réalisées lors d'un stage de 5 mois dans le laboratoire de Miwa Sugiura au Japon. La stratégie de biologie moléculaire utilisée a été de cloner le gène *psbV2* sous contrôle d'un promoteur de la ribulose-bisphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco) qui est une des protéines solubles les plus fortement exprimées chez les cyanobactéries (Zhou, Zhang et al. 2014) (pour les détails, voir le paragraphe 2.3.e du chapitre matériels et méthodes). Après transformation et recombinaison génétique, les clones ont été sélectionnés sur milieu sélectif. 138 colonies ont été obtenues sur boîte de Pétri. Quelques colonies ont été repiquées sur une deuxième boîte pour être amplifiées (Figure 5.2).

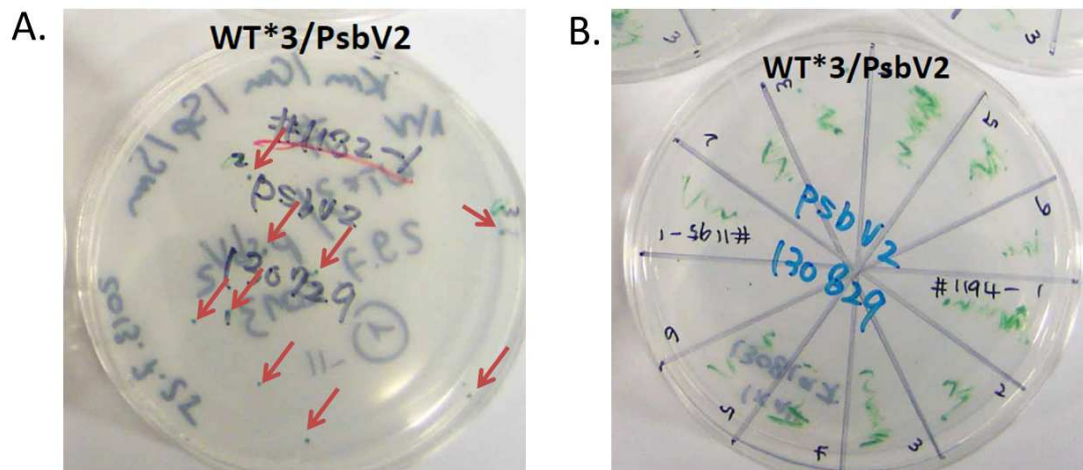


Figure 5.2 : Sélection des mutants de surexpression de PsbV2. Colonies de *T. elongatus* sur milieu sélectif obtenues après transformation (A) et repiquage (B). Les flèches rouges indiquent les colonies qui ont été repiquées.

L'ADN génomique des cellules a ensuite été analysé. Une réaction de PCR est effectuée directement sur plusieurs clones avec des amorces spécifiques pour vérifier l'insertion dans l'ADN génomique de la cassette contenant le gène *psbV2*. Si la cassette est correctement insérée, un fragment amplifié unique de 3080 paires de bases (pb) doit être obtenu. Dans le cas contraire, le gène de résistance au chloramphénicol présent initialement dans la région d'insertion persiste et conduit à l'obtention d'un second fragment d'amplification à 1300 pb. Le mutant WT*3 est utilisé comme témoin, il ne contient pas de plasmide avec la cassette décrite précédemment, il ne présente donc que le fragment d'amplification à 1300 pb.

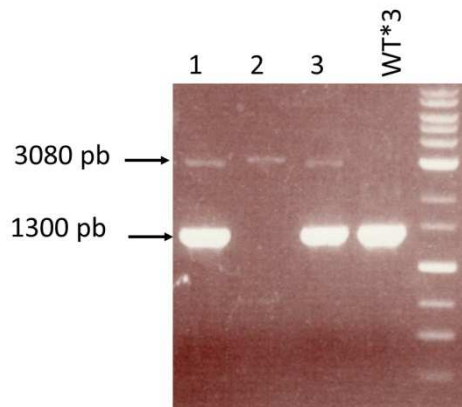


Figure 5.3 : Gel d'agarose 1% (p/v) pour la vérification de la taille des produits PCR. Les produits de PCR des clone n°1-2-3 sont déposés respectivement dans les pistes 1, 2 et 3 du gel.

Seul le clone n°2 présente un fragment unique à 3080 pb. En revanche, les clones n°1 et n°3 présentent les deux bandes à 3080 pb et à 1300 pb indiquant qu'il n'y a pas eu insertion dans l'ADN génomique. Le mutant n°2 sélectionné est viable en milieu liquide et surexprime la protéine PsbV2 comme attendu indiquant que cette surexpression n'est pas toxique pour la cyanobactérie. Une quantité suffisante de cytochrome PsbV2 a été obtenue avec cette approche pour commencer sa caractérisation.

5.3. Structure cristallographique de PsbV2

Avant que le système de surexpression homologue soit mis au point, PsbV2 a été directement purifié au laboratoire à partir de la source native, c'est-à-dire des protéines de la fraction soluble de *T. elongatus* récupérées lors des préparations des membranes effectuées pour différentes études du photosystème II. Lors d'une telle purification, il a été possible de récupérer 730 µg de cytochrome PsbV2 mature à partir de 320 litres de culture de cyanobactéries (correspondant à vingt expériences de préparations de photosystème II). Une quantité suffisante de PsbV2 a pu être obtenue dans notre laboratoire pour mener à terme des expériences de cristallographie en collaboration avec l'équipe de cristallographes du Dr. JR. Shen (Université Okayama, Japon). La structure de PsbV2 a ainsi été obtenue à l'échelle atomique à une résolution de 1.5 Å. Ces résultats ont été publiés (code d'accès 4LJI dans la *Protein Data Bank*, 1.5 Å (Suga, Lai et al. 2013). La superposition de la structure de PsbV2 avec celle du Cyt c_{550} (Figure 5.4C) montre des ressemblances entre les structures de ces deux cytochromes. Elle présente cependant trois différences majeures.

PsbV2 possède un domaine N-terminal plus long (représenté en orange sur la Figure 5.4A) précédant les deux feuillets bêta, comparé à celui du Cyt c_{550} (représenté en vert sur la Figure 5.4B).

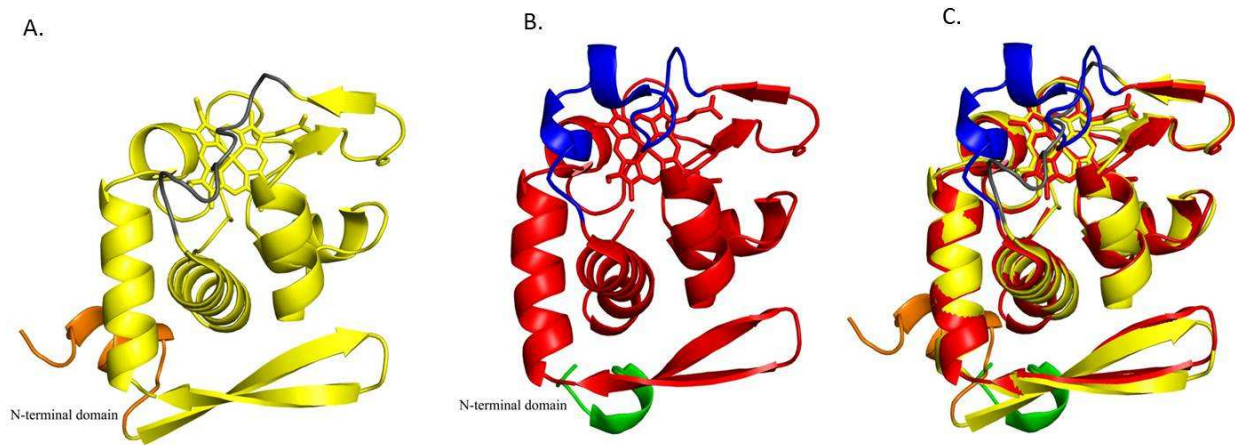


Figure 5.4 : Structure du cytochrome PsbV2 en jaune (A), du Cyt c_{550} en rouge (B) et superposition des structures des cytochromes PsbV2 et du Cyt c_{550} (C). Pour le Cyt c_{550} , le motif DIXPMRN est représenté en bleu et la partie N-terminale en vert.

Le motif DIXPMRN (où X représente un acide aminé non conservé) représenté en bleu (Figure 5.4B) se trouve dans l'environnement de l'hème du Cyt c_{550} . Ce motif est bien conservé dans la séquence du Cyt c_{550} de plusieurs cyanobactéries comme *T. elongatus*, *Arthrospira maxima* et *Synechocystis 6803* (Kerfeld, Sawaya et al. 2003) et n'existe pas dans la séquence de PsbV2 (Figure 5.5).

	1				50
C550 <i>T.elongatus</i>	AELTPEVLTV	PLNSEGKTTT	LTEKQYLEGK	RLFQYACASC	HVGGITKTNP
C550 <i>A.maxima</i>	LTEELRTF	PINAQGDVAV	LSLKEIKKGQ	QVFNAACAQC	HALGVTRTNP
C550 <i>S.6803</i>	VELTESTRTI	PLDEAGGTTT	LTARQFTNGQ	KIFVDTCTQC	HLQGTKTKTN
PsbV2 <i>T.elongatus</i>	AAGVDNYVIQYLKVTDTVEL.	PVNDRGETKT	ETAVDLTRGK	RLFEENCKNC	HVGGSTLNP
	51				100
C550 <i>T.elongatus</i>	SLDLRTETLA	LATPPRDNIE	GLVDYMKNPT	TYDGEQEIAE	VHPSLRSA DI
C550 <i>A.maxima</i>	DVNLSPREALA	LATPPRDNIA	ALVDYIKNPT	TYDGFVEISE	LHPSLKSS DI
C550 <i>S.6803</i>	NVSLGLADLA	GAEPNRDNVL	ALVEFLKNPK	SYDGEDDYSE	LHPNISRE DI
PsbV2 <i>T.elongatus</i>	LVSLSLKDLK	GATPPRDITIA	SLVAFQSPK	SYDGSEE... SYSCRRVSE	
	101			137	
C550 <i>T.elongatus</i>	FPKMRN LTEK	DLVAIAGHIL	VEPKILGDKW	GGGKVYY	
C550 <i>A.maxima</i>	FPKMRN ISED	DLYNVAGYIL	LQPKVRGEQW	G	
C550 <i>S.6803</i>	YPEMRN YTED	DIFDVAGYTL	IAPKL.DERW	GGTIYF	
PsbV2 <i>T.elongatus</i>	W..... LTTE	QLETLAAFIL	RAAAV.APGW	GVESFPDSAP	

Figure 5.5 : Alignement de séquences de cytochromes c_{550} de trois cyanobactéries (*Thermosynechococcus elongatus*, *Arthrospira maxima*, *Synechocystis 6803*) avec PsbV2 de *T. elongatus*. Le motif DIXPMRN absent de la séquence de PsbV2 est entouré en rouge. Figure modifiée (Kerfeld, Sawaya et al. 2003).

La 3^{ème} différence majeure entre les deux cytochromes est la nature du 6^{ème} ligand axial de l'hème. La structure cristallographique a permis de déterminer le 6^{ème} ligand axial de l'hème de PsbV2 qui est une cystéine en position 101 (Figure 5.6) .

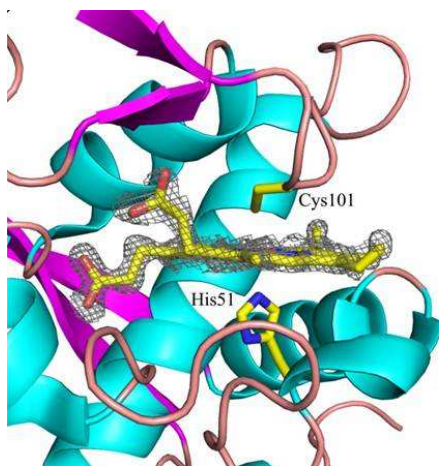


Figure 5.6 : Zoom de la structure de PsbV2 avec les 5^{ème} et 6^{ème} ligands axiaux (His 51 et Cys 101) (Suga, Lai et al. 2013).

Comme le montre les alignements de séquence de PsbV2, les 5^{ème} et 6^{ème} ligands axiaux, respectivement His 51 et Cys 101 sont très conservés chez plusieurs cyanobactéries (Figure 5.7). Plusieurs études concernant des cytochromes de type c ayant une cystéine comme 6^{ème} ligand axial de l'hème ont été publiées comme par exemple : DsrJ, impliqué dans le métabolisme du soufre (Grein, Venceslau et al. 2010); TsdA, une thiosulfate déshydrogénase, comportant un dihème de type c, de la bactérie pourpre *Allochromatium vinosum* et qui joue un rôle dans le métabolisme énergétique du soufre et utilise le ligand cystéine comme cofacteur catalytique (Grabarczyk, Chappell et al. 2015); SoxAX, homologue de TsdA, impliqué dans l'oxydation des thiosulfates (Bamford, Berks et al. 2002; Kilmartin, Maher et al. 2011); le cytochrome trihème attaché au centre réactionnel chez *Rhodovulum sulfidophiulum* (Alric, Tsukatani et al. 2004); GHP (pour *Green Heme Protein*), trouvé chez certaines proteobactéries (Van Driessche, Devreese et al. 2006); NaxLS trouvé dans une bactérie pouvant oxyder l'ammonium en anaérobie (nommé bactérie anammox) (Ukita, Fujii et al.).

* Titrages redox du cytochrome c_6 de *T. elongatus* à différents pH

Les mesures sur le cytochrome PsbV₂ s'annonçaient difficile car son potentiel redox était attendu très bas et son spectre réduit n'était pas connu. Le Cyt c_6 a été utilisé comme témoin afin de s'assurer que l'instrumentation utilisée pour le titrage redox était bien adaptée (voir paragraphe 2.9.b du chapitre matériels et méthodes). Le Cyt c_6 de *T. elongatus* est un bon témoin pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les spectres d'absorption oxydé et réduit de ce cytochrome sont bien connus, facilitant ainsi les expériences de titrage redox. De plus, son potentiel redox avait déjà été mesuré au laboratoire sur un autre type d'instrumentation et enfin les potentiels redox du Cyt c_6 d'autres cyanobactéries étaient déjà publiés (Cho, Wang et al. 1999; Bialek, Nelson et al. 2008; Bell, Xin et al. 2009). Plusieurs titrages redox du Cyt c_6 ont été réalisés à différents pH. Lorsque le cytochrome passe de sa forme réduite (Fe^{2+}) à sa forme oxydée (Fe^{3+}) ou vice et versa, les spectres d'absorption changent comme attendu. Les variations d'absorbance correspondant au (spectre réduit à +200 mV) – (spectre mesuré) sont enregistrés (Figure 5.8).

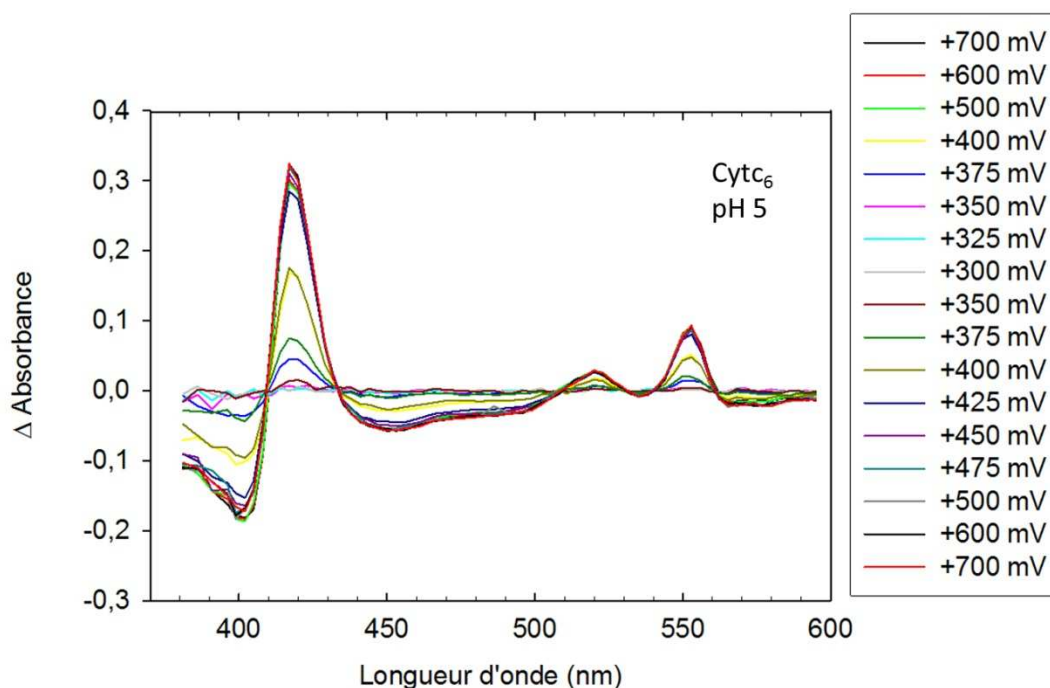


Figure 5.8 : Spectres de différence pendant le titrage redox du Cyt c_6 de *T. elongatus* à pH 5 (allant de +300 mV à +700 mV). La variation d'absorbance correspond à la différence entre (le spectre réduit à +200 mV) – (spectre mesuré à un potentiel imposé). Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre de type Joliot.

De la même façon, des spectres de différence ont été enregistrés à partir des mesures d'absorbance à pH 7,6 (Figure 5.9) et pH10 (Figure 5.10).

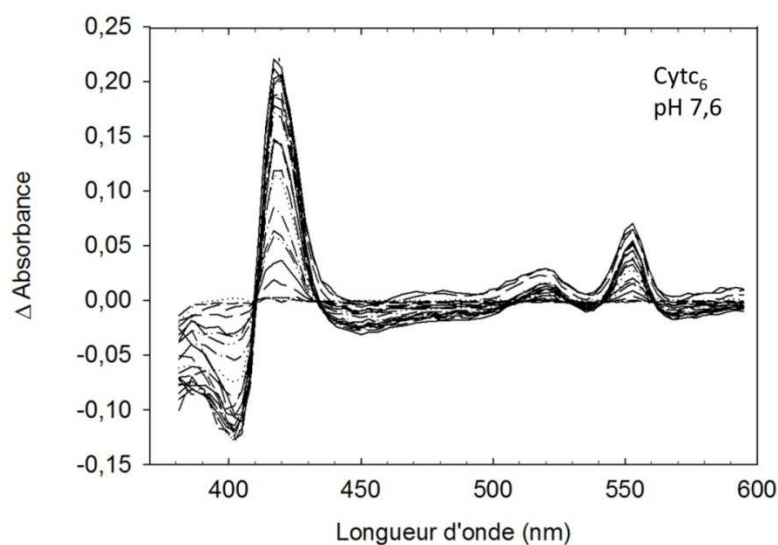


Figure 5.9 : Spectres de différence pendant le titrage redox du Cyt c_6 de *T. elongatus* à pH 7.6 (allant de 0 mV à +700 mV). La variation d'absorbance correspond à la différence entre (le spectre réduit à 0 mV) – (spectre mesuré à un potentiel imposé). Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre de type Joliot.

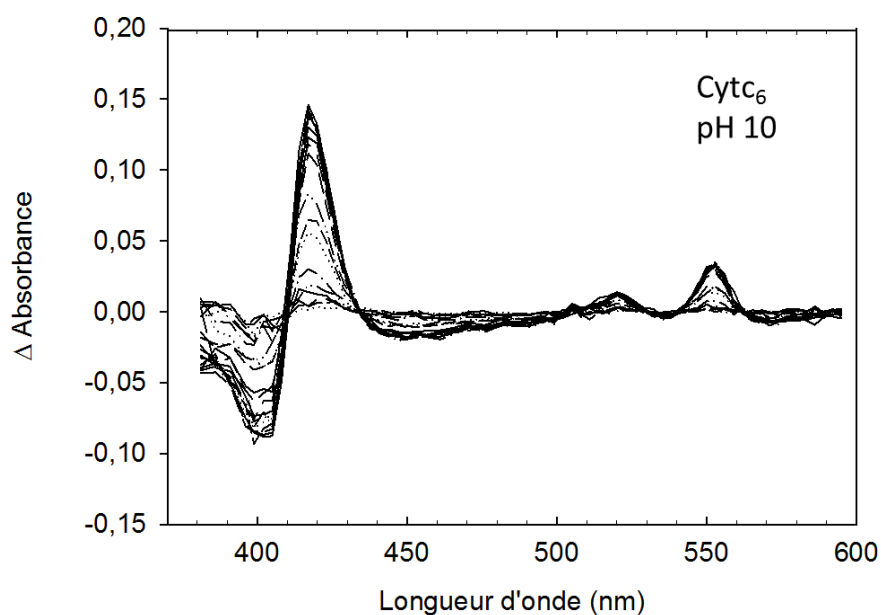


Figure 5.10 : Spectres de différence pendant le titrage redox du cytochrome c_6 de *T. elongatus* à pH 10 (allant de -150 mV à +600 mV). La variation d'absorbance correspond à la différence entre (le spectre réduit à -150 mV) – (spectre mesuré à un potentiel imposé). Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre de type Joliot.

Les changements d'absorption les plus importants se trouvant au niveau de la bande de Soret, les points expérimentaux pour chaque pH à deux longueurs d'onde dans la bande de Soret ont été extraits.

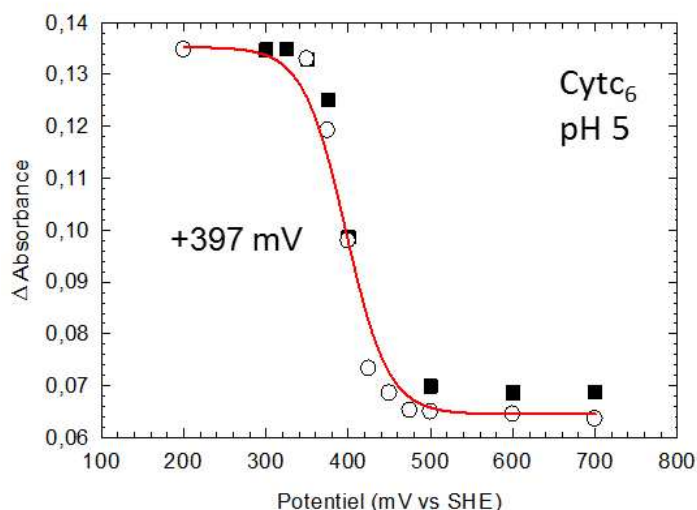


Figure 5.11 : Titrage redox du Cyt c₆ à pH 5 avec des points mesurés dans le sens de la réduction (carré noir) et dans le sens de l'oxydation (rond blanc) dans du tampon MES 2 mM à pH 5 avec du KCl à 100 mM. Les points expérimentaux correspondent à la différence des absorbances entre 417 nm et 431,3 nm. Ils sont ajustés avec une courbe de Nernst (trait rouge).

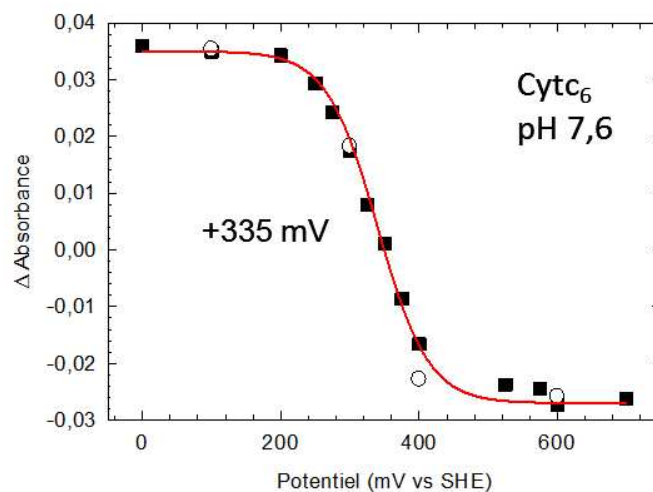


Figure 5.12 : Titrage redox du Cyt c₆ à pH 7,6 avec des points mesurés dans le sens de la réduction (carré noir) et dans le sens de l'oxydation (rond blanc) dans du tampon MOPS 2 mM à pH 7,6 avec du KCl à 100 mM. Les points expérimentaux correspondent à la différence des absorbances entre 417 nm et 408 nm. Ils sont ajustés avec une courbe de Nernst (trait rouge).

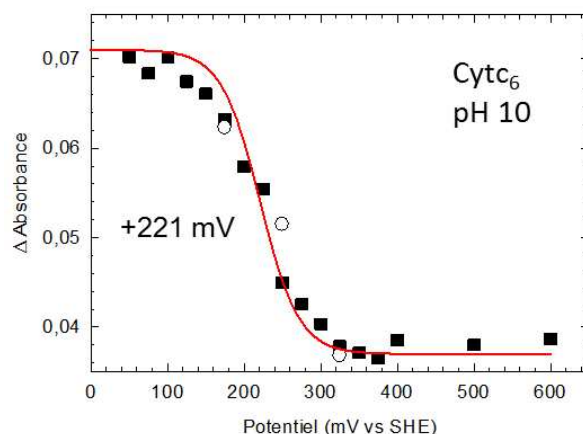


Figure 5.13 : titrage redox du Cyt c_6 à pH 10 avec des points mesurés dans le sens de la réduction (carré noir) et dans le sens de l'oxydation (rond blanc) dans du tampon CAPS 2mM à pH10, avec KCl 100 mM. Les points expérimentaux correspondent à la différence des absorbances entre 417 nm et 435 nm. Ils sont ajustés avec une courbe de Nernst (en rouge).

Pour les 3 pH (Figure 5.13 à 5.15), les points expérimentaux obtenus dans le sens de la réduction (carrés noirs) et dans le sens de l'oxydation (ronds blancs) se situent sur la courbe de Nernst correspondante, indiquant que le système est réversible. Les potentiels redox trouvés expérimentalement sont (+397 mV) à pH 5, (+335 mV) à pH 7,6 et (+221 mV) à pH 10. Ils sont très proches de ceux mesurés précédemment au laboratoire et de ceux publiés sur des Cyt c_6 d'autres cyanobactéries (Cho, Wang et al. 1999; Bialek, Nelson et al. 2008; Bell, Xin et al. 2009). Ces résultats ont permis de montrer que l'instrumentation utilisée était bien adaptée pour mesurer le potentiel redox d'un cytochrome de type c, ce qui a permis de poursuivre les expériences sur le cytochrome PsbV2.

**** Titrage redox de PsbV2 de *T. elongatus* à pH5**

Dans la première expérience, PsbV2 a été placé dans de l'eau en absence de médiateurs afin de voir si il pouvait être réduit dans le système. Les changements d'absorption des spectres d'absorption entre (+200 mV) et (-810 mV) ont été enregistrés (Figure 5.16). En dessous de (-820 mV) un fort courant a été généré dans la cellule, indiquant que l'électrolyse de l'eau a lieu.

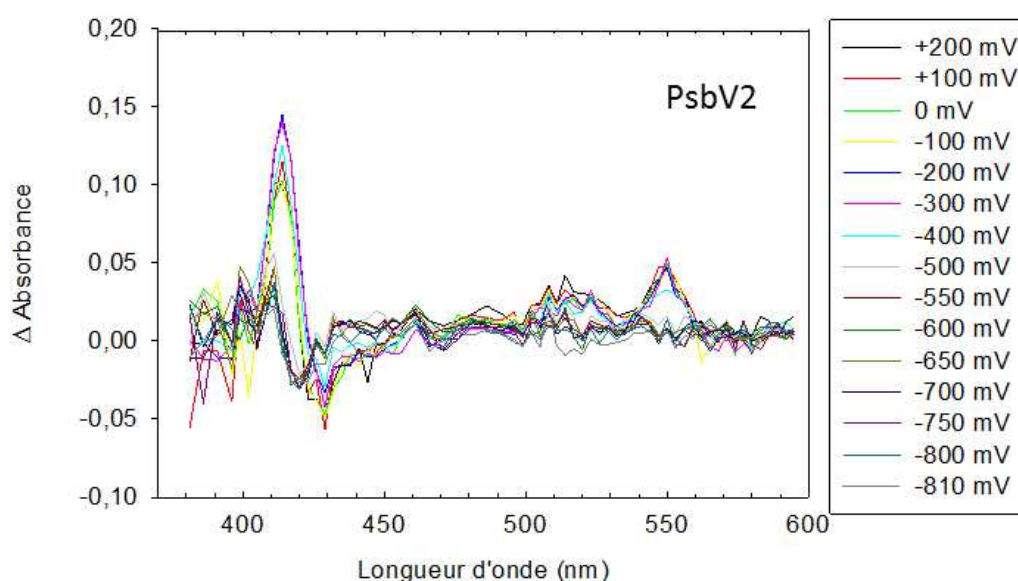


Figure 5.16 : Spectres de différence pendant le titrage redox de PsbV2 de *T. elongatus* (pour des potentiels allant de -810 mV à +200 mV). La différence d'absorbance correspond à la différence entre (spectre réduit à -820 mV) – (spectre mesuré à un potentiel imposé). Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre de type Joliot.

A (-820 mV), le spectre d'absorption de PsbV2 présente un maximum à 415 nm dans la bande de Soret et deux pics au niveau de la bande α et β , indiquant que le cytochrome n'a pas été dénaturé au cours de l'expérience. L'augmentation des deux pics α et β indiquent une oxydation du cytochrome. Les différences de spectres d'absorption sont beaucoup plus bruyants que ceux obtenus pour le Cyt c_6 . Ce premier titrage redox a permis de déterminer un potentiel redox moyen de PsbV2 dans un milieu non tamponné de (-445 mV) (Figure 5.17).

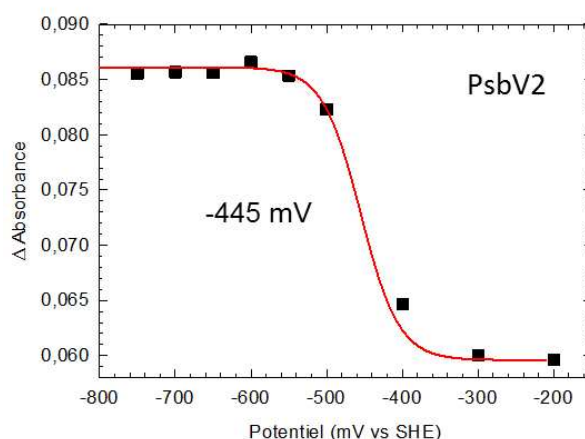


Figure 5.17 : Courbe de titrage redox de PsbV2 dans de l'eau sans médiateurs avec des points expérimentaux dans le sens de la réduction (carré noir). Les points expérimentaux sont les moyennes des absorbances à 411, 414, 417, 420 nm auxquelles l'absorbance à 580 nm a été soustraite. Ils sont ajustés avec une courbe de Nernst (en rouge).

Comme attendu, le potentiel redox moyen de PsbV2 est très bas, égal à (-445 mV). Pour améliorer cette courbe de titrage, une deuxième expérience a été réalisée mais cette fois dans un milieu tamponné à pH 5 avec un mélange de 15 médiateurs et en faisant des pas de potentiels moins grands. Les différences de spectres d'absorption sont à nouveau plus bruyantes que ceux obtenus pour le Cyt c_6 . Une réduction partielle de l'échantillon a pu être réalisée en faisant varier le potentiel électrique de l'électrode de travail de (-100 mV) à (-460 mV) (Figure 5.18). En dessous de (-460 mV) un courant important et la formation de bulles ont été générés dans la cellule indiquant qu'il y a eu électrolyse de l'eau.

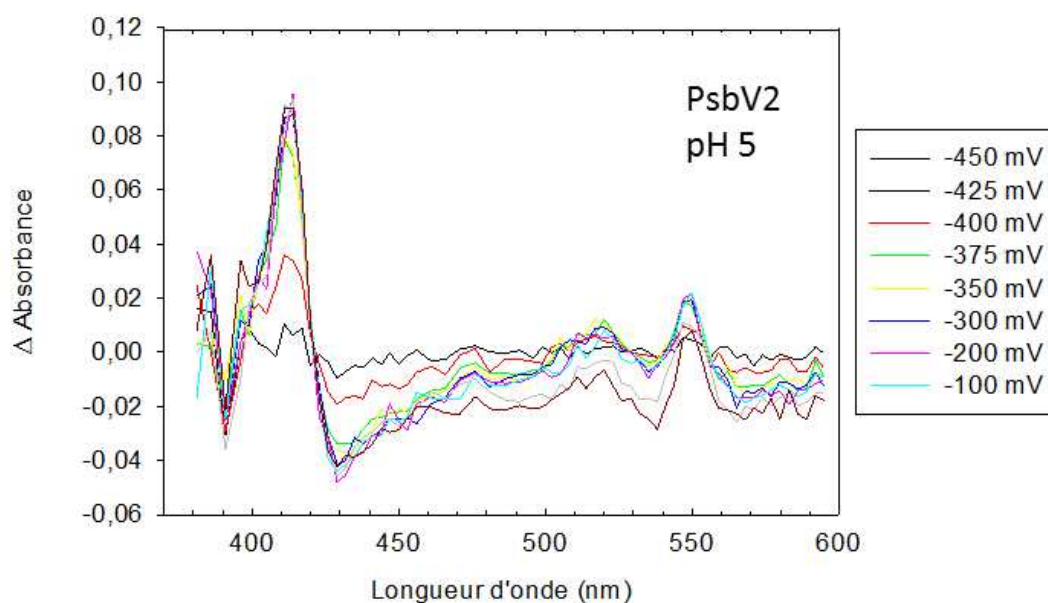


Figure 5.18 : Spectres de différence pendant le titrage redox de PsbV2 de *T. elongatus* (pour des potentiels allant de -460 mV à -100 mV). La différence d'absorbance correspond à la différence entre (spectre réduit à -460 mV) – (spectre mesuré à un potentiel imposé). Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre de type Joliot.

L'ajustement des points expérimentaux avec une extrapolation de la courbe pour des potentiels en dessous de (-460 mV), en fixant le paramètre nombre d'électrons $n=1$ et en laissant les autres paramètres libres a permis d'avoir une idée de la valeur du potentiel moyen redox de PsbV2. Malgré les limites du système d'électrochimie utilisé, j'ai réussi à mettre en place des expériences qui permettent d'avoir une idée sur le potentiel redox moyen de PsbV2 de *T. elongatus* à pH 5 ($E_0 \leq -460$ mV) (Figure 5.19).

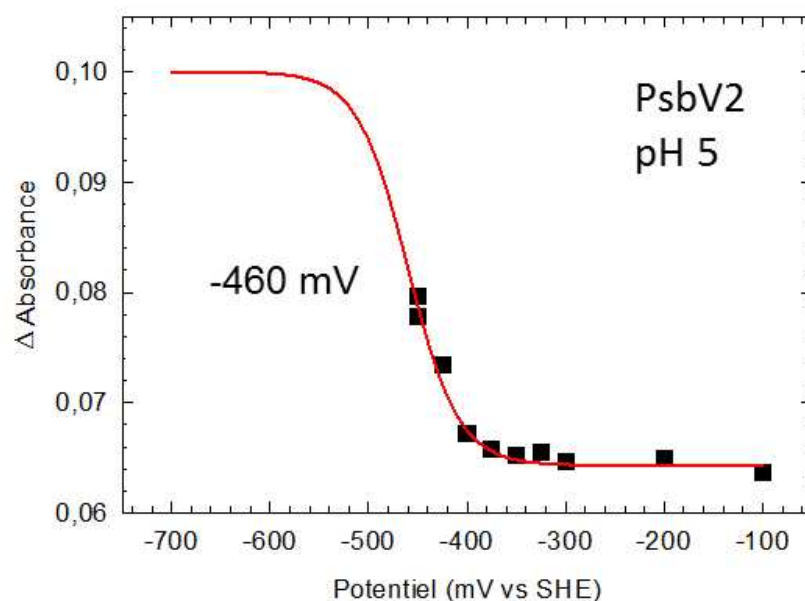


Figure 5.19 : Courbe de titrage d'oxydo-réduction de PsbV2 avec 15 médiateurs, dans du tampon MES 100 mM pH 5 avec du KCl à 100 mM, dans le sens de la réduction (carré noir). Les points expérimentaux correspondent à la moyenne des variations d'absorbance à 408, 411 et 417 nm. Ils sont ajustés avec une courbe de Nernst (en rouge).

***** Spectre réduit de PsbV2 de *T. elongatus* à pH 7,6**

Comme la réduction de PsbV2 avec le dithionite n'est pas possible et que le système utilisé précédemment ne permet pas d'avoir des spectres d'absorption UV-visible de bonne qualité, un autre type de cellule d'électrochimie a été utilisée afin d'obtenir le spectre réduit de PsbV2 (voir paragraphe 2.9.c du chapitre matériels et méthodes). Dans un premier temps, la réduction des deux médiateurs a été réalisée : le triquat et le méthylviologène qui ont tous les deux un potentiel redox très bas qui sont respectivement (-550 mV) et (-446 mV) à pH 7. La figure 5.20 ci-dessous montre les spectres d'absorption UV-visible oxydé et réduit du mélange des deux médiateurs.

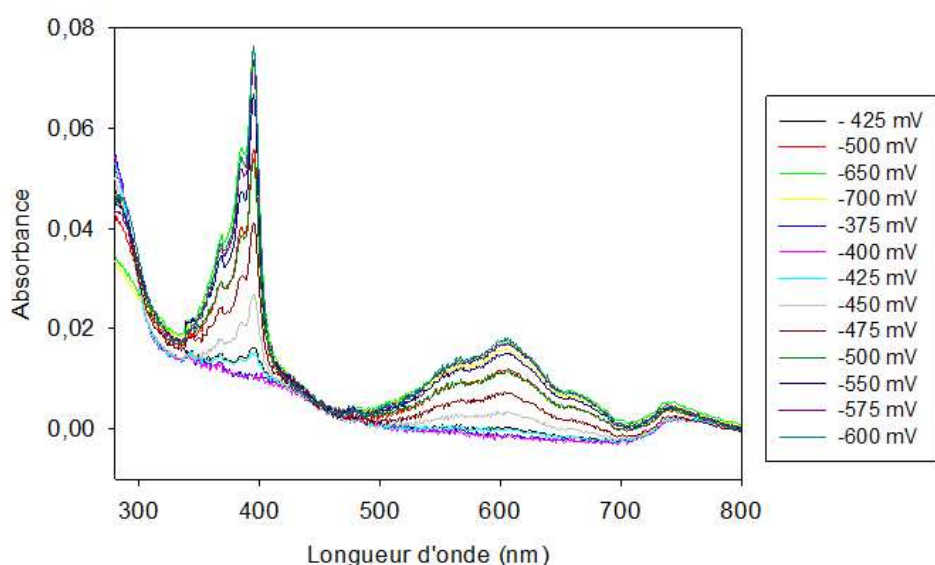


Figure 5.20 : Spectres d'absorption du mélange des deux médiateurs (triquat et methylviologène à 5 μ M) dans du tampon MOPS (100 mM) pH 7,6.

Dans l'expérience suivante, PsbV2 est mélangé avec les deux médiateurs et différents potentiels sont imposés dans la cellule d'électrochimie. PsbV2 (20 μ M) est en large excès par rapport à la quantité des médiateurs (2.5 μ M) comme le montre la figure 5.21.

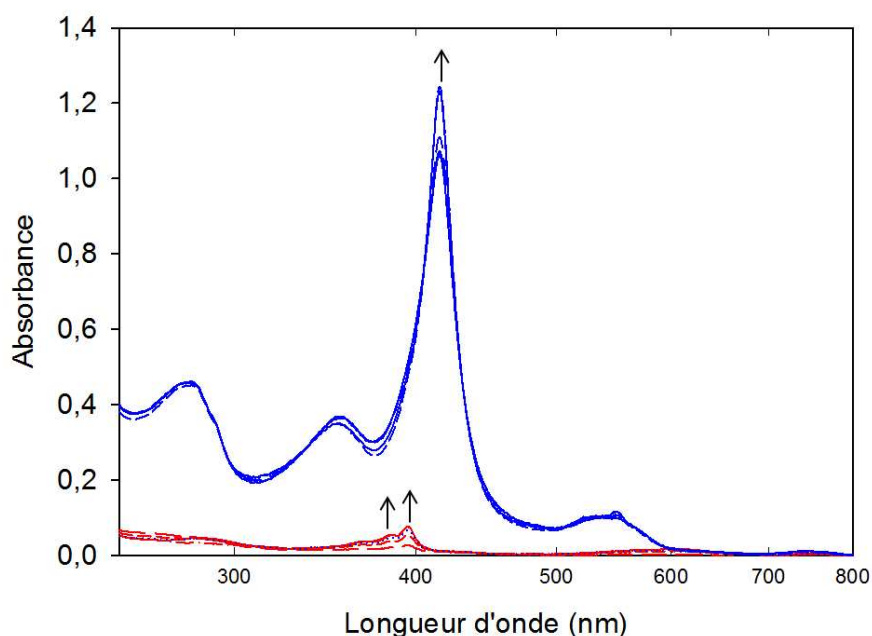


Figure 5.21 : Spectres d'absorption UV-visible des médiateurs (en bleu) et du mélange psbV2 et médiateurs (en rouge) pendant les réductions partielles des échantillons. Les flèches indiquent l'augmentation des pics pendant la réduction.

Afin de s'affranchir de la faible contribution du spectre des médiateurs, il a été soustrait à celui du mélange contenant les médiateurs et PsbV2. Pour la première fois, il a été possible d'obtenir le spectre d'absorption électronique UV-visible de PsbV2 réduit (Figure 5.22).

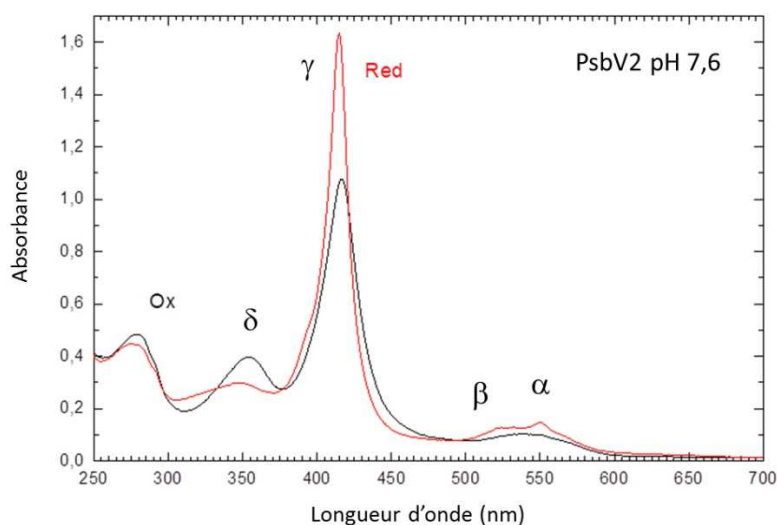


Figure 5.22 : Spectres d'absorption UV-Visible de PsbV2 réduit à un potentiel imposé dans la cellule d'électrochimie de (-550 mV) (en rouge) et oxydé à un potentiel de (-300 mV) (en bleu) dans du tampon MOPS (100 mM) pH 7.6, en présence de KCl (100 mM) et de deux médiateurs : méthylviologène et triquat à 2,5 μ M.

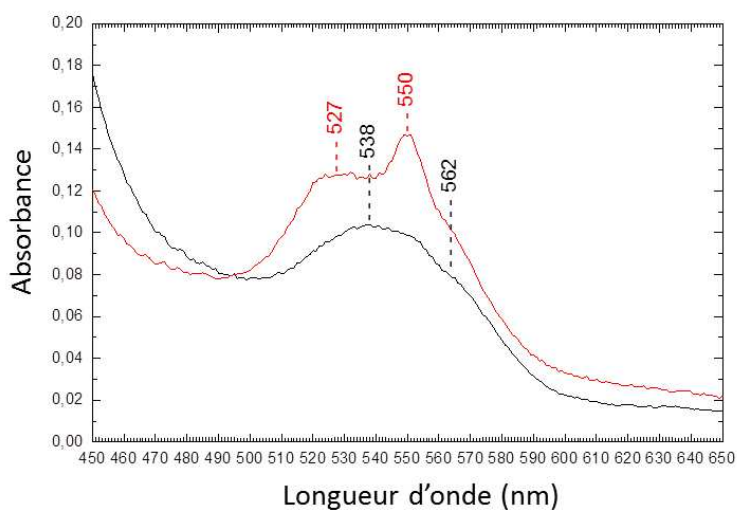


Figure 5.23 : Zoom des spectres d'absorption UV-Visible de PsbV2 oxydé et réduit dans la région α et β .

Des différences majeures sont observées entre les spectres oxydé et réduit de PsbV2 à pH 7,6 (Tableau 5.1) au niveau des bandes δ , γ , β et α .

Tableau 5.1 Caractéristiques spectrales de PsbV2 oxydé et réduit

	δ	γ	β	α
PsbV2 oxydé	354 nm	417 nm	538 nm	562 nm
PsbV2 réduit	347 nm	415 nm	527 nm	550 nm

Au niveau de la bande de Soret (γ), le maximum d'absorbance se trouve à 415 nm dans la forme oxydée (en noir) et à 417 nm dans la forme réduite (en rouge) (Figure 5.22). Dans la forme réduite l'absorbance du pic dans la bande de Soret a fortement augmenté, il passe de 1,05 à 1,62. Dans la forme oxydée le pic de la bande δ se trouve à 354 nm, il diminue et se décale à 347 nm dans la forme réduite. Dans la forme réduite, il y a deux pics α et β bien distincts respectivement à 550 et 527 nm. La distinction de ces deux pics s'atténue fortement dans la forme oxydée, comme attendu pour les cytochromes de type c.

5.5. Discussion et perspectives

La structure cristallographique de PsbV2 de *T. elongatus* (pdb.4LJI) a révélé que le 6^{ème} ligand axial de l'hème de PsbV2 est une cystéine. La coordination axiale de l'hème avec un thiolate d'une cystéine n'est pas courante pour les cytochromes de type c. Elle a été découverte pour la première fois en 2001 dans le complexe SoxAX impliqué dans l'oxydation des thiosulfates chez *Rhodovulum sulfidophilum* (Grein, 2010). Ce type de coordination a ensuite été trouvé dans d'autres cytochromes de type c, il confère des caractères atypiques, notamment un potentiel redox moyen très bas en dessous de (- 400 mV) à pH 7 (Tableau 5.2). PsbV2 a un potentiel redox très bas comme attendu par rapport aux autres cytochromes de type c ayant une cystéine comme ligand axial de l'hème.

La structure cristallographique de PsbV2 résolue pendant mes travaux de thèse montre une structure très similaire à celle du Cyt c₅₅₀ codé par le gène *psbV1*. La caractérisation de son très bas potentiel redox et la résolution de sa structure n'a pas permis d'avancer d'hypothèses quant à sa fonction. La quantité de PsbV2 n'est plus un frein à sa caractérisation car il est maintenant possible de surexprimer ce cytochrome dans la cyanobactérie *T. elongatus* avec le promoteur de la Rubisco. Le spectre Raman de PsbV2 dans sa forme oxydée a été obtenu au laboratoire (Kerfeld, Sawaya et al. 2003). La méthode classique pour obtenir le spectre réduit d'une protéine en résonance Raman est de la réduire chimiquement. Mais comme vu précédemment, PsbV2 n'est pas réductible avec un composé chimique tel que le dithionite, il

Tableau 5.2 : Potentiels redox moyens et ligands axiaux des hèmes de la forme oxydée de cytochromes de type c. DsrJ et SoxAX sont des cytochromes à trihème impliqués dans la chimie redox du soufre (Bamford, 2002. Kilmartin, 2011)

	Organisme	Ligands axiaux de l'hème	Potentiel redox moyen	Références
DsrJ	<i>Desulfivibrio desulfuricans</i>	His / Cys	< - 400 mV (pH 7)	Pires, 2006
NaxLS	<i>KSU-1</i>	His / Cys	< - 400 mV (pH 7)	Ukita, 2010
SoxAX	<i>Chlorobium tepidum</i>	His / Cys	< - 400 mV (pH 7)	Ogawa, 2008
SoxAX	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	His / Cys	- 432 mV (pH 7)	Reijerse, 2007
SoxAX	<i>Starkeya novella</i>	His / Cys	- 479 mV (pH 7)	Cheesman, 1997
PsbV2	<i>T. elongatus</i>	His / Cys	≤ - 460 mV (pH 5)	non publié
Cyt c ₅₅₀ (soluble)	<i>T. elongatus</i>	His / His	- 250 mV	Kerfeld, 2003
Cyt c ₅₅₀ (associé au PSII)	<i>T. elongatus</i>	His / His	- 80 mV	Kerfeld, 2003
Cyt c ₆	<i>Arthrospira maxima</i>	His / Met	+ 314 mV (pH 7)	Cho, 1999

fallait donc trouver un autre moyen pour réduire PsbV2. Dans les expériences précédentes de titrage redox, PsbV2 a pu être réduit dans une cellule d'électrochimie. La géométrie de la cellule utilisée dans les expériences de titrages redox précédentes n'était pas adaptée à des expériences de spectroscopie Raman. Un montage a été mis au point où il est possible d'imposer un potentiel très bas avec des électrodes dans une cuve dont la géométrie est compatible avec des expériences de spectroscopie Raman, c'est-à-dire une cuve qui peut recevoir et réfléchir un rayonnement laser sur l'une de ses faces. Grâce à la mise en place d'un montage expérimental avec une cuve de spectroélectrochimie adaptable à des expériences de spectroscopie de résonance Raman, il est maintenant envisageable d'obtenir le spectre de résonance Raman du spectre réduit qui permettrait de savoir si l'environnement, la structure et les ligands de l'hème changent quand l'hème de PsbV2 est réduit.

Des études préliminaires en bioinformatique ont été réalisées, elles ont permis d'observer que certaines cyanobactéries n'avaient que le gène *psbV1* codant le Cyt c₅₅₀ et pas le gène *psbV2*, ces études restent à approfondir.

6. Comparaison de Tll0287 avec PsbV2

6.1. Structures cristallographiques de Tll0287 et de PsbV2	174
6.2. Comparaison des hèmes de Tll0287 et de PsbV2	174
a. Les ligands axiaux	174
b. Les conformations des porphyrines	177
c. Plusieurs formes d'hème pour Tll0287	177

6.1. Structures cristallographiques de Tll0287 et de PsbV2

Les structures cristallographiques de Tll0287 et de PsbV2 de *T. elongatus* ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Shen. Comme cela a été présenté dans les chapitres 4 et 5, PsbV2 a une structure similaire à celle d'autres cytochromes de type c connus de *T. elongatus* comme le Cyt c₅₅₀ et le Cyt c₆ alors que Tll0287 présente un repliement très différent (Figure 6.1).

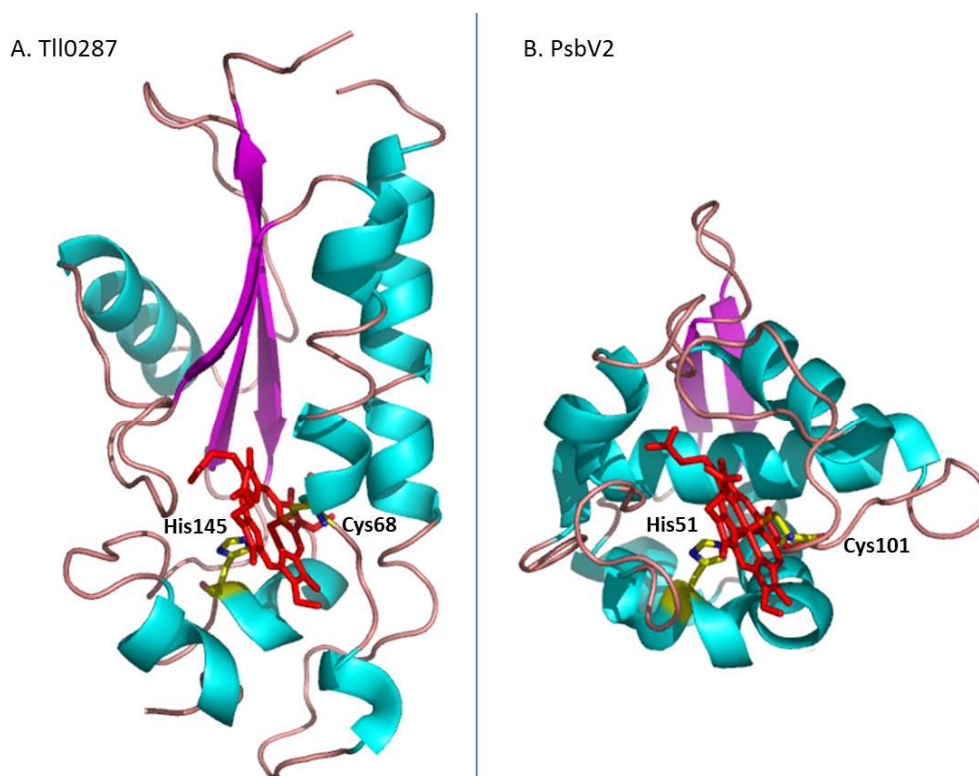


Figure 6.1 : Structures cristallographiques (A) de Tll0287 et (B) de PsbV2. Les feuillet β sont colorés en rose, les hélices α en bleu cyan, les hèmes en rouge et les chaînes latérales des ligands axiaux en jaune.

6.2. Comparaison des hèmes de Tll0287 et de PsbV2

6.2.a. Les ligands axiaux

Les structures cristallographiques ont permis d'identifier les ligands axiaux de l'hème. Tll0287 et PsbV2 ont les mêmes jeux de ligands axiaux, une histidine en 5^{ème} position et une cystéine en 6^{ème} position. Tll0287 et PsbV2 sont deux nouveaux membres d'hémoprotéines à hème c avec une cystéine comme ligand axial de l'hème. La figure 6.2 montre l'interaction

hème-ligands sous différents angles. On remarque que le groupement imidazole de l'histidine est à peu près positionné de la même façon dans les deux protéines (vues B et F). Le cycle imidazole étant près d'une bissectrice des axes Fe-N₄(pyrrole), son interaction stérique avec le tétrapyrrole est minimal. L'analogie de structure des séquences de type CXXCH (en α -hélice) entraîne une interaction hème-His très similaire dans ces hémoprotéines. En revanche, la chaîne latérale des Cys est positionnée d'une façon différente. On note tout d'abord leurs groupements -NH₂ et -COOH qui sont dans une orientation inversée. Cette orientation différente peut être due à cause de leur position relative inversée dans la séquence peptidique (Cys68/His145 pour Tll0287. Cys101/His51 pour PsbV2). Pas nécessairement en relation avec ce qui précède, on remarque que le plan des liaisons Fe-S-CH₂(Cys) de Tll0287 est presque éclipsé avec le plan du cycle imidazole (vue D) alors que pour PsbV2 un plus grand angle entre ces plans est observé. Ceci suggère que les interactions stériques et électroniques des ligands avec l'hème sont différentes pour les deux hémoprotéines. La conséquence est une conformation du tétrapyrrole différente.

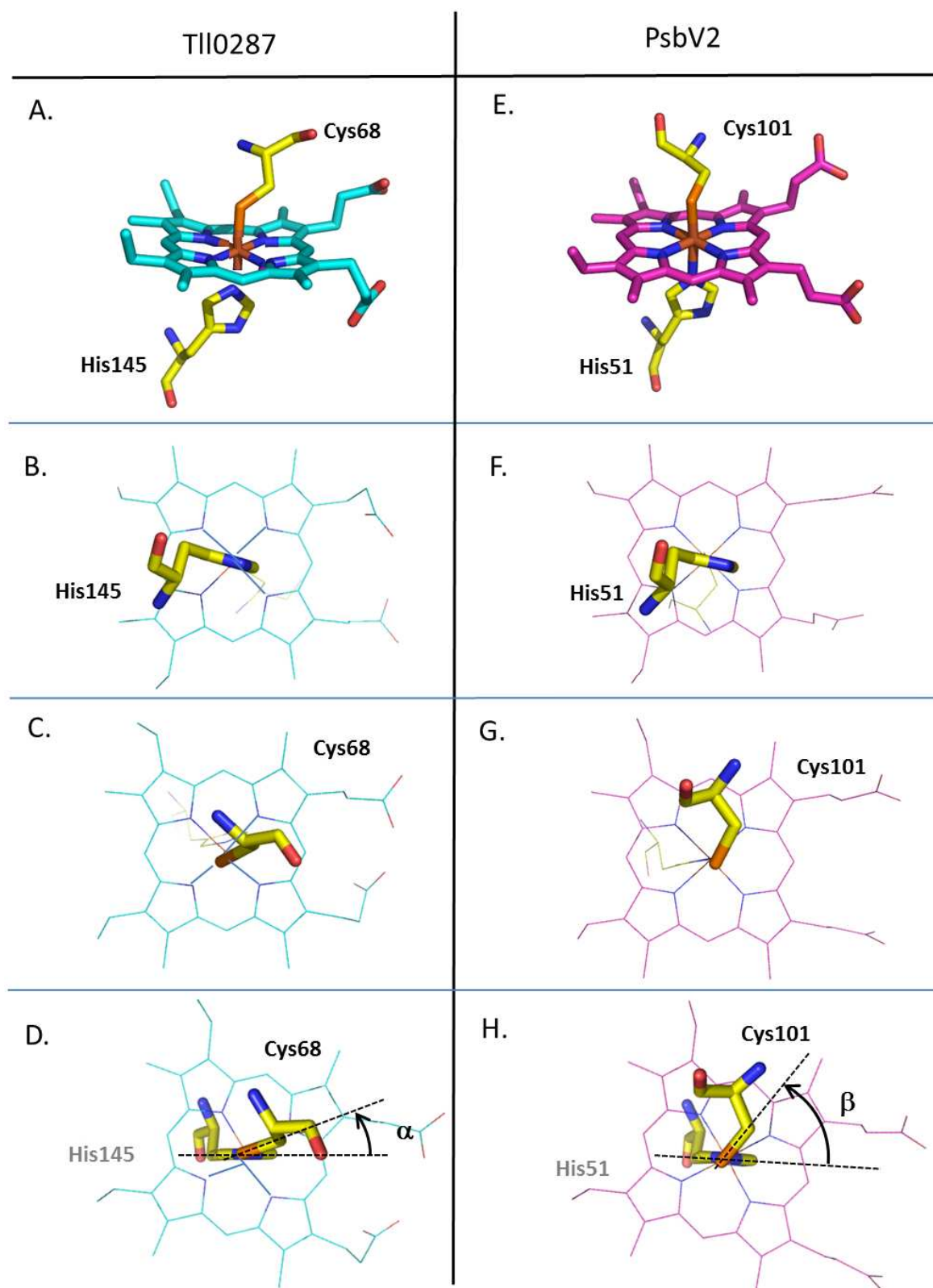


Figure 6.2 : Différentes vues de l'hème avec les ligands axiaux de Tll0287 (à gauche, en bleu cyan) et de PsbV2 (à droite, en rose). Vue du côté des histidines par rapport au plan de l'hème (B et F), vue du côté des cystéines par rapport au plan de l'hème (C et G), vue dans le plan orthogonale de l'imidazole de l'histidine (D et H). Les angles α et β sont ceux entre le plan du groupement imidazole de l'histidine et la liaison S-CH₂ de la cystéine.

6.2.b. Les conformations des porphyrines

Les conformations de l'hème de Tll0287 et de PsbV2, observées à partir des coordonnées des structures cristallographiques de Shen et al. montrent des différences. L'hème de Tll0287 présente un tétrapyrrole plié selon un axe C_m -Fe- C_m (Figure 6.3A). L'hème de PsbV2 présente 4 noyaux pyrroles dans 4 plans différents, selon une conformation entre une forme de selle de cheval (saddling) et une ondulation (ruffling).

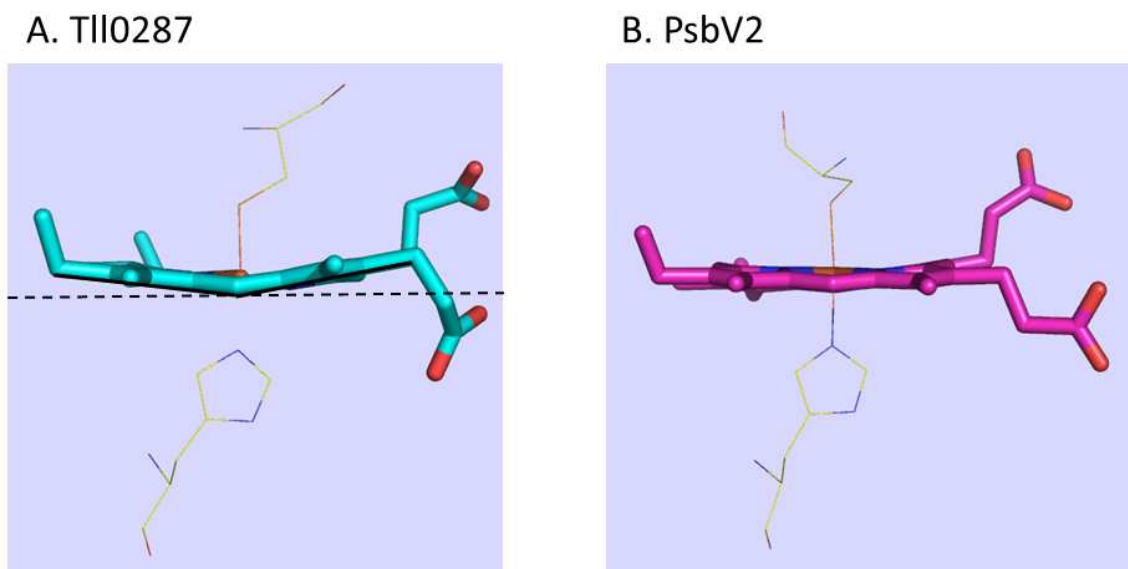


Figure 6.3 : Conformations de l'hème de Tll0287 (A) et de PsbV2 (B) à partir de la structure cristallographique de Shen et al.

6.2.c. Plusieurs formes d'hèmes pour Tll0287

Les spectres de résonance Raman des hèmes oxydés de Tll0287 (données obtenues pendant ma thèse) et de PsbV2 (Kerfeld, Sawaya et al. 2003) ont montré de grandes différences. L'hème de PsbV2 ne présente qu'une seule forme hexa-coordonnée (haut spin) alors que l'hème de Tll0287 présente deux formes pour chaque état redox : une penta- ou hexa-coordonnée (haut spin) et une hexa-coordonnée (bas spin). L'hème et les ligands axiaux de PsbV2 paraissent moins flexibles que ceux de Tll0287. De plus, Tll0287 peut changer de ligand quand il est réduit indiquant une flexibilité de l'hème.

7. Conclusions & perspectives

La cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus* est un organisme d'étude modèle de la photosynthèse. Mon travail de thèse est la première étude approfondie de deux cytochromes de type c de *T. elongatus*, autre que le cytochrome c_6 et le cytochrome c_{550} . Au début de ma thèse, les propriétés physico-chimiques et structurales des 2 cytochromes PsbV2 et Tll0287 découverts au laboratoire n'étaient pas connues.

Les deux structures cristallographiques de Tll0287 et de PsbV2 réalisées dans le laboratoire du Dr. Shen ont permis d'identifier le ligand axial de l'hème qui est une cystéine. Ce ligand est atypique pour les cytochromes de type c. Dans un contexte plus large, les protéines contenant des hèmes thiolates ont été bien étudiées (Smith, Pazicni et al. 2015). Comme montré dans le chapitre 6, PsbV2 et Tll0287 présentent de grandes différences en termes de structure cristallographique mais aussi en termes de propriétés physico-chimiques (voir chapitres 4 et 5). PsbV2 a un potentiel redox très bas (voir partie 5). Le comportement redox de Tll0287 est différent et suggère à nouveau que Tll0287 et PsbV2 ont des rôles biologiques distincts.

Il est maintenant possible de surexprimer PsbV2 dans un système homologue avec le promoteur de la Rubisco. La quantité de PsbV2 n'est donc plus un facteur limitant à sa caractérisation. Il a été montré que PsbV2 avait un potentiel redox très bas, inférieur à -460 mV vs SHE à pH 5. Un montage adapté à la spectroscopie de résonance Raman rend à présent possible des expériences sur PsbV2 dans sa forme réduite. L'hème de PsbV2 semble moins flexible que celui de Tll0287.

Tll0287, quant à lui est exprimé uniquement dans la souche où seul *psbA2* est présent, parmi les 3 gènes codant la protéine D1. Pour chaque état d'oxydation, deux formes d'hèmes (hexa- (LS) et penta- ou hexa-coordonnée (HS)) ainsi qu'une dépendance des spectres vis-à-vis du pH ont été mises en évidence en spectroscopie d'absorption électronique et de résonance Raman. Le ligand cystéine est labile dans la forme réduite de Tll0287. Tll0287 présente aussi deux potentiels redox moyens à pH 10. Tous ces résultats ainsi que la structure cristallographique suggèrent que Tll0287 pourrait être une protéine senseur et peut être classée dans les protéines à hème-thiolate de type 2 selon la classification de Smith et al. (2015). Le fait que Tll0287 soit une protéine senseur ouvre un vaste champ de recherche qui reste à être exploré. Les protéines impliquées dans la transduction du signal sont généralement constituées de deux composantes : un domaine senseur et un domaine transducteur du signal. Si Tll0287 est un domaine senseur, il devrait pouvoir donner un signal à un domaine

fonctionnel ou à une autre protéine. Afin d'ouvrir quelques pistes, j'ai regardé le contexte génomique du gène *tll0287*, ce gène *tll0287* se trouve en aval du gène qui code pour la sulfide quinone réductase (SQR) pour plusieurs cyanobactéries. Chez les cyanobactéries, la sulfide quinone réductase est une enzyme membranaire contenant un groupement FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) comme cofacteur. La réaction de cette enzyme a été supposée comme étant la première étape de photosynthèse sans oxygène en présence de soufre (Arieli, Padan et al. 1991). Les électrons seraient transférés du sulfure d'hydrogène vers les quinones de la membrane. Tll0287 est exprimée au laboratoire uniquement chez le mutant de PSII ne contenant que le gène *psbA2* codant la protéine D1 (WT*2). Or il a été montré que ce gène *psbA2* est exprimé dans la souche sauvage quand les cellules sont en microaérobie (Kos, Deak et al. 2008; Sicora, Ho et al. 2009). Mais c'est pourtant en aérobie que Tll0287 a été obtenu au laboratoire chez le mutant (WT*2). Tll0287 pourrait-il être un domaine senseur de l'oxygène ou de soufre et aurait-il un lien avec la SQR ?

Ce lien très hypothétique entre Tll0287 et SQR est à prendre avec précaution. Si le lien est réel, il se pourrait qu'en présence de soufre et en absence d'oxygène, la cyanobactérie *T. elongatus* soit capable de passer de la photosynthèse oxygénique à la photosynthèse anoxygénique, avec une forme réduite du soufre telle que H₂S remplaçant H₂O comme source d'électrons de la chaîne photosynthétique. Des études ont montré que deux cyanobactéries (*Oscillatoria limnetica* et *Aphanothece halophytica*) étaient capables de passer en photosynthèse anoxygénique en synthétisant la SQR dans ses membranes (Arieli, Shahak et al. 1994; Bronstein, Schutz et al. 2000). Dans son milieu naturel qui sont les sources d'eau chaude de Beppu au Japon (la composition chimique des sources d'eau chaudes de Beppu est publiée dans « GHC BULLETIN, MAY 1996 », geoheat.oit.edu/bulletin/bull17-2/art1.pdf), il est possible que *T. elongatus* soit exposée à des niveaux d'oxygène bas et des niveaux élevés de soufre. Des chercheurs en écologie (Cohen, Jorgensen et al. 1986) ont étudié l'adaptation de cyanobactéries au sulfure d'hydrogène et leur capacité à induire la photosynthèse anoxygénique. Ils ont publié que les cyanobactéries sont souvent trouvées dans des environnements riches en soufre, en coexistence avec des bactéries qui font de la photosynthèse anoxygénique. Le soufre est fortement toxique pour les organismes eucaryotes photosynthétiques et pour les cyanobactéries non adaptées. Il inhibe le transfert d'électrons en réagissant avec les cytochromes et les hémoprotéines. Il a été montré qu'une longue exposition à des potentiels redox très bas pouvait inhiber la production de l'oxygène de façon drastique chez certaines cyanobactéries. La présence de cyanobactéries en association avec le soufre est commune dans des organismes benthiques, dans les sources d'eau chaudes, dans les

lacs hypersalés et alcalins ainsi que dans les biofilms. Des fluctuations en soufre et oxygène ont été montrées dans certaines sources d'eau chaude où les cyanobactéries sont périodiquement exposées à des concentrations fortes de soufre et d'oxygène. Pour tester l'hypothèse concernant Tll0287 et son éventuel lien avec la SQR, il serait intéressant de cultiver les cellules de *T. elongatus* en présence de H₂S, pour voir si *T. elongatus* est capable de réaliser de la photosynthèse anoxygénique, en exprimant la SQR. La présence et l'activité de la SQR pourront être mesurées selon des méthodes connues (Prunetti, Infossi et al. 2010). Pour aller plus loin dans l'étude de la fonction de Tll0287, j'ai passé cinq semaines dans le laboratoire du Dr. Miwa Sugiura à l'Université d'Ehime au Japon pour construire plusieurs mutants de délétion du gène *tll0287*. Une partie du gène *tll0287* a été remplacée par une cassette de résistance à la gentamycine (voir paragraphe 2.3.b. du chapitre matériels et méthodes). Comme nous disposons des différentes souches de mutants de D1 (WT 43H, WT*1, WT*2, WT*3), cette cassette a été intégrée dans le génome de ces souches à la place d'une partie du gène *tll0287*. Ces 4 mutants sont viables en milieu liquide. Ces mutants de délétion constituent un outil qui pourrait aider à comprendre le rôle de Tll0287. La mise en place des gels d'électrophorèse 2D pourront permettre de comparer des profils d'expression de protéine dans différentes conditions de culture des différents mutants de délétion de Tll0287. Suite à l'obtention d'anticorps anti-Tll0287 au CEA, il est maintenant envisageable de détecter et de quantifier Tll0287 sur plaque Elisa (voir paragraphe 2.6.d du chapitre matériels et méthodes), de chercher des protéines partenaires par immunoprécipitation et de localiser la protéine *in vivo* par immunofluorescence.

BIBLIOGRAPHIE

- Alric, J., Y. Tsukatani, et al. (2004). "Structural and functional characterization of the unusual triheme cytochrome bound to the reaction center of *Rhodovulum sulfidophilum*." J Biol Chem **279**(25): 26090-7.
- Arieli, B., E. Padan, et al. (1991). "Sulfide-induced sulfide-quinone reductase activity in thylakoids of *Oscillatoria limnetica*." J Biol Chem **266**(1): 104-11.
- Arieli, B., Y. Shahak, et al. (1994). "Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*." J Biol Chem **269**(8): 5705-11.
- Arnold, K., L. Bordoli, et al. (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." Bioinformatics **22**(2): 195-201.
- Bamford, V. A., B. C. Berks, et al. (2002). "Novel domain packing in the crystal structure of a thiosulphate-oxidizing enzyme." Biochem Soc Trans **30**(4): 638-42.
- Bell, P. D., Y. Xin, et al. (2009). "Purification and characterization of cytochrome c(6) from *Acaryochloris marina*." Photosynth Res **102**(1): 43-51.
- Berghuis, A. M. and G. D. Brayer (1992). "Oxidation state-dependent conformational changes in cytochrome c." J Mol Biol **223**(4): 959-76.
- Bialek, W., M. Nelson, et al. (2008). "Deeply branching c6-like cytochromes of cyanobacteria." Biochemistry **47**(20): 5515-22.
- Bjellqvist, B., K. Ek, et al. (1982). "Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications." J Biochem Biophys Methods **6**(4): 317-39.
- Boussac, A., K. Koyama, et al. (2013). "The Tll0287 protein is a hemoprotein associated with the PsbA2-Photosystem II complex in *Thermosynechococcus elongatus*." Biochim Biophys Acta **1827**(10): 1174-82.
- Boussac, A., F. Rappaport, et al. (2004). "Biosynthetic Ca²⁺/Sr²⁺ exchange in the photosystem II oxygen-evolving enzyme of *Thermosynechococcus elongatus*." J Biol Chem **279**(22): 22809-19.
- Boussac, A., J. M. Verbavatz, et al. (2008). "Isotopic labelling of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*." Photosynth Res **98**(1-3): 285-92.
- Bronstein, M., M. Schutz, et al. (2000). "Cyanobacterial sulfide-quinone reductase: cloning and heterologous expression." J Bacteriol **182**(12): 3336-44.
- Carrieri, D., K. Wawrousek, et al. (2011). "The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria." Bioresour Technol **102**(18): 8368-77.
- Casati, P., X. Zhang, et al. (2005). "Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity." Mol Cell Proteomics **4**(11): 1673-85.
- Cho, Y. S., H. B. Pakrasi, et al. (2000). "Cytochrome cM from *synechocystis* 6803. Detection in cells, expression in *Escherichia coli*, purification and physical characterization." Eur J Biochem **267**(4): 1068-74.

- Cho, Y. S., Q. J. Wang, et al. (1999). "Extinction coefficients and midpoint potentials of cytochrome c(6) from the cyanobacteria *Arthrospira maxima*, *Microcystis aeruginosa*, and *Synechocystis* 6803." Biochim Biophys Acta **1413**(2): 92-7.
- Cohen, Y., B. B. Jorgensen, et al. (1986). "Adaptation to Hydrogen Sulfide of Oxygenic and Anoxygenic Photosynthesis among Cyanobacteria." Appl Environ Microbiol **51**(2): 398-407.
- Desbois, A. (1994). "Resonance Raman spectroscopy of c-type cytochromes." Biochimie **76**(7): 693-707.
- Desbois, A. and M. Lutz (1992). "Redox control of proton transfers in membrane b-type cytochromes - an absorption and resonance raman-study on bis(imidazole) and bis(imidazolate) model complexes of iron-protoporphyrin." European biophysics journal with biophysics letters **20**(6): 321-335.
- Dominguez, D. C. (2004). "Calcium signalling in bacteria." Mol Microbiol **54**(2): 291-7.
- Edelman, M. and A. K. Mattoo (2008). "D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma." Photosynth Res **98**(1-3): 609-20.
- Farineau and Morot-Gaudry (2006). La photosynthèse : processus physiques, moléculaires et physiologiques.
- Feissner, R., Y. Xiang, et al. (2003). "Chemiluminescent-based methods to detect subpicomole levels of c-type cytochromes." Anal Biochem **315**(1): 90-4.
- Ferreira, K. N., T. M. Iverson, et al. (2004). "Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center." Science **303**(5665): 1831-8.
- Grabarczyk, D. B., P. E. Chappell, et al. (2015). "Mechanism of Thiosulfate Oxidation in the SoxA Family of Cysteine-Ligated Cytochromes." J Biol Chem.
- Granlund, I., M. Hall, et al. (2009). "Difference gel electrophoresis." encyclopedia of life sciences.
- Grein, F., S. S. Venceslau, et al. (2010). "DsrJ, an essential part of the DsrMKJOP transmembrane complex in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*, is an unusual triheme cytochrome c." Biochemistry **49**(38): 8290-9.
- Guerrero, F., A. Sedoud, et al. (2010). "A high redox potential form of cytochrome c550 in photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus*." J Biol Chem **286**(8): 5985-94.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-23.
- Hu, S., I. Morris, et al. (1993). "Complete assignment of Cytochrome c Resonance Raman Spectra via Enzymatic Reconstitution with Isotopically Labeled Hemes." JACS **115**: 12446-12458.
- Ishida, N., M. Sugiura, et al. (2008). "Biosynthetic exchange of bromide for chloride and strontium for calcium in the photosystem II oxygen-evolving enzymes." J Biol Chem **283**(19): 13330-40.
- Ishikita, H. and E. W. Knapp (2005). "Redox potential of cytochrome c550 in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongates*." FEBS Lett **579**(14): 3190-4.

- Joliot, P. (1968). "Kinetic studies of photosystem II in photosynthesis." Photochem Photobiol **8**(5): 451-63.
- Kamennaya N., Ajo-Franklin C., Northen T. and Jansson C. (2012). "Cyanobacteria as Biocatalysts for Carbonate Mineralization". Minerals **2**: 338-364.
- Kaminskaya, O., J. Kern, et al. (2005). "Extinction coefficients of cytochromes b559 and c550 of *Thermosynechococcus elongatus* and Cyt b559/PS II stoichiometry of higher plants." Biochim Biophys Acta **1708**(3): 333-41.
- Kargul, J., K. Maghlaoui, et al. (2007). "Purification, crystallization and X-ray diffraction analyses of the *T. elongatus* PSII core dimer with strontium replacing calcium in the oxygen-evolving complex." Biochim Biophys Acta **1767**(6): 404-13.
- Katoh, H., S. Itoh, et al. (2001). "Functional analysis of psbV and a novel c-type cytochrome gene psbV2 of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1." Plant Cell Physiol **42**(6): 599-607.
- Kawakami, K., Y. Umena, et al. (2011). "Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution." J Photochem Photobiol B **104**(1-2): 9-18.
- Keightley, J. A., D. Sanders, et al. (1998). "Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cytochrome c552 gene from *Thermus thermophilus* HB8. Evidence for genetic linkage to an ATP-binding cassette protein and initial characterization of the cycA gene products." J Biol Chem **273**(20): 12006-16.
- Kelley, L. A. and M. J. Sternberg (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." Nat Protoc **4**(3): 363-71.
- Kerfeld, C. A., M. R. Sawaya, et al. (2003). "Structural and EPR characterization of the soluble form of cytochrome c-550 and of the psbV2 gene product from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*." Plant Cell Physiol **44**(7): 697-706.
- Kiefer, F., K. Arnold, et al. (2009). "The SWISS-MODEL Repository and associated resources." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D387-92.
- Kilmartin, J. R., M. J. Maher, et al. (2011). "Insights into structure and function of the active site of SoxAX cytochromes." J Biol Chem **286**(28): 24872-81.
- Kirilovsky, D., M. Roncel, et al. (2004). "Cytochrome c550 in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*: study of redox mutants." J Biol Chem **279**(51): 52869-80.
- Kok, B., B. Forbush, et al. (1970). "Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism." Photochem Photobiol **11**(6): 457-75.
- Koksharova, O. A. and M. M. Babykin (2011). "[Cyanobacterial cell division: genetics and comparative genomics of cyanobacterial cell division]." Genetika **47**(3): 293-300.
- Koropatkin, N. M., D. W. Koppenaal, et al. (2007). "The structure of a cyanobacterial bicarbonate transport protein, CmpA." J Biol Chem **282**(4): 2606-14.

- Kos, P. B., Z. Deak, et al. (2008). "Differential regulation of psbA and psbD gene expression, and the role of the different D1 protein copies in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1." Biochim Biophys Acta **1777**(1): 74-83.
- Kranz, R. G., C. Richard-Fogal, et al. (2009). "Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control." Microbiol Mol Biol Rev **73**(3): 510-28, Table of Contents.
- Londer, Y. Y., I. S. Dementieva, et al. (2006). "Characterization of a c-type heme-containing PAS sensor domain from *Geobacter sulfurreducens* representing a novel family of periplasmic sensors in *Geobacteraceae* and other bacteria." FEMS Microbiol Lett **258**(2): 173-81.
- Marbouty, M., C. Saguez, et al. (2009). "Characterization of the FtsZ-interacting septal proteins SepF and Ftn6 in the spherical-celled cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803." J Bacteriol **191**(19): 6178-85.
- Mayhew, S. G. (1978). "The redox potential of dithionite and SO₂ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase." Eur J Biochem **85**(2): 535-47.
- Meyer, T. E. and M. D. Kamen (1982). "New perspectives on c-type cytochromes." Adv Protein Chem **35**: 105-212.
- Miller, D. J. and D. J. Nicholas (1984). "3,3',5,5'-tetramethylbenzidine/H₂O₂ staining is not specific for heme proteins separated by gel electrophoresis." Anal Biochem **140**(2): 577-80.
- Miyagishima, S. Y., C. P. Wolk, et al. (2005). "Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses." Mol Microbiol **56**(1): 126-43.
- Mulo, P., C. Sicora, et al. (2009). "Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic photosynthesis." Cell Mol Life Sci **66**(23): 3697-710.
- Nakamura, Y., T. Kaneko, et al. (2002). "Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1." DNA Res **9**(4): 123-30.
- Nowaczyk, M. M., J. Sander, et al. (2010). "Dynamics of the cyanobacterial photosynthetic network: communication and modification of membrane protein complexes." Eur J Cell Biol **89**(12): 974-82.
- Ogami, S., A. Boussac, et al. (2012). "Deactivation processes in PsbA1-Photosystem II and PsbA3-Photosystem II under photoinhibitory conditions in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*." Biochim Biophys Acta **1817**(8): 1322-30.
- Othman, S. and A. Desbois (1998). "Resonance raman investigation of lysine and N-acetylmethionine complexes of ferric and ferrous microperoxidase " European biophysics journal with biophysics letters **28**(1): 12-25.
- Othman, S., J. Fitch, et al. (1997). "Influence of conserved amino acids on the structure and environment of the heme of cytochrome c2. A resonance Raman study." Biochemistry **36**(18): 5499-508.

- Othman, S., A. Le Lirzin, et al. (1993). "A heme c-peptide model system for the resonance Raman study of c-type cytochromes: characterization of the solvent-dependence of peptide-histidine-heme interactions." Biochemistry **32**(37): 9781-91.
- Othman, S., A. Le Lirzin, et al. (1994). "Resonance Raman investigation of imidazole and imidazolate complexes of microperoxidase: characterization of the bis(histidine) axial ligation in c-type cytochromes." Biochemistry **33**(51): 15437-48.
- Othman, S., P. Richaud, et al. (1996). "Evidence for a proximal histidine interaction in the structure of cytochromes c in solution: a resonance Raman study." Biochemistry **35**(28): 9224-34.
- Othman, S. Thèse "Modélisation du site actif des cytochromes c par la microperoxidase-8. Etude par diffusion Raman de résonance. Structure et environnement de l'hème des cytochromes bactériens c' et c₂". 1994.
- Pokkuluri, P. R., M. Pessanha, et al. (2008). "Structures and solution properties of two novel periplasmic sensor domains with c-type heme from chemotaxis proteins of *Geobacter sulfurreducens*: implications for signal transduction." J Mol Biol **377**(5): 1498-517.
- Prunetti, L., P. Infossi, et al. (2010). "New functional sulfide oxidase-oxygen reductase supercomplex in the membrane of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*." J Biol Chem **285**(53): 41815-26.
- Raphael, A. L. and H. B. Gray (1989). "Axial ligand replacement in horse heart cytochrome c by semisynthesis." Proteins **6**(3): 338-40.
- Retegan, M., N. Cox, et al. (2014). "The first tyrosyl radical intermediate formed in the S2-S3 transition of photosystem II." Phys Chem Chem Phys **16**(24): 11901-10.
- Richard-Fogal, C. and R. G. Kranz (2010). "The CcmC:heme:CcmE complex in heme trafficking and cytochrome c biosynthesis." J Mol Biol **401**(3): 350-62.
- Roncel, M., A. Boussac, et al. (2003). "Redox properties of the photosystem II cytochromes b559 and c550 in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*." J Biol Inorg Chem **8**(1-2): 206-16.
- Roncel, M., D. Kirilovsky, et al. (2012). "Photosynthetic cytochrome c550." Biochim Biophys Acta **1817**(8): 1152-63.
- Roy, A., A. Kucukural, et al. (2010). "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction." Nat Protoc **5**(4): 725-38.
- Rutherford, A. W. and A. Boussac (2004). "Biochemistry. Water photolysis in biology." Science **303**(5665): 1782-4.
- Sambongi, Y. and S. J. Ferguson (1994). "Synthesis of holo *Paracoccus denitrificans* cytochrome c550 requires targeting to the periplasm whereas that of holo *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c552 does not. Implications for c-type cytochrome biogenesis." FEBS Lett **340**(1-2): 65-70.

- Sander, J., M. Nowaczyk, et al. (2010). "Functional characterization and quantification of the alternative PsbA copies in *Thermosynechococcus elongatus* and their role in photoprotection." J Biol Chem **285**(39): 29851-6.
- Sanders, C. and H. Lill (2000). "Expression of prokaryotic and eukaryotic cytochromes c in *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1459**(1): 131-8.
- Schulz, H., R. A. Fabianek, et al. (1999). "Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome c maturation requires the CcmC protein, which may function independently of the ABC-transporter CcmAB." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6462-7.
- Schwede, T., J. Kopp, et al. (2003). "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server." Nucleic Acids Res **31**(13): 3381-5.
- Shelnutt J, S. X.-Z., Ma J-G, Jia S-L, Jentzen W and Medforth C (1998). "Nonplanar porphyrins and their significance in proteins." Chemical Society reviews **27**.
- Shen, J. R. and Y. Inoue (1993). "Cellular localization of cytochrome c550. Its specific association with cyanobacterial photosystem II." J Biol Chem **268**(27): 20408-13.
- Shi, Y., W. Zhao, et al. (2006). "Regulation of intracellular free calcium concentration during heterocyst differentiation by HetR and NtcA in *Anabaena* sp. PCC 7120." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11334-9.
- Sicora, C. I., F. M. Ho, et al. (2009). "Transcription of a "silent" cyanobacterial psbA gene is induced by microaerobic conditions." Biochim Biophys Acta **1787**(2): 105-12.
- Silva, M. A., R. C. Valente, et al. (2014). "Thermodynamic and kinetic characterization of two methyl-accepting chemotaxis heme sensors from *Geobacter sulfurreducens* reveals the structural origin of their functional difference." Biochim Biophys Acta **1837**(6): 920-8.
- Sirpio, S., M. Suorsa, et al. (2011). "Analysis of thylakoid protein complexes by two-dimensional electrophoretic systems." Methods Mol Biol **775**: 19-30.
- Smith, A. T., S. Pazicni, et al. (2015). "Functional divergence of heme-thiolate proteins: a classification based on spectroscopic attributes." Chem Rev **115**(7): 2532-58.
- Smulevich, G., M. Bjerrum, et al. (1994). "Resonance raman-spectra and the active-site structure of semi synthetic met80Cys horse heart cytochrome-c." Inorganic Chemistry **33**(21): 4629-4634.
- Suga, M., T. L. Lai, et al. (2013). "Crystal structure at 1.5Å resolution of the PsbV2 cytochrome from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*." FEBS Lett **587**(19): 3267-72.
- Sugiura, M., C. Azami, et al. (2014). "Modification of the pheophytin redox potential in *Thermosynechococcus elongatus* Photosystem II with PsbA3 as D1." Biochim Biophys Acta **1837**(1): 139-48.
- Sugiura, M. and A. Boussac (2014). "Some Photosystem II properties depending on the D1 protein variants in *Thermosynechococcus elongatus*." Biochim Biophys Acta **1837**(9): 1427-34.

- Sugiura, M., S. Ogami, et al. (2012). "Environment of TyrZ in photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* in which PsbA2 is the D1 protein." J Biol Chem **287**(16): 13336-47.
- Sugiura, M., Y. Ozaki, et al. (2014). "The D1-173 amino acid is a structural determinant of the critical interaction between D1-Tyr161 (Tyr) and D1-His190 in Photosystem II." Biochim Biophys Acta **1837**(12): 1922-1931.
- Summerfield, T. C., J. Toepel, et al. (2008). "Low-oxygen induction of normally cryptic psbA genes in cyanobacteria." Biochemistry **47**(49): 12939-41.
- Tabuse, Y., T. Nabetani, et al. (2005). "Proteomic analysis of protein expression profiles during *Caenorhabditis elegans* development using two-dimensional difference gel electrophoresis." Proteomics **5**(11): 2876-91.
- Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 479-506.
- Thomas, P. E., D. Ryan, et al. (1976). "An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels." Anal Biochem **75**(1): 168-76.
- Thony-Meyer, L., F. Fischer, et al. (1995). "Escherichia coli genes required for cytochrome c maturation." J Bacteriol **177**(15): 4321-6.
- Torrecilla, I., F. Leganes, et al. (2000). "Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacteria." Plant Physiol **123**(1): 161-76.
- Ubbink, M., J. Van Beeumen, et al. (1992). "Cytochrome c550 from *Thiobacillus versutus*: cloning, expression in *Escherichia coli*, and purification of the heterologous holoprotein." J Bacteriol **174**(11): 3707-14.
- Ukita, S., T. Fujii, et al. (2010). A heterodimeric cytochrome c complex with a very low redox potential from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. FEMS Microbiol Lett. **313**: 61-7.
- Van Driessche, G., B. Devreese, et al. (2006). "GHP, a new c-type green heme protein from *Halochromatium salexigens* and other proteobacteria." Febs J **273**(12): 2801-11.
- Vargas, C., A. G. McEwan, et al. (1993). "Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence." Anal Biochem **209**(2): 323-6.
- Wallace, C. J. and I. Clark-Lewis (1992). "Functional role of heme ligation in cytochrome c. Effects of replacement of methionine 80 with natural and non-natural residues by semisynthesis." J Biol Chem **267**(6): 3852-61.
- Yang, J., R. Yan, et al. (2015). "The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction." Nat Methods **12**(1): 7-8.

- Yeh, S. R. and D. L. Rousseau (1998). "Folding intermediates in cytochrome c." Nat Struct Biol **5**(3): 222-8.
- Yoshioka, S., K. Kobayashi, et al. (2005). "Biophysical properties of a c-type heme in chemotaxis signal transducer protein DcrA." Biochemistry **44**(46): 15406-13.
- Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." BMC Bioinformatics **9**: 40.
- Zhong, F., G. Lisi, et al. (2013). "Redox-dependent stability, protonation, and reactivity of cysteine-bound heme proteins." PNAS.
- Zhou, J., H. Zhang, et al. (2014). "Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria." Sci Rep **4**: 4500.
- Zouni, A., H. T. Witt, et al. (2001). "Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution." Nature **409**(6821): 739-43.